

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της φοιτήτριας Χρηστίνας Χρόνη

Ολοκληρωμένη Διαχείριση
Βιοαποικοδομήσιμων Αστικών Αποβλήτων:
Παρακολούθηση της μικροβιακής διαδοχής
κατά την κομποστοποίηση
διαλεγμένων στην πηγή οργανικών αποβλήτων
στην Κρήτη

Υπό την επίβλεψη:

της λέκτορα κ^ας **Αδ. Κυριακού**

της επικ. καθηγήτριας κ^ας **Αικ. Λαζαρίδη**

του λέκτορα κ^ου **Κων. Αμπελιώτη**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιώσιμη Ανάπτυξη» του τμήματος «Οικιακής
Οικονομίας & Οικολογίας»,
κατεύθυνση «Διαχείριση Περιβάλλοντος»

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΑ 2006

Η έκδοση αυτή τυπώθηκε σε χαρτί Navigator Eco-logical 75g/m², το οποίο παρήχθη σύμφωνα με τις προδιαγραφές ISO 14001. Σε κανένα στάδιο της παραγωγής του δεν εκλύονται ενώσεις χλωρίου προς το περιβάλλον. Η ξυλεία που χρησιμοποιήθηκε, προέρχεται από δάση στα οποία εφαρμόζονται βιώσιμα συστήματα διαχείρισης.

ΑΘΗΝΑ 2006

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διπλωματική μελέτη εκπονήθηκε υπό την εποπτεία των κ. Κυριακού Αδ., κ. Λαζαρίδη Αικ. και κ. Αμπελιώτη Κων., προς τους οποίους θέλω να εκφράσω ιδιαίτερα τις ευχαριστίες μου για την καθοδήγηση και την ανιδιοτελή υποστήριξή τους. Η συμβολή τους στο σχεδιασμό της μελέτης, την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς και το αμείωτο ενδιαφέρον τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων υπήρξαν ανεκτίμητοι οδηγοί.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την κ. Κώτσου Μ., η οποία στάθηκε δίπλα μου κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Χάρη στις πολύτιμες παρατηρήσεις της έγινε δυνατή η εφαρμογή των κλασικών μικροβιακών μεθόδων καλλιέργειας, όπως και η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων.

Εκφράζω θερμές ευχαριστίες προς το βιολόγο Οικονόμου Ι. για τις κατευθύνσεις που μου έδωσε στην εφαρμογή των βιοτεχνολογικών μεθόδων. Η παρουσία του και ο οξυδερκής λόγος του έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην πορεία των πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους εργάζονταν στο συγκεκριμένο εργαστήριο το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία και δημιούργησαν – ο καθένας με το δικό του τρόπο – ευχάριστες συνθήκες εργασίας και έρευνας.

Περίληψη

Παρότι έχουν συνταχθεί πολλές επιστημονικές αναφορές σχετικά με τη διαδοχή της μικροβιακής κοινότητας που αναπτύσσεται στα αστικά στερεά απόβλητα, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη μικροβιακή ποικιλότητα, τη δραστηριότητα και την εξέλιξη κατά την κομποστοποίηση βιοαποικοδομήσιμων αποβλήτων (υπολειμμάτων κηπευτικών, φρούτων, απορριμμάτων του κήπου). Και αυτό αποτέλεσε στόχο της παρούσας εργασίας. Για την πραγματοποίησή της ελήφθησαν δείγματα βιοαποικοδομήσιμων αποβλήτων από μία πιλοτική μονάδα κομποστοποίησης στο Ηράκλειο της Κρήτης. Παρακολουθήθηκε η εξέλιξη του αρχικού κομπόστ από την ημέρα της εγκατάστασης μέχρι την ωρίμανσή του, σε σχέση με αβιοτικούς παράγοντες, τη μικροβιακή δραστηριότητα και τη διαδοχή λειτουργικών και ταξονομικών μικροβιακών ομάδων.

Τα δείγματα ελήφθησαν από ένα τυπικό σύστημα κομποστοποίησης σε σειράδια, σε χρονική κλίμακα 226 ημερών. Το αρχικό υλικό αποτελείτο από τροφικά υπολείμματα και κλαδοκάθαρα σε αναλογία 1:1. Τα τροφικά υπολείμματα είχαν επιλεγεί στην πηγή. Η μικροβιακή διαδοχή εξετάστηκε, με συνδυασμό κλασσικών και βιοτεχνολογικών (16S Ribosomal DNA ανάλυση) μεθόδων. Κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης, ελήφθησαν μετρήσεις σχετικά με τη θερμοκρασία, την υγρασία του υποστρώματος, τα πτητικά στερεά, την αναλογία C/N, το pH, την κατανάλωση O₂ και την παραγωγή CH₄, CO, CO₂ and H₂S. Με τυπικές, πολλάκις δοκιμασμένες μεθόδους δειγματοληψίας και καλλιέργειας μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκαν εκτιμήσεις σχετικά με τους πληθυσμούς αρκετών διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών (ολικών βακτηρίων, αμυλολυτικών, πρωτεολυτικών, κυτταρινολυτικών, εντεροβακτηρίων, μυκήτων και ζυμών). Για να γίνει εκτίμηση των μεσόφιλων και των θερμόφιλων πληθυσμών, οι αντίστοιχοι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασίες 30°C και 55°C, αντίστοιχα. Τέλος, εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) σε απομονώσεις ριβοσωμικού DNA, οι οποίες είχαν ενισχυθεί με τη μέθοδο PCR.

Η θερμοκρασία του υποστρώματος άγγιξε τη μέγιστη τιμή της (67°C) την 25^η ημέρα της διαδικασίας. Τόσο στο αρχικό υλικό, όσο και στα 5 δείγματα που ακολούθως ελήφθησαν εντοπίστηκε το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli*, παρόλο που η θερμοκρασία είχε φτάσει τους 67°C. Ωστόσο, μετά την 92^η ημέρα, ο πληθυσμός του έπεσε κάτω από τα ανιχνεύσιμα όρια. Τα ολικά κολίμορφα μειώθηκαν κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης, αλλά ήταν ανιχνεύσιμα μέχρι το τέλος της. Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν μειώθηκαν κατά το θερμόφιλο στάδιο, αλλά παρουσίασαν μία μικρή ανάκαμψη.

Abstract

Although several reports are available concerning the microbial community succession during composting of municipal solid waste, little is known about the microbial diversity, activity and evolution during composting of biowaste (vegetable, fruit and garden waste). In the present work we aimed at gaining a more complete picture of the microflora evolution during composting of biowaste in a pilot plant in Heraklio, Crete, from raw material to mature compost, with regard to abiotic factors, microbial activity and succession of functional and taxonomic groups.

Samples were taken from a typical windrow composting system during a 226-days processing period. The initial material was a mixture of food waste and garden waste, at a ratio of 1:1. Food waste was source separated. The succession of the microbial community was studied using a combination of traditional techniques with molecular ones (16S Ribosomal DNA Analysis). Temperature of the composting material, moisture and volatile solids content, C:N ratio, pH, O₂ consumption and CH₄, CO, CO₂ and H₂S production were measured during the composting process. A standard procedure for sampling of the compost and selective substrates were used for the enumeration of the different groups of microorganisms (total bacteria, amylolytic, cellulolytic and proteolytic bacteria, enterobacteria, fungi and yeasts). Mesophilic and thermophilic microorganisms were incubated at 30°C and 55°C respectively. Furthermore, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of PCR-amplified small subunit rDNA genes was applied to the samples.

The compost temperature reached its maximum value of 67°C at the 25th day of the process. *Escherichia coli* was detected in the raw material and the following 5 samples, although the temperature had reached 67°C. However, after the 92nd day, the population of *Escherichia coli* declined below the detection limit. The total coliforms population decreased during the process, but was detectable until the end of the process. Most of the microorganisms examined decreased during the thermophilic phase of the composting, but increased again when the temperature began to drop.

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	I
<i>Περίληψη</i>	II
<i>Abstract</i>	III

A. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1. Εισαγωγή	2
1.1. Σκοπός της παρούσας εργασίας	3
2. Η διαδικασία της κομποστοποίησης	4
2.1. Η εξέλιξη της κομποστοποίησης σε σχέση με τη θερμοκρασία	4
2.2. Χρήσεις του κομπόστ	5
2.3. Συστήματα κομποστοποίησης	7
2.3.1. Ανοιχτά συστήματα	7
2.3.2. Κλειστά συστήματα	8
3. Μικροβιακή οικολογία	9
3.2. Σχέσεις της μικροβιακής δραστηριότητας με φυσικές και χημικές παραμέτρους	9
3.1.1. Η θερμοκρασία	9
3.1.2. Η υγρασία	9
3.1.3. Ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N)	10
3.1.4. Η οξύτητα του υποστρώματος	11
3.1.5. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα	12
3.1.6. Τα πτητικά στερεά	13
3.1.7. Η περιεκτικότητα σε οξυγόνο	13
3.1.8. Αναερόβιες συνθήκες	14
3.1.9. Απώλειες σε άζωτο	15
4. Αυτοοικολογική προσέγγιση	16
4.1. Ολικά βακτήρια	16
4.1.1. Βακτήρια που χρησιμοποιούν τα ιόντα του αζώτου στην αναπνευστική τους λειτουργία	17
4.1.2. Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην αμμωνιοποίηση	18
4.2. Ακτινοβακτήρια	19
4.3. Μύκητες	20
4.4. Δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί και δείκτες παθογόνων του	

ανθρώπου και των ζώων	22
4.5. Φυτοπαθογόνα	24
5. Μέθοδοι διερεύνησης των μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος στην κομποστοποίηση	25
<u>B. Υλικά και μέθοδοι</u>	
6. Θερμόφιλη βίο-αποικοδόμηση οργανικών υλικών (κομποστοποίηση)	27
6.1. Συγκέντρωση υλικού	27
6.2. Η διαδικασία της κομποστοποίησης και η δειγματοληψία	27
6.3. Οι μετρήσεις	28
7. Μετρήσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων	29
7.1. Η μέτρηση της θερμοκρασίας	29
7.2. Οι μετρήσεις των αερίων	29
7.3. Επί τοις εκατό ποσοστό υγρασίας	29
7.4. Τα πτητικά στερεά	29
7.5. Η οξύτητα του υποστρώματος	30
7.6. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα	30
7.7. Ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N)	30
8. Μικροβιολογικές αναλύσεις με κλασικές τεχνικές	31
8.1. Προετοιμασία δειγμάτων	31
8.2. Μέθοδοι καταμέτρησης	31
8.3. Προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη των βίο-αποικοδομητών	32
8.3.1. Ολικά αερόβια	32
8.3.2. Σποριογόνα βακτήρια	32
8.3.3. Κυτταρινολυτικά βακτήρια	32
8.3.4. Αμυλολυτικά βακτήρια	33
8.3.5. Πρωτεολυτικά βακτήρια	34
8.3.6. Μύκητες – Ζύμες	34
8.4. Υποστρώματα για περιπτωματικούς δείκτες: Ολικά κολίμορφα και <i>Escherichia coli</i>	34
9. Μικροβιολογικές αναλύσεις με μοριακές τεχνικές	35
9.1. Προετοιμασία δειγμάτων	35

9.2. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	
9.3. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)	35
9.3.1. Ολιγονουκλεοτίδια εκκίνησης (primers)	35
9.3.2. Διαλύματα ενίσχυσης	36
9.3.3. Πρόγραμμα θερμοκρασιών	36
9.4. Έλεγχος των PCR-προϊόντων	37
9.4.1. Χρώση του πηκτώματος και παρατήρηση	37
9.5. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης με Βαθμίδωση Αποδιατακτικών Παραγόντων	37
9.5.1. Προετοιμασία του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	38
9.5.2. Συνθήκες DGGE	39
9.5.3. Χρώση του πηκτώματος και οπτική παρατήρηση	39
9.5.4. Sequencing και φυλογενετική ανάλυση	39

Γ. Αποτελέσματα και σχολιασμός

10. Μετρήσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων	40
10.1. Η διακύμανση της θερμοκρασίας	41
10.2. Ο όγκος του υποστρώματος	43
10.3. Η υγρασία	44
10.4. Τα πτητικά στερεά	45
10.5. Η οξύτητα	47
10.6. Ο λόγος C/N	48
10.7. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα	48
10.8. Οι μετρήσεις των αερίων	49
11. Μικροβιολογικές αναλύσεις με κλασικές τεχνικές	53
11.1. Ολικά βακτήρια	53
11.2. Σποριογόνα βακτήρια	54
11.3. Κυτταρινολυτικά βακτήρια	55
11.4. Αμυλολυτικά βακτήρια	55
11.5. Πρωτεολυτικά βακτήρια	57
11.6. Περιττωματικοί δείκτες	58
11.7. Μύκητες και ζύμες	59
12. Μικροβιολογικές αναλύσεις με μοριακές τεχνικές	61
12.1. Η ανάλυση των βακτηριακών 16S-rDNA κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης	61

12.2. Φυλογενετική ανάλυση	61
<u>Δ. Συμπεράσματα</u>	63
13. Συμπεράσματα	64
<u>Ε. Βιβλιογραφία</u>	

A. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Εισαγωγή

Παρότι δεν υπάρχει ένας αυστηρός και καθολικά αποδεκτός ορισμός, η πλειονότητα της επιστημονικής κοινότητας χρησιμοποιεί τον όρο κομποστοποίηση για να περιγράψει τη βιολογική οξειδωτική διαδικασία αποικοδόμησης και σταθεροποίησης οργανικών υλικών (Gray *et al.*, 1971; Haug, 1996; Μπαλής, 1996), υπό τις φυσικές και χημικές εκείνες συνθήκες που ευνοούν τη διαδοχή συγκεκριμένων θερμοφίλων, θερμοάντοχων και μεσόφιλων μικροβιακών πληθυσμών. Απώτερος σκοπός είναι η αξιοποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας των εν λόγω μικροοργανισμών, ώστε να παραχθεί το κομπόστ (compost), ένα σταθεροποιημένο, δηλαδή, τελικό προϊόν, απαλλαγμένο από παθογόνα και σπόρους φυτών, το οποίο να έχει οικονομική χρησιμότητα. Κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης, καταναλώνεται O_2 , ενώ με παράλληλη έκλυση θερμότητας, παράγονται CO_2 , H_2O και σταθεροποιημένο οργανικό υλικό.

Στο πέρασμα των αιώνων, αρκετοί πολιτισμοί ανακάλυψαν, συμπτωματικά, το κομπόστ και την εφαρμογή του ως βελτιωτικό εδάφους, και προσπάθησαν, εμπειρικά, να αξιοποιήσουν την κομποστοποίηση λαμβάνοντας ως «πρώτες» ύλες υπολείμματα της γεωργικής παραγωγής και κοπριά αγροτικών ζώων (Balis, 1992). Έλειπε, ωστόσο, το θεωρητικό υπόβαθρο που θα επέτρεπε την αποσαφήνιση και την καθοδήγηση της διαδικασίας, ώστε η παραγωγή σταθεροποιημένου κομπόστ να μετατραπεί από ευκαίιο σε επιτεύξιμο στόχο. Το γεγονός αυτό, οδήγησε το οικονομικό και γενικότερο κατ' επέκταση ενδιαφέρον σε λανθάνουσα κατάσταση.

Επιστρέφοντας στο σήμερα, το τοπίο έχει αλλάξει σε αρκετά σημεία. Από τη μία πλευρά, το γνωστικό πλαίσιο που σχηματοποιήθηκε τα νεότερα χρόνια, φαίνεται ότι αποτελεί ακράδαντο εφελτήριο για την κατανόηση και τη διερεύνηση της κομποστοποίησης. Η διεπιστημονική προσέγγιση της όλης διαδικασίας (Miller, 1996) - η διύλιση αυτής, δηλαδή, μέσα από τα θεωρητικά φίλτρα της Βακτηριολογίας, της Μυκητολογίας, της Μικροβιακής Οικολογίας, της Μοριακής Βιολογίας, της Εδαφολογίας, της Φυσικής, της Γεωπονίας, της Περιβαλλοντολογίας και της Οικονομικής Επιστήμης - προσέφερε πιθανές ερμηνείες και εξηγήσεις για ορισμένα από τα στάδια της, ενώ παράλληλα άρχισε να ανοίγει το δρόμο για την περιβαλλοντικά αποδεκτή και οικονομικά βιώσιμη εφαρμογή της.

Από την άλλη, το μεγάλο ενδιαφέρον για την κομποστοποίηση, δεν συγκεντρώνεται όπως παλιότερα, στις χρήσεις του κομπόστ αλλά έχει μετατοπιστεί στη διαχείριση του αρχικού οργανικού υλικού. Εξαιτίας της υπέρογκης παραγωγής αποβλήτων και της ανάγκης εξεύρεσης εναλλακτικών λύσεων διαχείρισης αυτών, η κομποστοποίηση εξετάζεται σήμερα πρωτίστως ως μέσο διαχείρισης στερεών οργανικών αποβλήτων και λιγότερο ως διαδικασία παραγωγής βελτιωτικών εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, το κομπόστ μελετάται με σκοπό να γίνει η κομποστοποίηση οικονομικά αξιοποιήσιμη και περιβαλλοντικά αποδεκτή. Ένας από τους

στόχους της μελέτης του είναι η αδρανοποίηση των τοξικών ενώσεων και η εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να φέρει.

Δεδομένου ότι η εξέλιξη της κομποστοποίησης συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη και τη δράση των μικροβιακών πληθυσμών, οι έρευνες επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση των μικροβιακών ειδών, στη μικροβιακή διαδοχή, καθώς και στη μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή κοινότητα, όπως η σύσταση του υποστρώματος, το pH, η παρουσία τοξικών ενώσεων, η θερμοκρασία του υποστρώματος και –λιγότερο – του περιβάλλοντος. Γίνεται επομένως κατανοητό, ότι η μικροβιακή κοινότητα εξετάζεται σε δύο επίπεδα: αφενός σε επίπεδο είδους, δηλαδή βάσει των προσεγγίσεων της αυτοοικολογίας, αφετέρου σε επίπεδο αλληλεπίδρασης των ειδών, δηλαδή υπό το πρίσμα της συνοικολογίας (Miller, 1996).

1.1. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η παρούσα εργασία έχει ως αντικείμενο τη μελέτη της μικροβιακής διαδοχής σε οικιακά οργανικά απόβλητα, τα οποία συλλέχθηκαν από μία αστική και μία ημιαστική περιοχή (Ηράκλειο και Σητεία Κρήτης, αντίστοιχα) και κομποστοποιήθηκαν από το Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης, στο πλαίσιο του έργου «Προαγωγή της προστασίας του περιβάλλοντος, της αειφόρου ανάπτυξης και της δημόσιας υγείας, με την εφαρμογή προγράμματος περιβαλλοντικής και διατροφικής αγωγής» που χρηματοδοτείται από το ΕΠΕΑΕΚ, στο πλαίσιο του προγράμματος «Αρχιμήδης». Η μικροβιακή διαδοχή μελετάται με κλασικές αλλά και με μοριακές τεχνικές με στόχο να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων, μετά το πέρας της διαδικασίας και της ωρίμανσης του κομπόστ.

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, όπου ελήφθησαν μετρήσεις χημικών και φυσικών παραμέτρων και εφαρμόστηκαν οι προγραμματισμένες κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, μικροβιολογικές και βιοτεχνολογικές αναλύσεις.

2

Η διαδικασία της κομποστοποίησης**2.1. Η εξέλιξη της κομποστοποίησης σε σχέση με τη θερμοκρασία**

Με βάση τη διακύμανση των θερμοκρασιών του υποστρώματος, η διαδικασία της κομποστοποίησης χωρίζεται σε τέσσερα διαδοχικά στάδια: το μεσόφιλο, το θερμόφιλο, το στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας ή –κατά άλλους– στάδιο ψύχρασης και το στάδιο ωρίμανσης.

Το μεσόφιλο στάδιο διαρκεί από 24 έως 48h και χαρακτηρίζεται από έντονους ρυθμούς αύξησης της θερμοκρασίας, μέχρι να προσεγγιστεί το επίπεδο των 40 ή των 50°C. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρουν οι Harper *et al.* (1992), κάτω από συνθήκες που ευνοούν τους ρυθμούς βίο-αποικοδόμησης, η θερμοκρασία του αρχικού υλικού μπορεί να αυξηθεί περισσότερο από 30°C, σε λιγότερο από 24h. Κατά το μεσόφιλο στάδιο, δρουν μεσόφιλοι και θερμοάντοχοι μικροοργανισμοί (κυρίως βακτήρια), οι οποίοι μεταβολίζουν τις εύκολα αφομοιώσιμες θρεπτικές ενώσεις. Η παρατηρούμενη μεγάλη άνοδος της θερμοκρασίας, οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμότητα που παράγουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί, μέσω των μεταβολικών τους οδών, δεν απομακρύνεται αρκετά γρήγορα από το υπόστρωμα, εξαιτίας των μονωτικών ιδιοτήτων του και του αερισμού (Μπαλής, 1996). Έτσι, μπορεί να λεχθεί ότι η θερμοκρασία του υποστρώματος αντανakλά τόσο την τρέχουσα μικροβιακή δραστηριότητα, όσο και εκείνη που έχει αναπτυχθεί καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας του συστήματος κομποστοποίησης (Beffa *et al.*, 1996). Η ίδια αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί γρήγορη μετάβαση του συστήματος από το μεσόφιλο στο επόμενο στάδιο, το λεγόμενο θερμόφιλο. Ή, ορθότερα, οδηγεί στη διαδοχή της μεσόφιλης μικροχλωρίδας από τη θερμόφιλη.

Καθώς η διαδικασία της κομποστοποίησης εξελίσσεται και η τιμή της θερμοκρασίας ξεπερνάει τους 40°C, η δράση των μεσόφιλων μικροοργανισμών αρχίζει να αναστέλλεται, ενώ όταν προσεγγιστούν οι 45°C, η σκυτάλη της μικροβιακής δραστηριότητας περνάει στους θερμόφιλους (Miller, 1996). Ο καθορισμός της βέλτιστης ανώτατης θερμοκρασίας κατά το θερμόφιλο στάδιο, έχει αποτελέσει σημείο επισταμένης έρευνας και ήπιων επιστημονικών διαξιφισμών. Οι βέλτιστες τιμές που έχουν αναφέρει κατά καιρούς οι ερευνητές, κυμαίνονται από 40°C έως 70°C (Haug, 1993) και λέγεται ότι εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το υπόστρωμα και το σύστημα κομποστοποίησης. Σύμφωνα με τον Miller (1996), η μέγιστη απόδοση της κομποστοποίησης σημειώνεται μεταξύ 55 και 59°C, ενώ πάνω από τους 60°C, αρχίζει η θερμοκρασιακή αναστολή των μικροοργανισμών, δεδομένου ότι ξεπερνιέται το βέλτιστο όριο δράσης τους. Η μέγιστη θερμοκρασία που έχει ως τώρα σημειωθεί σε συστήματα κομποστοποίησης (τύπου open field) αγγίζει τους 82°C, στους οποίους, όπως παρατηρήθηκε, η μικροβιακή δραστηριότητα σταματάει (Finstein *et al.*, 1983).

Μετά την προσέγγιση της μέγιστης θερμοκρασίας, η μικροβιακή κοινότητα του κομπόστ τείνει να συρρικνωθεί σε επίπεδο ποικιλότητας και πληθυσμού, με άμεση συνέπεια τη μείωση της θερμοκρασίας, λόγω της επιβράδυνσης της μεταβολικής παραγωγής θερμότητας.

Στο σημείο αυτό, οι διαχειριστές του συστήματος επεμβαίνουν (π.χ. με αναδεύσεις, αερισμό ή και διαβροχή), οπότε η μικροβιακή κοινότητα επανακάμπτει και ο κύκλος ανάπτυξης και κατάρρευσης επαναλαμβάνεται. Το θερμοφιλό στάδιο θα συνεχιστεί μέχρι ο ρυθμός παραγωγής θερμότητας να γίνει μικρότερος από τον ρυθμό απώλειας θερμότητας προς το περιβάλλον. Δηλαδή μέχρι να εξαντληθούν οι ενώσεις που μπορούν σχετικά εύκολα να μεταβολιστούν. Το γεγονός αυτό τοποθετείται χρονικά μετά την 6^η ή 8^η εβδομάδα της κομποστοποίησης και αποτελεί την έναρξη του τρίτου σταδίου. Κατά τη διάρκεια του σημειώνεται πτώση της θερμοκρασίας. Στο τέλος του τρίτου σταδίου, η θερμοκρασία του κομπόστ τείνει να ταυτιστεί με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία πλησιάζει στην ολοκλήρωσή της (Haug, 1993).

Στο στάδιο της ωρίμανσης, στόχο αποτελεί η αδρανοποίηση των τοξικών ενώσεων που ενδεχομένως περιέχει το υπόστρωμα, ενώ η μικροβιακή δράση σημειώνεται με ασθενέστερους ρυθμούς. Η εξουδετέρωση παθογόνων και παρασίτων έχει ήδη επιτευχθεί κατά τη θερμοφιλή φάση.

2.2. Χρήσεις του κομπόστ

Από τη στιγμή που το ζήτημα της υπέρμετρης παραγωγής αποβλήτων ξεκίνησε να καταλαμβάνει όλο και μεγαλύτερο χώρο στις «δεξαμενές» της οικονομικής, πολιτικής, κοινωνικής και επιστημονικής σκέψης, η κομποστοποίηση άρχισε να μαγνητίζει το ενδιαφέρον των ειδικών ως μέσο διαχείρισης αποβλήτων (Πίνακας 2.1.). Πλέον, το κύριο θέμα συζήτησης δεν είναι η εξεύρεση των αρχικών υλικών –αφού είναι «εξασφαλισμένη» η παραγωγή αποβλήτων– αλλά η αύξηση των αποδόσεων της κομποστοποίησης και η οικονομικά συμφέρουσα και περιβαλλοντικά αποδεκτή αξιοποίηση των κομπόστ.

Πίνακας 2.1.

Χαρακτηριστικά στοιχεία ενός συστήματος κομποστοποίησης του οργανικού κλάσματος των αστικών στερεών αποβλήτων (προσαρμογή από Tchobanoglous *et al.*, 1993, pp684)

Χαρακτηριστικά	Κομποστοποίηση
Ενέργεια	Κατανάλωση
Τελικά προϊόντα	Κομπόστ, CO ₂ , H ₂ O
Μείωση όγκου	Έως 50%
Διάρκεια επεξεργασίας	20 έως 30 ημέρες
Πρωταρχικός στόχος	Μείωση του όγκου
Δευτερεύων στόχος	Παραγωγή κομπόστ

Οι κυριότερες από τις εφαρμογές που έχουν μέχρι στιγμής προταθεί αφορούν στη χρήση των κομπόστ ως:

- υλικό υποστρωμάτων για την καλλιέργεια καλλωπιστικών φυτών, κηπευτικών και ανθοκομικών (Corti *et al.*, 1998) ή την ανάπτυξη μανιταριών (Μανιός και Κριτσωτάκης, 2000)
- μέσο για τη βελτίωση ή την αποκατάσταση του όγκου ή της σύστασης του εδάφους (π.χ. αναδασώσεις [USA EPA, 1994α])
- υλικό για τη βελτίωση ή την αποκατάσταση της γονιμότητας του εδάφους (Oades, 1984; Balesdent *et al.*, 2000; Ouedraogo *et al.*, 2001; Rivero *et al.*, 2004)
- μέσο ανάσχεσης φυτοπαθογόνων (Hardy and Sivasithamparam, 1991; Hoitink *et al.*, 1991; Boehm *et al.*, 1993; Schüler *et al.*, 1993)
- υλικό επικάλυψης Χώρων Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (McNevin and Barford, 2002; Hurst *et al.*, 2005)
- μέσο προστασίας από τη διάβρωση εδάφους (π.χ. στα πρανή των Εθνικών Οδών [USA EPA, 1994β])
- υλικό δομικών εργασιών (π.χ. για καλύψεις και επιχωματώσεις [Hauke *et al.*, 1996] ή ως υλικό ηχομόνωσης [Vogtmann *et al.*, 1996]) και
- φίλτρο καθαρισμού αέρα [Vogtmann *et al.*, 1996].

Ως κριτήρια για την καταλληλότητα του κομπόστ εκλαμβάνονται συνήθως, ο βαθμός ωρίμανσης και η σταθερότητά του. Ο βαθμός ωρίμανσης μπορεί να προσδιοριστεί και με εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας μέσω του ρυθμού ειδικής κατανάλωσης οξυγόνου (Lasaridi and Stentiford, 1997). Σε ορισμένες εφαρμογές, όπως η χρήση του για το βιολογικό έλεγχο ασθενειών κατά την ανάπτυξη φυτών σε δοχεία, απαιτείται μεγάλος βαθμός ωρίμανσης (Inbar *et al.*, 1993). Στην περίπτωση εφαρμογής του σε αγρούς, υπάρχει μεγαλύτερη ανοχή σχετικά με την ωρίμανση, με την προϋπόθεση όμως ότι θα προστεθεί αρκετά νωρίτερα από την σπορά ή τη φύτευση, οπότε θα υπάρχει χρονικό περιθώριο για περαιτέρω σταθεροποίηση (Hoitink *et al.*, 1996). Όπως επισημαίνουν οι Rivero *et al.* (2004), με την εφαρμογή «ανώριμου» κομπόστ, αυξάνονται οι πιθανότητες να απορροφηθούν βαρέα μέταλλα από τις ρίζες των φυτών και να «περάσουν» στην τροφική αλυσίδα.

Στο σημείο, ωστόσο, αυτό πρέπει να τονιστεί ότι τα κομπόστ που προέρχονται από τροφικά υπολείμματα και τις εργασίες κηπουρικής, παρουσιάζουν καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά από τα κομπόστ των στερεών οργανικών αποβλήτων που δεν έχουν διαχωριστεί, οπότε δεν εμφανίζουν τα ίδια προβλήματα διάθεσης (Vogtmann *et al.*, 1996). Όταν το κομπόστ προορίζεται για επικάλυψη Χώρου Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ), ελέγχονται κυρίως η πυκνότητα και η σταθερότητά του και λιγότερο ο βαθμός ωρίμανσης (Miller, 1996).

2.3. Συστήματα κομποστοποίησης

Η διεπιστημονική προσέγγιση της κομποστοποίησης, αλλά και η εξέλιξη των τεχνολογικών μέσων, οδήγησαν στην ανάπτυξη αρκετών διαφορετικών, αλλά αποδοτικών και οικονομικά βιώσιμων συστημάτων. Κοινός παρανομαστής όλων, είναι η διασφάλιση – και σε δεύτερο επίπεδο η εξασφάλιση- ικανοποιητικού αερισμού. Ενώ, κύριο στοιχείο διάκρισής τους αποτελεί η παρουσία ή μη αντιδραστήρα (Haug, 1993). Στα συστήματα με αντιδραστήρα, το υπόστρωμα εγκιβωτίζεται σε δεξαμενές ή σιλό, ενώ στα υπόλοιπα προβλέπεται εναπόθεση τού σε υπαίθριες εγκαταστάσεις.

Ως προς την παρουσία ή απουσία αντιδραστήρα, τα συστήματα κομποστοποίησης χαρακτηρίζονται: ανοιχτά, κλειστά και μεικτά (Stentiford, 1993; Szmidz and Fox, 2001). Καθένα από αυτά, μπορεί να καταταχθεί σε άλλες υποκατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο του συστήματος αερισμού (π.χ. εμφύσηση ή αναρρόφηση αέρα) ή τον τρόπο τροφοδοσίας του υποστρώματος.

Κύριοι στόχοι στο πλάνο διαχείρισης ενός συστήματος κομποστοποίησης στερεών οργανικών αποβλήτων είναι η μείωση του βάρους και του όγκου των αρχικών υλικών, ο έλεγχος της θερμοκρασίας και της υγρασίας, η εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών, η ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών οχλήσεων (π.χ. εκπομπές αερίων που συμβάλλουν στο Φαινόμενο του Θερμοκηπίου, οσμές και αιωρούμενα σωματίδια). Οι τρόποι διαχείρισης διαμορφώνονται ανάλογα με τις επιδιωκόμενες χρήσεις του τελικού προϊόντος (Miller, 1996).

2.3.1. Ανοιχτά συστήματα

Στη συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνονται όλα τα συστήματα στα οποία το υπόστρωμα δεν τοποθετείται σε συγκεκριμένες δεξαμενές, αλλά εναποτίθεται σε εξωτερικές εγκαταστάσεις. Τα ανοιχτά συστήματα διακρίνονται στους εξής κύριους τύπους:

- i. **Γραμμικοί σωροί (σειράδια)** Τα αρχικά υλικά αποτίθενται σε γραμμικούς σωρούς με τραπεζοειδή διατομή. Ενδεικτικά, το ύψος κάθε σωρού διαμορφώνεται μέχρι 1.5m, το πλάτος βάσης έως 4m και το πλάτος κορυφής περίπου 1m (Μπαλής, 1996). Το υπόστρωμα αναδεύεται περιοδικά, έτσι ώστε να διατηρείται όσο πιο ομοιογενές γίνεται, να εφοδιάζεται με το απαιτούμενο οξυγόνο και να εμφανίζει ελεγχόμενο επίπεδο θερμοκρασίας (Tchobanoglous *et al.*, 1993). Ο χρόνος βιο-αποικοδόμησης εξαρτάται από τις αρχικές διαστάσεις των σωρών, τη σύσταση του αρχικού υλικού, την περιεκτικότητα σε υγρασία και τη συχνότητα ανάδευσης. Στα αρνητικά του χαρακτηριστικά συγκαταλέγεται η απελευθέρωση οσμών. Μετά το θερμόφιλο στάδιο, οι σωροί αφήνονται σε ηρεμία για τρεις έως τέσσερις εβδομάδες.
- ii. **Στατικοί σωροί με δυναμικές συνθήκες αερισμού** Αναπτύχθηκαν από το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, στο Σταθμό

Γεωργικής Έρευνας στο Beltsville της πολιτείας Maryland (Tchobanoglous *et al.*, 1993). Αρχικά, σχεδιάστηκαν για την επεξεργασία ιλύος από αστικά λύματα, ωστόσο είναι εφικτό να αξιοποιηθούν και για την κομποστοποίηση οργανικών αποβλήτων (π.χ. υπολειμμάτων των κήπων, διαχωρισμένων αστικών στερεών αποβλήτων). Τα αρχικά υλικά στρώνονται όπως και στα συστήματα γραμμικών σωρών, με τη διαφορά ότι δεν αναδεύονται. Ο αερισμός τους επιτυγχάνεται με συστήματα εμφύσησης ή αναρρόφησης αέρα. Δεδομένου ότι η επιτυχία του συστήματος κρίνεται από τη διασφάλιση αερισμού και από τον έλεγχο του ισοζυγίου παραγωγής-απώλειας θερμότητας, σημαντική λειτουργική παράμετρο αποτελεί η ποσότητα των αρχικών υλικών και το μέγεθος των τεμαχιδίων (Μπαλής, 1996).

iii. **Μεικτά** αποτελούν συνδυασμό των προηγούμενων

2.3.2. Κλειστά συστήματα

Στα κλειστά ή εγκιβωτισμένα συστήματα κομποστοποίησης, το αρχικό υλικό τοποθετείται σε έναν αντιδραστήρα (δεξαμενή ή σιλό), του οποίου οι διαστάσεις και το σχήμα (ορθογώνιο παραλληλόγραμμο ή κύλινδρος) ποικίλουν ανάλογα το σχεδιασμό της εγκατάστασης. Η διάκρισή τους σε κατηγορίες μπορεί να γίνει τόσο με κριτήριο την κυκλοφορία του υποστρώματος στο σύστημα, όσο και με τον τρόπο αερισμού. Ως προς την κυκλοφορία του υποστρώματος, τα συστήματα χωρίζονται σε κάθετης και οριζόντιας ροής, ενώ όσον αφορά στον αερισμό, αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με διοχέτευση αέρα, όσο και με μηχανική ανάδευση των υποστρωμάτων.

i. **Κάθετης ροής** Ο αντιδραστήρας είναι ένα πολυώροφο σιλό ή πύργος. Τα υλικά τοποθετούνται στον ψηλότερο όροφο και καθώς κομποστοποιούνται, οδηγούνται με μηχανικό τρόπο στα χαμηλότερα επίπεδα. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν χαρακτηριστικά τα συστήματα «Earp-Thomas» και «Frazer-Eweson» (Μπαλής, 1996).

ii. **Οριζόντιας ροής** Ο αντιδραστήρας είναι συνήθως μία δεξαμενή με μία είσοδο και μία έξοδο υλικών. Τα υλικά τροφοδοτούνται από τη μία άκρη της δεξαμενής και αφού διατρέξουν οριζόντια τη δεξαμενή οδηγούνται στην έξοδο.

Επιδιωκόμενοι στόχοι κατά τη σχεδίαση και κατασκευή των κλειστών συστημάτων, είναι η ελαχιστοποίηση περιβαλλοντικών οχλήσεων (π.χ. απελευθέρωση οσμών και αιωρούμενων σωματιδίων), καθώς και η επίσπευση της κομποστοποίησης.

3

Μικροβιακή Οικολογία**3.1. Σχέσεις της μικροβιακής δραστηριότητας με φυσικές και χημικές παραμέτρους****3.1.1. Η θερμοκρασία**

Σε κάθε εισαγωγικό σύγγραμμα Βιοχημείας, αναφέρεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, μέχρι ένα όριο, συνοδεύεται από αύξηση της ταχύτητας μίας ενζυμικής αντίδρασης. Πέρα από το βέλτιστο αυτό όριο, το ενζυμικό μόριο υφίσταται θερμική αποδιάταξη, με αποτέλεσμα την απότομη απώλεια της δράσης του (Διαμαντίδης, 1994). Δεδομένου ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης όλων των - γνωστών - μικροβιακών πληθυσμών, αντανακλούν εν πολλοίς τη δραστικότητα των ενζύμων τους, συμπεραίνεται επαγωγικά ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος προς ένα συγκεκριμένο όριο, τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών, καθώς και ότι όταν η θερμοκρασία αγγίξει το όριο αυτό, οι πληθυσμοί θα παρουσιάσουν απότομη κατάρρευση. Οι ισχυρισμοί αυτοί επιβεβαιώθηκαν το 1991 από εργασία των Zwietering *et al.*

Όταν η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 20°C, η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται – σε κάποια είδη, τόσο ώστε να ξεκινήσει ληθαργική φάση. Όταν η θερμοκρασία ξεπερνάει το επίπεδο των 20°C, η μικροβιακή δράση γίνεται εντονότερη. Η ενζυμική δραστηριότητα διπλασιάζεται κάθε φορά που σημειώνεται αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C (Atlas and Bartha, 1981).

Κατά το θερμόφιλο στάδιο της κομποστοποίησης, η προσέγγιση υψηλών θερμοκρασιών (55-60°C) αποκτά χαρακτήρα άμεσου στόχου, προκειμένου να εξουδετερωθούν ή έστω να μειωθούν στο επίπεδο αποδεκτών ορίων, οι δυνητικά παθογόνοι μικροβιακοί πληθυσμοί, τα παράσιτα και οι σπόροι των φυτών. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά της δεν είναι πάντα εγγυημένη, αφού ορισμένοι από τους παθογόνους μικροοργανισμούς ή δείκτες αυτών, μπορούν να επανακάμψουν (Hess *et al.*, 2004). Η «επαναφορά» τους οφείλεται ενδεχομένως σε επιβίωση μερικών στην περιφέρεια των κομπόστ, όπου οι θερμοκρασίες είναι αισθητά χαμηλότερες ή στην παρουσία θερμοάντοχων ληθαργικών μορφών (π.χ. ενδοσπόρια, σκληρώτια).

3.1.2. Η υγρασία

Το επίπεδο της υγρασίας επηρεάζει με δύο τρόπους την εξέλιξη της θερμόφιλης βιο-αποικοδόμησης οργανικών υλικών. Κατ' αρχάς, επιδρά άμεσα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αφού το νερό είναι απαραίτητο για τις φυσιολογικές λειτουργίες (αναπνευστικές δραστηριότητες, θρέψη) και τη μεταφορά τους (Miller, 1989), κατά δεύτερο

διαμορφώνει μία σειρά φυσικών και χημικών παραμέτρων (όπως η συγκέντρωση και η διάχυση των διαλυτών στερεών, ο αερισμός, το οσμωτικό ισοδύναμο του υποστρώματος και οι δυνάμεις με τις οποίες συγκρατείται το νερό στα συστατικά του υποστρώματος), οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα (Μανιός, 1979). Σαν γενικός κανόνας θεωρείται ότι η βέλτιστη μικροβιακή δραστηριότητα επιτυγχάνεται, όταν η υγρασία του υποστρώματος λαμβάνει τη μέγιστη τιμή που δεν περιορίζει τη διάχυση του οξυγόνου (Miller, 1996).

Το επίπεδο της υγρασίας της υπό κομποστοποίηση οργανικής μάζας, εκφράζεται συνήθως, σε εκατοστιαίο ποσοστό (%) επί του ξηρού ή του υγρού βάρους. Όμως, αυτό δεν δίνει σαφή εικόνα της υδατικής κατάστασης, γιατί το ίδιο ποσοστό, όταν αναφερόμαστε σε υποστρώματα διαφορετικής σύστασης, μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορετική τάση νερού (Μανιός, 1979). Ωστόσο, σε πολλές έρευνες, η εκατοστιαία συγκέντρωση της υγρασίας εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, ενώ, γενικότερα είναι αποδεκτό ότι υπάρχουν διαφορετικά βέλτιστα πεδία για διαφορετικά υποστρώματα. Ως εναλλακτικό μέγεθος εκτίμησης της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε νερό, αποτελεί το υδατικό δυναμικό, με μονάδα μέτρησης το 1Pa (Miller, 1996).

Κατά την εξέλιξη της κομποστοποίησης, η θερμότητα που παράγεται από τη μικροβιακή δραστηριότητα, μπορεί να μειώσει το ποσοστό υγρασίας του ώριμου κομποστ στο 20 ή 30% (Miller and Fenstein, 1985). Σε ορισμένα απόβλητα, η υγρασία μειώνεται σε τέτοιο βαθμό, που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα και χρειάζεται η προσθήκη νερού ώστε η μικροβιακή κοινότητα να επανακάμψει και το κομποστ να ωριμάσει (Robinson and Stentiford, 1993). Πάντως, τα χαμηλά ποσοστά υγρασίας δεν συνεπάγονται κατά ανάγκη καταστολή της διαδικασίας. Οι Shell and Boyd (1969) έδειξαν ότι υπήρχε υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα σε σχετικά στεγνά υποστρώματα, όταν λειτουργούσαν συστήματα συνεχούς ανάδευσης (Shell and Boyd, 1969). Αντίστοιχα, οι Finstein *et al.* (1983) παρατήρησαν σημαντική δραστηριότητα σε υπόστρωμα με υγρασία 22%, όταν όλες οι άλλες συνθήκες ήταν ευνοϊκές και οι μικροβιακές αποικίες καλά εγκατεστημένες (Finstein *et al.*, 1983).

Μία δυσδιάκριτη αλλά αρκετά ενδιαφέρουσα πτυχή της υγρασίας του υποστρώματος, είναι η παραγωγή νερού κατά το μεταβολισμό των μικροοργανισμών, η οποία βάσει θεωρητικών μοντέλων, υπολογίστηκε ότι προσεγγίζει τα 0.72g για 1g αστικών λυμάτων που μεταβολίζεται (Haug, 1979), ενώ μέσω πειραματικών μετρήσεων εκτιμήθηκε στο επίπεδο του 0.50 έως 0.55g (Hogan *et al.*, 1989).

3.1.3. Ο λόγος άνθρακα προς άζωτο C/N

Όπως είναι γνωστό, η μικροβιακή δραστηριότητα κατευθύνεται ευθέως στη σύνθεση βιομάζας, η οποία σε επίπεδο ξηρού βάρους περιέχει 50% C, 5% N και 0,5 έως 1,0% P (Alexander, 1977). Αναγκαία συνθήκη για την εκδήλωσή της είναι η διασφάλιση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών και ενεργειακών πηγών, η οποία όμως, για να γίνει και ικανή, θα πρέπει τα θρεπτικά στοιχεία να προσφέρονται σε ορισμένες μεταξύ τους αναλογίες.

Ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης για τη βίο-διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων είναι ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N), ο οποίος είναι ένας καθαρός αριθμός και διαμορφώνεται ανάλογα με τη σύσταση του υποστρώματος. Για την απρόσκοπτη πορεία της κομποστοποίησης, έχει εκτιμηθεί ότι ο λόγος C/N πρέπει να κυμαίνεται από 25 έως 40 (Goluenke, 1991). Όταν ο λόγος είναι σχετικά χαμηλός, ο άνθρακας αξιοποιείται πλήρως, ενώ το πλεονάζον άζωτο πιθανόν να χάνεται με τη μορφή αμμωνίας (NH₃-N), ενώ όταν ο λόγος λαμβάνει μεγάλες τιμές, το άζωτο μετατρέπεται σε περιοριστικό παράγοντα και η διαδικασία επιβραδύνεται (Sadaka and El-Taweel, 2003).

Συνήθως, ο λόγος C/N μειώνεται με την εξέλιξη της κομποστοποίησης (Golueke, 1972), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι είναι αμελητέες οι αναφορές για περιπτώσεις αύξησης (Morisaki *et al.*, 1989, Tiquia and Tam, 2000, Tiquia *et al.*, 2000). Οι απώλειες συνήθως, αποδίδονται σε εξαέρωση της αμμωνίας (NH₃). Έρευνα της Tiquia (1996) σχετικά με την κομποστοποίηση αποβλήτων από μονάδες ανάπτυξης χοίρων και πουλερικών, κατέδειξε ότι η ποσότητα του NH₄⁺-N συσχετίζεται θετικά με τη θερμοκρασία, την υγρασία, το pH και τον άνθρακα, ενώ η ποσότητα του αζώτου με τη μορφή ιόντων (NO_x⁻-N) συσχετίζεται αρνητικά με τους τέσσερις προαναφερθέντες παράγοντες. Από την ίδια εργασία φάνηκε ότι κατά την κομποστοποίηση λάσπης και αποβλήτων από μονάδες εκτροφής χοίρων και αποβλήτων από πτηνοτροφεία, ο λόγος C/N παίζει καθοριστικό ρόλο για τη χημική μορφή που θα έχει το άζωτο.

Γενικά, τα οργανικά οικιακά απορρίμματα, μετά το διαχωρισμό τους από τις ξένες προσμίξεις (γυαλί, μεταλλικά και συνθετικά υλικά), είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και φτωχά σε άζωτο. Για αυτό, προσφέρονται για ανάμιξη με αφυδατωμένη λάσπη από εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού, η οποία είναι πλούσια σε άζωτο.

3.1.4. Η οξύτητα του υποστρώματος

Το pH των οργανικών οικιακών αποβλήτων που έχουν διαχωριστεί στην πηγή, κυμαίνεται, ως επί το πλείστον, από 4,5 έως 6,0 (Eklind *et al.*, 1997). Η μεγάλη αυτή οξύτητα οφείλεται στην παρουσία οργανικών οξέων με μικρές αλυσίδες άνθρακα, όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ (Beck-Friis *et al.*, 2001). Τα δύο τελευταία, φαίνεται πως έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο, αφού έχουν ανιχνευθεί στο αρχικό υλικό, αλλά οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονται κατά την αρχική φάση της κομποστοποίησης (Nakasaki *et al.*, 1993). Η διαπίστωση ότι ανιχνεύονται οργανικά λιπαρά οξέα, όταν η οξύτητα είναι μεγάλη, τα οποία εκλείπουν όταν οι συνθήκες γίνουν αλκαλικές, ίσως υποδηλώνει ότι τα εν λόγω οξέα έχουν ρόλο κλειδί στη διαμόρφωση του pH (Beck-Friis *et al.*, 2003).

Στην αρχή της κομποστοποίησης, στο θερμόφιλο στάδιο, η μικροβιακή αμμωνιοποίηση ή αζωτοδέσμευση, προκαλεί αύξηση του pH έως το 8,0 ή το 8,5. Καθώς, όμως, αρχίζει η «αξιοποίηση» των εύκολα διαθέσιμων αζωτούχων ενώσεων, η ένταση της αμμωνιοποίησης ελαττώνεται και το pH επανέρχεται στο 7,0 έως το 8,0, μέσα σε χρονικό διάστημα μίας περίπου εβδομάδας (Miller, 1996). Υπό την προϋπόθεση ότι η πορεία της

κομποστοποίησης δεν θα εμποδιστεί, το pH του υποστρώματος θα ανέβει στην τιμή του 8,0 έως και του 9,0 (Sundberg *et al.*, 2004).

Εάν το pH του υποστρώματος λάβει τιμή κάτω του 6, μπορεί να σημειωθούν καθυστερήσεις στην απαρχή της κομποστοποίησης, οι οποίες δεν θα σημειώνονταν αν η διαδικασία είχε ήδη δρομολογηθεί. (Jeris and Regan, 1973). Αρκετοί ερευνητές που ασχολήθηκαν με συστήματα εργαστηριακής κλίμακας επισήμαναν στασιμότητα ή κατάρρευση της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη μετάβαση από τη μεσόφιλη στη θερμοφιλή φάση της κομποστοποίησης (Beck-Friis *et al.*, 2001; Day *et al.*, 1998) και παρατήρησαν ότι αυτό ταυτιζόταν χρονικά με την εμφάνιση χαμηλών τιμών του pH. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η αρχική φάση της κομποστοποίησης οικιακών οργανικών αποβλήτων, αναστέλλεται όταν το pH του υποστρώματος κατέβει κάτω από το 6,0 και η θερμοκρασία αγγίξει τους 46°C (Sundberg *et al.*, 2004). Στην ίδια αναφορά, επισημάνθηκε ότι η διαδικασία δεν εμποδίζεται αν το pH είναι κάτω του 6,0, αλλά το επίπεδο της θερμοκρασίας κυμαίνεται στους 36°C (Sundberg *et al.*, 2004). Για την ερμηνεία αυτής της παρατήρησης, έχουν προταθεί δύο υποθέσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, οι μικροοργανισμοί που δρουν σε αυτή τη φάση, μπορούν να ανεχθούν μία εκ των δύο ακραίων περιβαλλοντικών παραμέτρων, είτε την υψηλή θερμοκρασία είτε το χαμηλό pH, αλλά όχι και τις δύο ταυτόχρονα (Strom, 1985a). Ενώ, σύμφωνα με την άλλη, είναι πιθανόν να υπάρχουν δύο μικροβιακές κοινότητες: μία μεσόφιλη οξυάντοχη και μία θερμοφιλή οξύφοβη. Αυτό μπορεί να βρει θεωρητικό στήριγμα στο γεγονός ότι οι μύκητες, σε σύγκριση με τα βακτήρια, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα οξέα και μικρότερη στις θερμοκρασίες πάνω των 35 έως 40°C (Atlas and Bartha, 1981).

Σύμφωνα με τους Lei and VanderGheynst (2000), η δομή της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να αλλάξει με «διορθώσεις» στο pH. Δεν υπάρχουν, ωστόσο, ενδείξεις ότι μεταβάλλεται και ο ρυθμός της μεταβολικής δραστηριότητας, δεδομένου ότι δεν αλλάζει η κατανάλωση O₂.

3.1.5. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα αποτελεί δείκτη για την αλατότητα των κομποστ (Thompson *et al.*, 2002) και ως εκ τούτου παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή της χρήσης τους. Οι υψηλές τιμές της περιορίζουν τις εφαρμογές των κομποστ στις γεωργικές καλλιέργειες, αφού εμποδίζουν το ριζικό σύστημα να απορροφήσει νερό και ανόργανα στοιχεία από το εδαφικό περιβάλλον. Παρότι το αποδεκτό εύρος τιμών της διαμορφώνεται ανάλογα με το είδος των φυτών και τις καλλιεργητικές συνθήκες (Maas, 1986), η τιμή 4mS/cm έχει οριστεί ως ανώτατο όριο εφαρμογής (Μανιός και Μανιαδάκης, 2001).

Δυσχέρειες φαίνεται να παρουσιάζει η σύγκριση των τιμών αγωγιμότητας που έχουν δημοσιευθεί κατά καιρούς από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, διότι δεν χρησιμοποιείται ένα κοινό πρωτόκολλο για την προετοιμασία των δειγμάτων. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρουν οι VanderGheynst *et al.* (2004), επιβάλλεται να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ των

σύγχρονων μεθόδων μέτρησης και να προταθεί ένα μοντέλο που να κάνει συγκρίσιμες τις μετρήσεις που έχουν ληφθεί σε διαφορετικά εκχυλίσματα.

Όσον αφορά στη διακύμανση των τιμών της αγωγιμότητας κατά την εξέλιξη της κομποστοποίησης, οι Paredes *et al.* (2000) και Garcia *et al.* (1996), αναφέρουν ότι η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενδέχεται να αυξηθεί λόγω της διάσπασης των οργανικών συστατικών -κυρίως των πρωτεϊνών- σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Από την άλλη πλευρά, οι Reinikainen and Herranen (2001), κατά την παρακολούθηση μίγματος από βίο-απόβλητα και ιλύ βιολογικού καθαρισμού, παρατήρησαν αρχικά πτώση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και έπειτα σταθεροποίησή της. Οι δύο αυτές διαμετρικά αντίθετες διαπιστώσεις, συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι οι τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας δεν ακολουθούν ένα συγκεκριμένο πρότυπο (Lasaridi and Stendiford, 1996).

3.1.6. Τα πτητικά στερεά

Η περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε πτητικά στερεά, χρησιμοποιείται συχνά ως μέτρο εκτίμησης της οργανικής ύλης (APHA, 1992). Και αυτό, διότι στις συνθήκες που υποβάλλονται τα δείγματα προκειμένου να μετρηθούν τα πτητικά στερεά (δηλαδή στους 550°C), σχεδόν το σύνολο των παραγόμενων οξειδωμένων πτητικών ενώσεων (>99% του ολικού βάρους) προέρχεται από οργανικές ενώσεις. Το ποσοστό των πτητικών ενώσεων που σχηματίζεται από τις ανόργανες ενώσεις είναι μικρότερο από το 1% του συνολικού βάρους οπότε θεωρείται αμελητέο.

Δεδομένου ότι η εξέλιξη της κομποστοποίησης σχετίζεται με το βαθμό αποσύνθεσης του αρχικού οργανικού υλικού, τα πτητικά στερεά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης της βίο-αποικοδόμησης. Στην Αμερική χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του βαθμού ωρίμανσης των υπό κομποστοποίηση αστικών στερεών αποβλήτων (Zimmerman, 1991). Στην Ευρώπη δεν συμπεριλαμβάνεται ακόμη στα κριτήρια ωρίμανσης των κομποστ (ORCA, 1992).

Πιο αντιπροσωπευτικός δείκτης για το βαθμό βίο-αποικοδόμησης θεωρείται η μείωση των πτητικών στερεών σε σχέση με την περιεκτικότητα του αρχικού υλικού. Ο υπολογισμός της (δες τύπο 7.4.1. στην § 7.4.), γίνεται με την παραδοχή ότι η περιεκτικότητα σε τέφρα παραμένει σταθερή κατά την εξέλιξη της κομποστοποίησης.

3.1.7. Η περιεκτικότητα σε οξυγόνο

Παρότι ο βαθμός συνεισφοράς των αναερόβιων μικροοργανισμών στην κομποστοποίηση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, είναι γενικά αποδεκτό ότι είναι ασθενέστερος από εκείνον των αερόβιων μικροοργανισμών. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί επωμίζονται το μεγαλύτερο μέρος της κομποστοποίησης, με αποτέλεσμα η έλλειψη οξυγόνου να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα και να γίνεται συχνά αιτία για αποτυχίες ή αστοχίες των συστημάτων κομποστοποίησης (Gray *et al.*, 1971).

Η συγκέντρωση του υποστρώματος σε μοριακό οξυγόνο (O_2) καθορίζεται από τον εκάστοτε ρυθμό διάχυσης και το μικροβιακό μεταβολισμό (Miller, 1996). Ο ρυθμός διάχυσης εξαρτάται από τον τρόπο που διανέμονται οι συγκεντρώσεις των αερίων, καθώς και από την αντίσταση στην κυκλοφορία τους, η οποία –με τη σειρά της– συναρτάται από το πορώδες του υποστρώματος (μέγεθος και επικοινωνία των πόρων) και από το φιλμ του νερού πάνω στα συσσωματώματα.

Η παθητική διάχυση μεταξύ των πόρων πραγματοποιείται τόσο αργά, που δεν είναι ικανή να τροφοδοτήσει με την απαραίτητη ποσότητα οξυγόνου τη μάζα του υποστρώματος που υφίσταται κομποστοποίηση. Γι αυτό, επιχειρείται βελτίωση των συνθηκών που οδηγούν στην παθητική διάχυση καθώς και προσφορά οξυγόνου είτε με ανάδευση του υποστρώματος, είτε με την ενεργοποίηση κάποιου δυναμικού συστήματος αερισμού.

Οι εκτιμήσεις των ερευνητών σχετικά με το ποσοστό του οξυγόνου, που πρέπει να υπάρχει στο πορώδες, ώστε να ορίζονται οι κατάλληλες αερόβιες συνθήκες, διαφέρουν. Ορισμένοι δέχονται ως ικανοποιητικό το 5% (Parr *et al.*, 1978, Wilson *et al.*, 1980) ή το 10% (Suler and Finstein, 1977), ενώ άλλοι ανεβάζουν τον πήχη σε 12 και 14% (Harper *et al.*, 1992, Miller *et al.*, 1990).

3.1.8. Αναερόβιες συνθήκες

Όπως ακριβώς συμβαίνει και στο έδαφος (Foster, 1988), στα υπό κομποστοποίηση οργανικά υποστρώματα είναι πιθανόν είτε να συνυπάρχουν αερόβια και αναερόβια μικροπεριβάλλοντα, το ένα κοντά στο άλλο, είτε να υπάρχουν μεγαλύτερες ζώνες με αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Miller *et al.*, 1989). Έτσι, ακόμη και όταν η παρουσία οξυγόνου στους πόρους του υποστρώματος είναι αποδεδειγμένη, ενδέχεται να ανιχνευθούν προϊόντα αναερόβιου μεταβολισμού, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) και το μεθάνιο (CH_4) (Beck-Friis *et al.*, 2000, Hellebrand, 1998, Hellmann *et al.*, 1997, Schattner-Schmidt *et al.*, 1995). Το ύψος των εν λόγω εκπομπών επηρεάζεται από τις διαστάσεις (Beck-Friis *et al.*, 2000) και την πυκνότητα (Sommer and Moller, 2000) του σωρού, καθώς και από το αρχικό υλικό (He *et al.*, 2000). Έχει υπολογιστεί ότι το CH_4 που απελευθερώνεται από τις 600 μονάδες κομποστοποίησης στερεών αποβλήτων, που λειτουργούν (κατά τη συγγραφή της συγκεκριμένης αναφοράς) στη Γερμανία, αντιστοιχεί στο 0,31 έως 0,44% των ολικών εκπομπών CH_4 της χώρας αυτής (Jäckel *et al.*, 2005). Θέμα που χρήζει και άλλης διερεύνησης, αποτελεί ο κύκλος του CH_4 στο μικροπεριβάλλον του κομποστ. Οι Jäckel *et al.* (2005) επιβεβαίωσαν τη δραστηριότητα θερμόφιλων μικροοργανισμών που παράγουν CH_4 καθώς και άλλων –επίσης θερμόφιλων– που οξειδώνουν το CH_4 . Όπως εκτίμησαν, εξετάζοντας σωρούς διαφορετικών βαθμών αποικοδόμησης, το 46 έως 98% του παραγόμενου CH_4 οξειδώνεται από μεθανότροφα θερμόφιλα βακτήρια πριν απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα.

Στην παραγωγή μανιταριών θεωρείται ότι ένα ποσοστό αναερόβιας δραστηριότητας στα αρχικά στάδια της κομποστοποίησης, μπορεί να αποβεί χρήσιμο στη βελτίωση της ποιότητας του κομποστ (Van Griensven, 1988).

3.1.9. Απώλειες σε άζωτο

Οι Kirchmann και Widén (1994), υπολόγισαν ότι το 51% του ολικού αζώτου που υπήρχε σε οργανικά οικιακά απόβλητα χάθηκε τις πρώτες 168 ημέρες της κομποστοποίησης, κάτω από θερμοφιλικές –κυρίως– συνθήκες. Ένα αξιοσημείωτο ποσό του αζώτου του υποστρώματος εξαερώνεται με τη μορφή NH_4 και N_2O . Σύμφωνα με τους Beck-Friis *et al.* (2001), κατά την κομποστοποίηση οικιακών οργανικών αποβλήτων σε κλειστό σύστημα, περισσότερο από το 98% από τις συνολικές απώλειες αζώτου, ήταν $\text{NH}_3\text{-N}$ και λιγότερο από το 2% $\text{NO}_x\text{-N}$.

Το $\text{NH}_4^+\text{-N}$ χάνεται κατά την κομποστοποίηση με δύο τρόπους: με την εξαέρωση της αμμωνίας και με την απονιτροποίηση που προκαλούν παράγοντες όπως ο αερισμός, το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία και ο λόγος C/N του αρχικού υλικού (Tiquia, and Tam, 2000). Όπως συμβαίνει με τη νιτροποίηση, έτσι και στην απονιτροποίηση καταλυτικό ρόλο παίζουν οι ενζυμικοί μηχανισμοί συγκεκριμένων μικροοργανισμών, θέμα που αναλύεται εκτενέστερα στην παράγραφο 4.1.1. Προβλέψεις σχετικά με το ποσό της αμμωνίας που θα απελευθερωθεί μπορεί να γίνουν βάσει του λόγου C/N (Witter and Lopez-Real, 1987). Οι Beck-Friis *et al.* (2001), αναφέρουν ότι υπάρχουν κενά στην κατανόηση του τρόπου που επιδρά η θερμοκρασία του υποστρώματος στην απελευθέρωση NH_4 .

Το παραγόμενο N_2O που έχει μετρηθεί σε σωρούς οργανικών οικιακών αποβλήτων και κοπριάς (Beck-Friis *et al.*, 2000, Hellman *et al.*, 1997), μπορεί σύμφωνα με τους Firestone και Davidson (1989), να είναι προϊόν νιτροποίησης ή ατελούς απονιτροποίησης. Ωστόσο, η νιτροποίηση παρακωλύεται από θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40°C και χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Focht and Verstraete, 1977), ενώ η απονιτροποίηση σημειώνεται κατά τη διάρκεια μεσόφιλων και θερμοφίλων συνθηκών και αναστέλλεται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων O_2 (Knowles, 1982). Οι Beck-Friis *et al.* (2001) και Hellebrand (1998), ισχυρίζονται ότι κατά την κομποστοποίηση οικιακών οργανικών αλλά και «πράσινων» αποβλήτων, περίπου το 0.5% του N χάνεται με τη μορφή N_2O . Οι Yaowu *et al.* (2001) ανίχνευσαν N_2O προς το τέλος της κομποστοποίησης, στο στάδιο που μειώνεται η θερμοκρασία. Η αποσαφήνιση της παραγωγής N_2O , συγκεντρώνει περιβαλλοντικό ενδιαφέρον, δεδομένου ότι το N_2O προσδιορίζεται ως ένα από τα αέρια που συμβάλλουν στην αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη (Beck *et al.*, 2001). Έχει εκτιμηθεί ότι είναι 270 φορές πιο ισχυρό από το CO_2 στο να παγιδεύει την υπέρυθη ακτινοβολία στην τροπόσφαιρα (US EPA, 2002).

4

Αυτοοικολογική προσέγγιση**4.1. Ολικά βακτήρια**

Στον Πίνακα 4.1. παρουσιάζονται ορισμένα από τα βακτήρια που έχουν ανιχνευτεί σε υποστρώματα κομποστοποίησης.

Τα βακτήρια αναγνωρίζονται από την επιστημονική κοινότητα ως οι πιο αποτελεσματικοί και δραστικοί μικροοργανισμοί στα πρώτα στάδια της κομποστοποίησης. Η κυρίαρχη αυτή παρουσία τους μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι πολλαπλασιάζονται γρήγορα, σε οργανικά υποστρώματα ποικίλης σύνθεσης και διαθεσιμότητας, καθώς και στο ότι αρκετά από αυτά μπορεί να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Πίνακας 4.1.

Βακτήρια (εξαιρουμένων των ακτινοβακτηρίων), τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε υποστρώματα κομποστοποίησης (προσαρμογή από Miller, 1996).

Βακτήρια	Βιβλιογραφικές αναφορές
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Corominas <i>et al.</i> (1987)
<i>Bacillus brevis</i>	Strom (1985β), Brinton and Droffner (1994)
<i>B. coagulans</i> τύπος A	Strom (1985α, β)
<i>B. coagulans</i> τύπος B	Rothbaum and Dye (1964), Strom (1985α, β)
<i>B. megaterium</i>	Corominas <i>et al.</i> (1987)
<i>B. licheniformis</i>	Gregory <i>et al.</i> (1963), Okafor (1966), Strom (1985α, β)
<i>B. pumilus</i>	Corominas <i>et al.</i> (1987)
<i>B. sphaericus</i>	Rothbaum and Dye (1964), Strom (1985α, β), Brinton and Droffner (1994)
<i>B.stearothermophilus</i>	Rothbaum and Dye (1964), Hayes (1968), Fermor <i>et al.</i> (1979), Strom (1985α, β)
<i>B.subtilis</i>	Hayes (1968), Fermor <i>et al.</i> (1979)
<i>Clostridium</i> sp.	Waksman and Cordon (1939)
<i>Escherichia coli</i>	Brinton and Droffner (1994)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Macauley <i>et al.</i> (1993)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Hayes (1968), Stanek (1971), Fermor <i>et al.</i> (1979),
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brinton and Droffner (1994)
<i>Serratia</i> sp.	Macauley <i>et al.</i> (1993)
<i>Thermus</i> sp.	Fujio and Kume (1991)

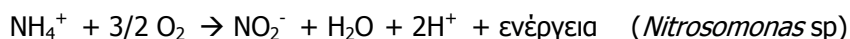
Στο αρχικό στάδιο της κομποστοποίησης, κατά τη μεταβατική φάση όπου οι θερμοκρασίες αυξάνονται από την τιμή θερμοκρασίας του περιβάλλοντος προς το επίπεδο της θερμοφιλης φάσης, κυριαρχούν τα μεσόφιλα βακτήρια, τα οποία διασπούν τις εύκολα διαθέσιμες οργανικές ενώσεις. Όταν η θερμοκρασία φτάσει περίπου στους 45°C τα μεσόφιλα σταδιακά θανατώνονται ή αδρανοποιούνται και τα διαδέχονται οι θερμοφιλοι πληθυσμοί (Miller, 1996).

Στα συστήματα κομποστοποίησης στα οποία δεν έχει προβλεφθεί η συγκράτηση της θερμοκρασίας έως ένα συγκεκριμένο επίπεδο, οι θερμοκρασίες μπορεί να φτάσουν έως και 80°C (Finstain *et al.*, 1987). Αυτό το ύψος τιμών μπορεί να εκληφθεί ως εκλεκτικό για τα θερμοφιλα βακτήρια και ιδιαίτερα του γένους *Bacillus* (Hayes, 1968). Σε θερμοκρασίες άνω των 65°C, η ποικιλότητα των μικροβιακών πληθυσμών σχεδόν εξαλείφεται, ώστε να γίνεται λόγος για καθαρές καλλιέργειες του *B. stearrowthermophilus* (Strom, 1985β).

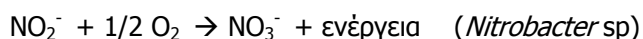
Καθώς η κομποστοποίηση εξελίσσεται, ο ρόλος των θερμοφιλων βακτηρίων αποκτά μεγαλύτερη σημασία, αφού αποτελούν την πιο πρόσφορη ομάδα εφαρμογής χειρισμών για τη συνολικότερη διαχείριση του συστήματος. Επιβιώνουν σε μεγάλες θερμοκρασίες, οι οποίες αποτελούν πρωταρχικό στόχο των διαχειριστών των συστημάτων κομποστοποίησης, προκειμένου να καταστραφούν τα παθογόνα. Η σταθεροποίηση των αποβλήτων από τα βακτήρια μπορεί να πραγματοποιηθεί γρήγορα, με το μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης να σημειώνεται την πρώτη εβδομάδα της κομποστοποίησης (Harper *et al.*, 1992).

4.1.1. Βακτήρια που χρησιμοποιούν τα ιόντα του αζώτου στην αναπνευστική τους λειτουργία

Η νιτροποίηση των αμμωνιακών ιόντων πραγματοποιείται σε δύο στάδια, καθένα από τα οποία ελέγχεται/ καταλύεται από τα ενζυμικά συστήματα των αερόβιων χημειολιθότροφων βακτηρίων *Nitrosomonas* sp και *Nitrobacter* sp., τα οποία έχει καθιερωθεί να ονομάζονται νιτροποιητικά. Σε πρώτο στάδιο, με τη δράση των *Nitrosomonas* sp., το αμμωνιακό ιόν οξειδώνεται πλήρως σε νιτρώδες σύμφωνα με την εξεργονική αντίδραση:



Σε δεύτερο στάδιο, το νιτρώδες ιόν, με την αναπνευστική οδό του *Nitrobacter* sp., οξειδώνεται σε νιτρικό, σύμφωνα με την εξεργονική αντίδραση:



Οι προτάσεις σχετικά με τη βέλτιστη για τη νιτροποίηση θερμοκρασία διαφέρουν. Για παράδειγμα, από τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων ερευνών, έχουν προταθεί θερμοκρασίες από 15 έως 35°C, από 25 έως 30°C και από 25 έως 35°C (Körner and Stegmann, 1996). Η ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης ελέγχεται από τη διαθεσιμότητα του μοριακού οξυγόνου, ενώ το βέλτιστο pH αγγίζει το 8,5, αλλά το κάθε στάδιο σημειώνει άλλο βέλτιστο (για την οξείδωση της αμμωνίας από 7,5 έως 9,5 και για την οξείδωση των νιτρώδων ιόντων από 5,5 έως 10,5) (Körner, and Stegmann, 1996).

Εκτός από τα νιτροποιητικά βακτήρια, υπάρχουν αναφορές ότι και ορισμένοι ετερότροφοι μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια και ακτινοβακτήρια) μπορούν επίσης να οξειδώσουν τα αμμωνιακά ιόντα σε νιτρώδη και νιτρικά (Wild, 1988).

Σε αναερόβιες συνθήκες ορισμένα δυνητικά αναερόβια –και ως επί το πλείστον ετερότροφα– βακτήρια, όπως τα *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp. και *Achromobacter* sp (Körner and Stegmann, 1996) χρησιμοποιούν ως δέκτες ηλεκτρονίων στην αναπνευστική τους οδό τα νιτρικά ιόντα, οπότε απελευθερώνουν άζωτο με τη μορφή αερίων, N_2 , NO_2 και N_2O , τα οποία διαφεύγουν στην ατμόσφαιρα, μια διαδικασία η οποία αναφέρεται ως απονιτροποίηση. Επιπλέον, η απονιτροποίηση συμβαίνει και σε χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 , όταν υπάρχει διαθέσιμος άνθρακας και νιτρικά ιόντα (Bishop and Godfrey, 1983). Γενικά, για να πραγματοποιηθεί απονιτροποίηση, πρέπει η συγκέντρωση του οξυγόνου να είναι χαμηλότερη από 5%, γιατί οι υψηλότερες τιμές καταστέλλουν τα ένζυμα των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών. Η διεργασία ξεκινάει στους 5°C και ο ρυθμός της αυξάνεται αναλογικά με τη θερμοκρασία. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι από 18 έως 30°C, ενώ το βέλτιστο pH κυμαίνεται από 6,0 έως 7,0 (Körner and Stegmann, 1996).

Η Tiquia (1996) βρήκε ότι ο μικροβιακός «μετασχηματισμός» του αζώτου κατά την κομποστοποίηση ποικίλει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του αρχικού υλικού. Επιπλέον, επηρεάζεται από την μικροβιακή κοινότητα, καθώς και τις φυσικές και χημικές παραμέτρους της κομποστοποίησης, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η οξύτητα και ο λόγος C/N.

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται, κατά κύριο λόγο, στα προχωρημένα από άποψη χρόνου στάδια της κομποστοποίησης (Mathur *et al.*, 1993). Γι αυτό και η μείωση του αμμωνιακού αζώτου που ενδέχεται να παρατηρηθεί κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης και η οποία συνοδεύεται από αύξηση του αζώτου σε νιτρική μορφή, συχνά εκλαμβάνεται ή προτείνεται ως δείκτης ωριμότητας του κομποστ (Canet and Pomares, 1995, Kapetanios *et al.*, 1993, Pare *et al.*, 1998).

4.1.2. Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην αμμωνιοποίηση

Η αμμωνιοποίηση είναι ουσιαστικά η αναγωγή του αζώτου σε αμμωνία. Οι μικροοργανισμοί που καταλύουν την αμμωνιοποίηση μπορούν να προσαρμοστούν σε όλες σχεδόν τις συνθήκες της κομποστοποίησης. Πραγματοποιείται σε πολλά στάδια, με τη δράση διαφορετικών μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: ανάγουν το μοριακό άζωτο με τον ίδιο ενζυμικό μηχανισμό, τη νιτρογενάση (Διαμαντίδης, 1994). Στο πρώτο στάδιο της αμμωνιοποίησης, πραγματοποιείται πρωτεόλυση, οπότε οι πρωτεΐνες διασπώνται σταδιακά σε πολυπεπτίδια, ολιγοπεπτίδια και –τέλος– αμινοξέα. Οι αντιδράσεις καταλύονται από μικροβιακές πρωτεάσες (Moriyama and Kohei, 1992). Στο επόμενο στάδιο, ακολουθεί οξειδωτική απαμίνωση, η οποία οδηγεί στην παραγωγή αμμωνίας, υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξέων. Πεδίο για περαιτέρω διερεύνηση αποτελεί η σχέση της αμμωνιοποίησης και της απελευθέρωσης αμμωνίας προς το περιβάλλον με τη θερμοκρασία. Λέγεται ότι η

αμμωνιοποίηση συμβαίνει εντονότερα όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται από 40 έως 50°C (Ross and Harris, 1982), αλλά ότι η μεγαλύτερη διατήρηση αμμωνιακού αζώτου σημειώνεται μεταξύ 50 και 55°C (Burrows, 1951).

4.2. Ακτινοβακτήρια

Παρόλο που τα ακτινοβακτήρια ανήκουν στα βακτήρια, εξετάζονται συνήθως ξεχωριστά λόγω των ιδιαίτερων οικολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και του διαφορετικού ρόλου που παίζουν στη βιο-αποικοδόμηση. Στον Πίνακα 4.2. παρέχονται τα είδη των ακτινοβακτηρίων που έχουν ανιχνευτεί σε υποστρώματα κομποστοποίησης, καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές τους.

Πίνακας 4.2.

Ακτινοβακτήρια, τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε υποστρώματα κομποστοποίησης
(προσαρμογή από Miller, 1996).

Βακτήρια	Βιβλιογραφικές αναφορές
<i>Actinobifida chromogena</i>	Fergus (1964), Lacey (1973)
<i>Micropolyspora faeni</i>	Fergus (1971), Gregory <i>et al.</i> (1963), Lacey (1973)
<i>Nocardia</i> sp.	Lacey (1973), Wood (1984)
<i>Pseudocardia thermophila</i>	Fergus (1971)
<i>Streptomyces rectus</i>	Fergus (1971), Hayes (1968), Stanek (1971),
<i>S. thermofuscus</i>	Makawi (1980)
<i>S. thermoviolaceus</i>	Fergus (1971), Stanek (1971)
<i>S. thermovulgaris</i>	Fergus (1964), Hayes (1968), Stanek (1971), Fermor <i>et al.</i> (1979)
<i>S. violaceus-ruber</i>	Fergus (1971)
<i>Streptomyces</i> sp.	Norman (1930), Waksman <i>et. al.</i> (1939), Tendler and Burkholder (1961), Lacey (1973), Wood (1984)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Waksman <i>et. al.</i> (1939), Forsyth and Webley (1948), Gregory <i>et al.</i> (1963), Fergus (1971), Lacey (1973), Fermor <i>et al.</i> (1979)
<i>T. sacchari</i>	Lacey (1973), Makawi (1980)
<i>Thermomonospora curvata</i>	Fergus (1971), Stanek (1971), Stutzenberger (1971)
<i>T. viridis</i>	Fergus (1971), Lacey (1973), Fermor <i>et al.</i> (1979)
<i>Thermomonospora</i> sp.	Lacey (1971)

Τα ακτινοβακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε αερόβια και υγρά περιβάλλοντα, με ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό pH (Chen and Griffin, 1966, Lacey, 1973), γεγονός που τους δημιουργεί ανταγωνιστικό μειονέκτημα όταν η πυκνότητα των διαθέσιμων υποστρωμάτων

είναι υψηλή (Miller, 1996). Αν και έχουν αναφερθεί είδη που αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες, τα ακτινοβακτήρια παρουσιάζουν έντονη ανάπτυξη στα τελευταία στάδια της κομποστοποίησης (Joshua *et al.*, 1994).

Σύμφωνα με τους MaCauley *et al.* (1993), η αναλογία των ακτινοβακτηρίων προς τα υπόλοιπα βακτήρια, σε κομπόστ μανιταριών, είναι ενδεικτική της ποιότητας. Στον ίδιο άξονα απόψεων, ο Miller (1996) προτείνει την αποδοχή της συγκεκριμένης αναλογίας, ως δείκτη ωρίμανσης των κομπόστ στερεών αστικών αποβλήτων. Όπως, αναφέρει μεγάλοι πληθυσμοί ακτινοβακτηρίων αναμένονται σε υποστρώματα που έχουν ήδη υποστεί ως ένα βαθμό βιο-αποικοδόμηση και πλέον δεν διαθέτουν άμεσα διαθέσιμα συστατικά. Και συμπληρώνει, ότι είναι πιθανόν ο σχηματισμός μεγάλων πληθυσμών ακτινοβακτηρίων να προετοιμάζει το έδαφος για τον μετέπειτα αποικισμό των μυκήτων.

4.3. Μύκητες

Αναφορά στους μύκητες που, συνήθως, εντοπίζονται σε υποστρώματα κομποστοποίησης γίνεται στον πίνακα 4.3.

Οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι μύκητες ανήκουν στα γένη *Penicillium* και *Aspergillus*. Σε εργασία των Straatsma *et al.* (1994), σχετικά με την κομποστοποίηση υποστρώματος για την καλλιέργεια μανιταριών, παρατηρήθηκε μεγάλη ανάπτυξη διαφορετικών μυκήτων σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία. Η εργασία τους δείχνει τη διαδοχική ανάπτυξη των πληθυσμών, κατά την οποία η ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών, όπως ο *Scyatalidium thermophilum*, μπορεί να είναι εκλεκτική για την ανάπτυξη των ειδών που θα τους διαδεχτούν (όπως ο *Agaricus brunnescens*).

Το 1979, οι Fermor *et al.* είχαν αναφέρει ότι κατά το θερμοφιλο στάδιο της κομποστοποίησης η θερμοκρασία ανεβαίνει πάνω από τους 55°C και αυτό αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκήτων. Ο Brock (1978) είχε αναφέρει ότι η πλειονότητα των μυκήτων δεν μπορεί να αναπτυχθεί στους 50°C και ότι ελάχιστοι μπορούν να αναπτυχθούν – και αυτό καχεκτικά- στους 62°C. Στις ίδιες συμπερασματικές γραμμές, οδηγήθηκαν και οι Kane and Mullins (1973) και Ryskeboer *et al.* (2003), οι οποίοι ισχυρίστηκαν ότι δεν υπάρχει δράση μυκήτων στο θερμοφιλο στάδιο της κομποστοποίησης.

Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί των μυκήτων επανακάμπουν στα υποστρώματα της κομποστοποίησης, όταν η θερμοκρασία πέφτει και οι ενώσεις που κυριαρχούν είναι η κυτταρίνη και η λιγνίνη (Chang and Hudson, 1967; Fergus and Sinden, 1969; De Bertoldi *et al.*, 1983; Ryskeboer *et al.* 2003). Οι μύκητες έχουν την ιδιότητα να μεταβολίζουν σύμπλοκα πολυμερών, συμπεριλαμβανομένης της λιγνίνης αλλά και μη φυσικών οργανικών ενώσεων (Miller, 1996). Για παράδειγμα, ο *Phanerochaete chrysosporium*, ο οποίος αναπτύσσεται καλύτερα στους 39°C (Kerem *et al.*, 1992) και εξετάζεται ως προς την ιδιότητά του να διασπά πολλά διαφορετικά πολύπλοκα απόβλητα (Aust and Benson, 1993).

Πίνακας 4.3

Μύκητες που ανιχνεύονται σε υποστρώματα κομποστοποίησης
(προσαρμογή από Miller, 1996).

	Μύκητες	Βιβλιογραφικές αναφορές
Ζυγομύκητες	<i>Absidia corymbifera</i>	Chang and Hudson (1967), Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>A. ramosa</i>	Chang (1967), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Absidia</i> sp.	Gregory <i>et al.</i> (1963)
	<i>Mortierella turficola</i>	Hayes (1968)
	<i>Mucor miehei</i>	Cooney and Emerson (1964), Festenstein <i>et al.</i> (1965)
	<i>M. pusillus</i>	Cooney and Emerson (1964), Fergus (1964), Festenstein <i>et al.</i> (1965), Okafor (1966), Chang and Hudson (1967), Hayes (1968), Kane and Mullins (1973), Fermor <i>et al.</i> (1979), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Rhizomucor</i> sp.	Okafor (1966)
Ασκομύκητες	<i>Allescheria terrestris</i>	De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Fergus (1964), Chang and Hudson (1967), Kane and Mullins (1973), Fermor <i>et al.</i> (1979), Tansey (1981), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Dactylomyces crustaceus</i>	Kane and Mullins (1973)
	<i>Emericella nidulans</i>	Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>Myriococcum albomyces</i>	Cooney and Emerson (1964)
	<i>Talaromyces dupontii</i>	Fergus (1964), Chang and Hudson (1967), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>T. emersonii</i>	Tansey (1981), Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>T. thermophilus</i>	Tansey (1981), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Stutzenberger (1971), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>T. crustaceus</i>	Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>Corynascus thermophilus</i>	Hedger and Hudson (1970), Straatsma <i>et al.</i> (1994)
<i>Thielavia terrestris</i>	Fergus and Sinden (1969), Samson <i>et al.</i> (1977)	
Βασιδιομύκητες	<i>Coprinus lagopus</i>	Cooney and Emerson (1964)
	<i>Coprinus</i> sp.	Cooney and Emerson (1964), Chang and Hudson (1967)
	<i>C. cinereus</i>	Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>Lenzites</i> sp.	De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
Δεθτερομύκητες	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Carlyle and Norman (1941), Fergus (1964), Gregory <i>et al.</i> (1963), Hayes (1968), Stutzenberger (1971), Millner <i>et al.</i> (1 Hayes (1968), 977), Fermor <i>et al.</i> (1979), Tansey (1981), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Humicola grisea</i>	Fergus (1964), Hayes (1968), Fermor <i>et al.</i> (1979), Tansey (1981)
	<i>H. insolens</i>	Fergus (1964), Chang and Hudson (1967), Hayes (1968), Fermor <i>et al.</i> (1979), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>H. lanuginosa</i>	Gregory <i>et al.</i> (1963), Fergus (1964), Festenstein <i>et al.</i> (1965), Okafor (1966), Chang and Hudson (1967), Kane and Mullins (1973), Millner <i>et al.</i> (1977), Tansey (1981), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Paecilomyces variotii</i>	Straatsma <i>et al.</i> (1994)
	<i>Sporotrichum thermophile</i>	Chang and Hudson (1967), Hedger and Hudson (1970), De Bertoldi <i>et al.</i> (1983)
	<i>Malbranchea pulchella</i>	Cooney and Emerson (1964), Chang and Hudson (1967)
	<i>Scytalidium thermophilum</i>	De Bertoldi <i>et al.</i> (1983), Straatsma <i>et al.</i> (1994), Ross and Harris (1983)

Πρόσφατα, οι Hansgate *et al.* (2005), προσπάθησαν να διερευνήσουν την υπόθεση ότι οι μύκητες έχουν σημαντικό ρόλο τις πρώτες μέρες της κομποστοποίησης, ώστε να διαμορφωθεί καλύτερα η εικόνα της μικροβιακής διαδοχής. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι κατά τις πρώτες 96h της κομποστοποίησης, υπήρχε παρουσία μυκήτων. Δεν κατέστη, ωστόσο, δυνατό να αποσαφηνίσουν εάν οι πληθυσμοί των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν ενεργοί ή αν εντόπισαν γονιδιωματικό (genomic) DNA από λανθάνοντα κύτταρα. Βρήκαν, ωστόσο, παρουσία μυκήτων που παράγουν γαλακτικό οξύ, όπως το *Rhizopus* sp. και το *Amylomyces* sp., γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση του Schloss (2002) ότι ορισμένοι μύκητες συμβάλλουν στη διαμόρφωση του pH.

4.4. Δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί και δείκτες παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων

Η αξιοποίηση των οργανικών αποβλήτων αποτελεί μία ανακουφιστική προοπτική για το περιβάλλον. Ωστόσο, δεν πρέπει να αγνοηθεί η ποικιλία των παθογόνων που ενδέχεται να φέρουν τα ανεπεξέργαστα απόβλητα. Γι' αυτό ακριβώς, είναι αναγκαίο να διασφαλιστεί ότι με την κομποστοποίησή τους, τα παθογόνα θα αδρανοποιηθούν. Τα κυριότερα παθογόνα ανήκουν στις κατηγορίες των μυκήτων, των βακτηρίων, των ιών και των παρασίτων. Μπορεί δε να είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, τα ζώα ή και για τα φυτά.

Ο ρόλος των δυνητικών παθογόνων στη διαδικασία της κομποστοποίησης θίχθηκε το 1993 από τον Farrell. Η υπόθεση ότι μικροοργανισμοί, όπως το *Listeria* sp. και το *Salmonella* sp. μπορούν να έχουν σημαντικό ρόλο στην κομποστοποίηση, υποδηλώνει ότι ίσως να μην αποτελούν μονάχα πρόβλημα, αλλά ενδεχομένως να αποικίζουν σε σημαντικό βαθμό το κομπόστ.

Αναφορικά με τα παθογόνα του ανθρώπου, κυρίαρχες παρουσίες είναι το *Salmonella* sp., το οποίο μεταφέρεται στα οργανικά οικιακά απόβλητα μέσω των αποβλήτων της κουζίνας (Strauch, 1996), το *Yersinia enterocolitica* και το *Escherichia coli* (Golstein *et al.*, 1988). Τα περισσότερα από αυτά τα παθογόνα προέρχονται από τα ζώα (Strauch, 1996). Δεδομένου ότι εξαιρούνται τα κρέατα, τα κόκαλα και τα ψάρια, οι ζωικοί ιοί δεν εξετάζονται στην κομποστοποίηση των οικιακών οργανικών αποβλήτων. Εξάλλου, οι ιοί δεν επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα έξω από ζωντανά κύτταρα.

Ένας ακόμη παράγοντας που πρέπει να εκτιμηθεί είναι η ασφάλεια των εργαζομένων σε μονάδες κομποστοποίησης. Συνήθως, ο λόγος γίνεται για την κομποστοποίηση αστικών αποβλήτων, όμως ίσως πρέπει να ελεγχθούν και τα αλλεργιογόνα τα οποία υπάρχουν και στο κομπόστ που παράγεται από οικιακά οργανικά απόβλητα.

Για τον έλεγχο των παθογόνων, τα πρωτόκολλα διαχείρισης συστημάτων κομποστοποίησης προβλέπουν θερμοκρασίες πάνω από 55°C. Ωστόσο, το 1994, οι Brinton και Droffner ανέφεραν ότι ένας αξιοσημείωτος αριθμός παθογόνων βακτηρίων μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί στις υψηλές θερμοκρασίες του θερμόφιλου σταδίου, που άλλοτε θεωρούνταν καταστροφικές για τα παθογόνα. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι σε κομπόστ

τα οποία δεν έχουν σταθεροποιηθεί επαρκώς, τα εναπομείναντα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία αρκούν για να επανακάμψουν οι πληθυσμοί του *Salmonella* sp. (Burge *et al.*, 1987). Εικάζεται ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροβιακών ειδών μπορεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την τύχη των παθογόνων, ωστόσο το θέμα χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση (Miller, 1996).

Το *Escherichia coli* είναι ένα παθογόνο, το οποίο συχνά κρύβεται πίσω από γαστρεντερίτιδες. Η κομποστοποίηση των ζωικών κοπράνων έχει υποδειχθεί από αρκετές ερευνητικές εργασίες ως αποτελεσματική μέθοδος καταστροφής του. Ερευνητές του Πανεπιστημίου της Φλόριδας, πειραματίστηκαν με λιγότερο από 1kg κοπριάς σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες και βρήκαν ότι ο πληθυσμός *E. coli* εξαλείφθηκε μετά από κομποστοποίηση 72h στους 47°C (Lung *et al.*, 2001). Άλλοι ερευνητές, που πειραματίστηκαν με κοπριά με μεγαλύτερους πληθυσμούς *E. coli*, της τάξης των 10⁷ CFU/g, συμπέραναν ότι για να εξοντωθούν απαιτείται κομποστοποίηση μεγαλύτερη της μίας εβδομάδας, κατά προτίμηση δύο εβδομάδων, σε θερμοκρασία 50°C (Jiang *et al.*, 2003). Τα παραπάνω ωστόσο, δεν επιβεβαιώνονται από την εργασία των Hess *et al.* (2004), κατά την οποία ο πληθυσμός των *E. coli* επανέκαμψε όταν το κομπόστ επανήλθε στους 35 έως 45°C, παρόλο που η θερμοκρασία είχε φτάσει τους 50°C για 48h. Οι ίδιοι υποστηρίζουν ότι η ανθεκτικότητα του εντεροαιμορραγικού στελέχους *E. coli* O157:H7 στην υψηλή θερμοκρασία, εξαρτάται τρόπον τινά από την πηγή του μικροοργανισμού, δηλαδή από το εάν έχει καλλιεργηθεί σε εργαστήριο ή προέρχεται από μολυσμένο ζώο. Στην ίδια εργασία τα εργαστηριακά στελέχη αποδείχθηκαν πιο ανθεκτικά στο θερμικό σοκ. Συνεχίζοντας, προτείνουν την εκτίμηση της θερμικής εξουδετέρωσης του *E. coli* O157:H7 με βάση το αθροιστικό σύνολο των ωρών που έχει εκτεθεί ο μικροοργανισμός σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, ισχυρίζονται ότι απαιτούνται 300 βαθμο-ημέρες για την εξουδετέρωση του στελέχους που προέρχεται από εργαστηριακή καθαρή καλλιέργεια και 180 βαθμο-ημέρες όταν προέρχεται από μολυσμένες αγελάδες. Όσον αφορά στη μειωμένη ανθεκτικότητα των *E. coli*, που προέρχονταν από τις αγελάδες, σχολιάζουν τα εξής: «Παρόλο που είναι γνωστό ότι το *E. coli* *E.* παράγει συγκεκριμένες πρωτεΐνες όταν υποστεί θερμικό σοκ προκειμένου να προστατευθεί (Riehle *et al.*, 2003), εντούτοις οι αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τον αποικισμό του γαστρεντερικού συστήματος, είναι πιθανόν να αποδυναμώνουν τον εν λόγω προστατευτικό μηχανισμό».

Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα, μικροοργανισμού που υπό συνθήκες αποδεικνύεται παθογόνος, αναφέρεται συχνά ο μύκητας *Aspergillus fumigatus*, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει αλλεργίες αλλά και να αναπτυχθεί στους πνεύμονες ατόμων που παρουσιάζουν μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος, ή σοβαρή βλάβη στους πνεύμονες (De Bertoldi *et al.*, 1988, Epstein and Epstein, 1989).

Προαπαιτούμενο για την απενεργοποίηση των παθογόνων κατά την εξέλιξη της κομποστοποίησης, αποτελεί η παρακολούθηση και διατήρηση στα επιθυμητά επίπεδα των απαραίτητων παραμέτρων, όπως η διακύμανση της θερμοκρασίας, η διάρκεια έκθεσης σε κάθε

θερμοκρασία, η υγρασία, ο αερισμός και το pH (Strauch, 1996). Επειδή, κατά τη μέθοδο των αναστρεφόμενων σωρών, τα εξωτερικά τμήματα των πλευρών του σωρού επηρεάζονται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, πρέπει το γύρισμά του να γίνεται με τέτοιο τρόπο που να εξασφαλίζει ότι το υλικό που βρίσκεται εκεί μεταφέρεται στο εσωτερικό και το αντίστροφο, και ότι η διάρκεια παραμονής όλου του υλικού σε υψηλές θερμοκρασίες είναι επαρκής.

4.5. Φυτοπαθογόνα

Το κομπόστ που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στις αγροτικές καλλιέργειες ή ως υλικό ανάπτυξης σε δοχεία φύτευσης πρέπει να πληροί δύο προϋποθέσεις: αφενός να είναι καθαρό από φυτοπαθογόνα (κυρίως από αυτά που αναπτύσσονται στο έδαφος), αφετέρου να μην ευνοεί την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων που βρίσκονται ήδη στο έδαφος ή σε άλλα υποστρώματα (Bollen and Volker, 1996). Έρευνες δείχνουν ότι οι νηματώδεις, ακόμη και όσοι επιβιώνουν των αντίξων συνθηκών με κύστες, είναι ευαίσθητοι στις συνθήκες που χαρακτηρίζουν τη διαδικασία της κομποστοποίησης. Σε ένα σύστημα κομποστοποίησης οικιακών αποβλήτων, με υψηλό ρυθμό αποικοδόμησης, διαπιστώθηκε ότι ο νηματώδης της τομάτας *Meloidogyne incognita* var. *acrita* εξουδετερώθηκε και στις οκτώ επαναλήψεις του πειράματος (Bollen and Volker, 1996).

Το ένα έκτο από τους φυτικούς ιούς θεωρείται ότι δρουν στο έδαφος (Hiruki and Teakle, 1987), όπου προσβάλλουν τα φυτά μέσω των βολβών και των ριζών. Από αυτούς, ένα μικρό ποσοστό είναι ανθεκτικοί στις υψηλές θερμοκρασίες και οι έρευνες δεν δίνουν τέτοια αποτελέσματα που να επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Από τη μία πλευρά, ο ιός που προκαλεί το μωσαϊκό του καπνού (TMV) ανιχνεύθηκε σε κομπόστ από φυτικά υπολείμματα προσβεβλημένων φυτών, ακόμη και μετά από κομποστοποίηση έξι εβδομάδων, σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 50 έως 70°C (Hoitink and Fahy, 1986). Από την άλλη, όμως, μετρήσεις σε σειράδια με μίγμα από οικιακά οργανικά απόβλητα και τεμαχισμένο ξύλο, έδειξαν ότι ο TVM έχασε τελείως τη μολυσματικότητά του, ακόμη και όταν η μέγιστη θερμοκρασία στην οποία είχαν εκτεθεί τα δείγματα ήταν κάτω από τους 65°C (Bollen and Volker, 1996).

Οι –ομολογουμένως– λίγες έρευνες σχετικά με τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, έδειξαν ότι η κομποστοποίηση τα εξουδετερώνει αποτελεσματικά (Bollen and Volker, 1996). Το *Erwinia amylovora*, που προσβάλλει τις αχλαδιές και αρκετά καλλωπιστικά φυτά, εξουδετερώθηκε πλήρως, όταν προσβεβλημένοι οφθαλμοί υπέστησαν κομποστοποίηση για 7 ημέρες στους 40°C ή μεγαλύτερες θερμοκρασίες, όχι όμως και σε χαμηλότερες (Brunns *et al.*, 1993).

Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες γρήγορα εξουδετερώνονται κατά την κομποστοποίηση. Γεγονός, που ισχύει ακόμη και για τα είδη που δημιουργούν σκληρώπια, όπως ο *Sclerotium rolfsii* (Yuen and Raabe, 1984), το *Verticillium dahliae* και το *Sclerotium cepivorum* (Bollen *et al.*, 1989).

Μέθοδοι διερεύνησης των μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος στην κομποστοποίηση

Προκειμένου να μελετηθεί η μικροβιακή κοινότητα που διαμορφώνεται κατά την κομποστοποίηση, τόσο από πλευράς μικροβιακής διαδοχής όσο και ταυτοποίησης ειδών, έχουν αναπτυχθεί εκ νέου ή έχουν αναπροσαρμοστεί αρκετές μικροβιολογικές, βιοχημικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι.

Από την παραδοσιακή μικροβιολογία έχουν αλιευθεί οι μέθοδοι καλλιέργειας σε στερεά ή υγρά υποστρώματα, με σκοπό τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας ή την καταμέτρηση και την απομόνωση ειδών (Choi and Park, 1998, Finstein and Morris, 1975, Hardy and Sivasithamparam, 1989, Nakasaki *et al.*, 1985β, Kane and Mullins, 1973). Μειονεκτούν, όμως, στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν εκλεκτικά μέσα, οπότε παραμένει ανοικτό το ενδεχόμενο να υπάρχουν μικροοργανισμοί που δεν έχουν ανιχνευτεί (Ishii and Takii, 2003, Wagner *et al.* 1993).

Από τις μεταγενέστερες μεθόδους, έχουν χρησιμοποιηθεί ορισμένες για τον υπολογισμό της ATP (Garcia *et al.*, 1992, Tseng *et al.*, 1996), για τη μέτρηση της μικροβιακής βιομάζας (Derickx *et al.*, 1990) και τις δυνητικές μεταβολικές ικανότητες (Insam *et al.*, 1996).

Πιο πρόσφατα, άρχισαν να εφαρμόζονται μέθοδοι, οι οποίες δεν προϋποθέτουν καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Τέτοιες είναι η άμεση ανάλυση των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (Phospholipid Fatty Acid Analysis) (Hellman *et al.*, 1997, Herrmann and Shann, 1997, Carpenter-Boggs *et al.*, 1998, Klamer and Baath, 1998) και η απομόνωση DNA και RNA από δείγματα κομποστ (Hugenholtz *et al.*, 1998, Ishii *et al.*, 2000, Ivors *et al.*, 2000, Michel *et al.*, 1996, Riddech *et al.*, 1996, Tiquia and Michel, 1996).

Με την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων, οι οποίες εξετάζουν ευθέως το RNA και το DNA των μικροβιακών κοινοτήτων εντοπίστηκαν αρκετά είδη μικροοργανισμών στα υποστρώματα κομποστοποίησης (Dees and Ghiorse, 2001). Οι Blanc *et al.* (1999) έδειξαν ότι πολλές από τις 16SrDNA κλωνοποιημένες αλληλουχίες που απομόνωσαν από υποστρώματα τροφικών και «πράσινων» υπολειμμάτων, κατά τη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών (64 έως 84°C), σχετίζονταν με είδη του γένους *Thermus*, τα οποία σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκαν σε συστήματα κομποστοποίησης (Beffa *et al.*, 1996).

B. Υλικά και μέθοδοι

6

Θερμόφιλη βιο-αποικοδόμηση οργανικών υλικών (κομποστοποίηση)

6.1. Συγκέντρωση υλικού

Το μίγμα των οικιακών οργανικών αποβλήτων που κομποστοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, αποτελείτο από τροφικά υπολείμματα και κλαδοκάθαρα σε αναλογία 1:1. Τα τροφικά υπολείμματα συλλέχθηκαν από επιλεγμένα πληθυσμιακά δείγματα στο Ηράκλειο και τη Σητεία της Κρήτης. Η κομποστοποίηση τους πραγματοποιήθηκε σε σειράδια (αρχικός όγκος 1m³), στις εγκαταστάσεις του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας των Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου, με τη χρήση ειδικού εξοπλισμού (θρυμματιστή, παρελκόμενος αναστροφέας, μηχανικά κόσκινα κ.λπ.). Η δε εγκατάσταση του αρχικού μίγματος έγινε τη 16^η Μαρτίου 2005.

6.2. Η διαδικασία της κομποστοποίησης και η δειγματοληψία

Κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης έγιναν οι εξής μεθοδευμένες επεμβάσεις:

- Γυρίσματα του σωρού, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ο επαρκής αερισμός των υλικών, να ελεγχθεί το ύψος της θερμοκρασίας και να ενισχυθεί η μικροβιακή δραστηριότητα.
- Διαβροχή με νερό κατά τα γυρίσματα, αλλά και μεταξύ αυτών, ώστε να διατηρηθεί η υγρασία στα προτεινόμενα από τη διεθνή βιβλιογραφία επίπεδα.

Πίνακας 6.1

Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψιών.

A/A	Χρόνος κομποστοποίησης (ημέρες)	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Γύρισμα	Σχόλια
1	1	16/03/2005	-	Εγκατάσταση
2	20	04/04/2005	-	-
3	23	07/04/2005	1 ^ο	διαβροχή
4	34	18/04/2005	2 ^ο	διαβροχή
5	41	25/04/2005	3 ^ο	διαβροχή
6	58	12/05/2005	4 ^ο	διαβροχή
7	72	26/05/2005	5 ^ο	διαβροχή
8	93	14/06/2005	6 ^ο	διαβροχή
9	125	18/07/2005	-	-
10	226	27/10/2005	-	-

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν έξι γυρίσματα του σωρού και δέκα δειγματοληψίες (Πίνακας 6.1.). Η διαδικασία παρακολουθήθηκε από την ημέρα της εγκατάστασής της έως τη 18^η Ιουλίου 2005, δηλαδή για 125 συνολικά ημέρες. Τη 18^η Μαΐου 2005, δηλαδή την 64^η ημέρα της κομποστοποίησης, ο σωρός ανοίχθηκε για εκπαιδευτική επίδειξη.

6.3. Οι μετρήσεις

Στο πλαίσιο του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας ελήφθησαν τρεις κατηγορίες μετρήσεων – αναλύσεων:

1. Φυσικές και χημικές: θερμοκρασία περιβάλλοντος και υποστρώματος, όγκος υποστρώματος, ηλεκτρική αγωγιμότητα, οξύτητα, υγρασία, πτητικά στερεά, C/N και εκπομπές αερίων.
2. Μικροβιολογικές αναλύσεις με κλασικές μεθόδους: ολικών και σποριογόνων βακτηρίων, κολίμορφων, πρωτεολυτικών, κυτταρινολυτικών, αμυλολυτικών, νιτροποιητικών βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών.
3. Μικροβιολογικές αναλύσεις με μοριακές τεχνικές: απομόνωση νουκλεϊκών οξέων, ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων με τη μέθοδο της «Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης» (PCR) και διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων με : «Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης με Διαβάθμιση Αποδιατακτικών Παραγόντων» (DGGE).

Μετρήσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων

7.1. Η μέτρηση της θερμοκρασίας

Η μέτρηση της θερμοκρασίας προσδιορίστηκε με φορητό ψηφιακό θερμόμετρο, με ράμφος 1m και ακρίβεια ενός δεκαδικού στοιχείου στην κλίμακα των °C. Οι μετρήσεις γίνονταν σε καθημερινό επίπεδο, σε δύο σημεία του σωρού, σε βάθος 35 και 75cm, αντίστοιχα. Κατά τη μέτρηση της θερμοκρασίας του σωρού, καταγράφονταν επιπλέον, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, καθώς και οι καιρικές συνθήκες (π.χ. βροχοπτώσεις, άνεμος).

7.2. Οι μετρήσεις των αερίων

Από την 1^η ημέρα της εγκατάστασης του σωρού έως και την 125^η ημέρα της κομποστοποίησης, πραγματοποιούνταν στην Κρήτη, μετρήσεις των εκατοστιαίων ποσοστών του υδρόθειου (H₂S%), του μεθανίου (CH₄%), του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂%) και του οξυγόνου (O₂%). Οι μετρήσεις γίνονταν σε καθημερινή βάση, με φορητή συσκευή μέτρησης αερίων Gas Analyser (GA2000, Geotechniques Instruments), σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό των Manios *et al.* (2005).

7.3. Επί τοις εκατό ποσοστό υγρασίας

Η υγρασία του υποστρώματος μετρήθηκε τόσο στο Εργαστήριο του Χαροκοπείου, όσο και στο εργαστήριο των Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Και στις δύο περιπτώσεις, προσδιορίστηκε από την απώλεια βάρους που σημειώθηκε σε 8 έως 12g δείγματος μετά από ξήρανση 24h στους 105°C (FCQAO, 1994). Για τη συγκριτική ανάλυση των μετρήσεων και την ορθότερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, έγινε αναγωγή των τιμών σε εκατοστιαία ποσοστά (%).

7.4. Τα πτητικά στερεά

Η περιεκτικότητα σε πτητικά στερεά, εκφρασμένη σε εκατοστιαίο ποσοστό επί του ξηρού βάρους (% DW), προσδιορίστηκε με βάση την απώλεια βάρους που σημειώθηκε κατά την καύση των δειγμάτων σε ειδικό θάλαμο, στους 550 ± 5°C για 4h (FCQAO, 1994). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί ξήρανση και ζύγιζαν από 4 έως 7g.

Η μείωση των πτητικών στερεών υπολογίστηκε συναρτήσει της περιεκτικότητας σε τέφρα (Haug, 1993; Stentiford and Pereira- Neto, 1985), βάσει του μαθηματικού μοντέλου:

$$VS_{red} = \{ 1 - [VS_f - (100 - VS_i) / VS_i - (100 - VS_f)] \} 100 \% \quad (\text{τύπος 7.4.1.})$$

όπου VS_{red} ορίζεται η μείωση των πτητικών στερεών, ενώ VS_i και VS_f η αρχική και η τελική περιεκτικότητα σε πτητικά στερεά, αντίστοιχα. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου μοντέλου,

υπόκειται στην παραδοχή ότι κατά την κομποστοποίηση η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε τέφρα δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

7.5. Η οξύτητα του υποστρώματος

Η οξύτητα του υποστρώματος ελέγχθηκε μέσω των τιμών του pH. Ελήφθησαν δύο μετρήσεις: μία στα Τ.Ε.Ι. της Κρήτης, αμέσως μετά τη δειγματοληψία και μία στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, πριν τις μικροβιολογικές αναλύσεις.

Στο εργαστήριο του Χαροκοπείου, το pH προσδιορίστηκε με ηλεκτρονικό pH-μετρο (pH330 /SET-1, WTW), σε υδατικά διαλύματα (10g δείγματος σε 100ml απιονισμένου νερού), τα οποία αφού αναδεύτηκαν για 2h στις 160rpm, διηθήθηκαν υπό κενό (ΑΡΗΑ, 1992; FCQAO, 1994). Στο Τ.Ε.Ι. της Κρήτης χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα με αναλογία 1:1.5 κατ' όγκο.

7.6. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα μετρήθηκε σε δύο χρόνους: πρώτη φορά στα Τ.Ε.Ι. Κρήτης, αμέσως μετά τη δειγματοληψία και δεύτερη στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, λίγο πριν τις μικροβιολογικές αναλύσεις.

Στο Εργαστήριο του Χαροκοπείου, η αγωγιμότητα εκτιμήθηκε με ψηφιακό αγωγιμόμετρο (LF330/SET, WTW), σε υδατικά διαλύματα (10g δείγματος σε 100ml απιονισμένου νερού), τα οποία αφού αναδεύτηκαν για 2h με 160rpm, διηθήθηκαν υπό κενό (ΑΡΗΑ, 1992; FCQAO, 1994). Στο Τ.Ε.Ι. της Κρήτης χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα με αναλογία 1:1.5 κατ' όγκο.

7.7. Ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N)

Για τον υπολογισμό του λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N), προσδιορίστηκε στην Κρήτη το εκατοστιαίο ποσοστό του ολικού άνθρακα (ολ. C%) και το εκατοστιαίο ποσοστό του ολικού αζώτου (ολ. N%). Για τον προσδιορισμό του ολ. N%, χρησιμοποιήθηκε συσκευή τύπου Mikrokjeldahl. Για τον προσδιορισμό του ολ. C%, συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος υποβλήθει σε καύση στους 600°C, για 16h, ενώ το ποσοστό υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\text{ολ. C\%} = [(100\% - \text{τέφρα\%}) / 1.8] \%. \quad (\text{σχέση 7.7.1})$$

Ο C/N υπολογίστηκε μονάχα για τα δείγματα που ελήφθησαν την 1^η, 23^η και 34^η ημέρα.

8

Μικροβιολογικές αναλύσεις με κλασικές τεχνικές**8.1. Προετοιμασία δειγμάτων**

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι προγραμματιζόμενες μικροβιολογικές αναλύσεις, αφαιρέθηκαν από τα δείγματα τα μεγάλα κομμάτια κλάδων και τα συνθετικά υλικά. Έπειτα, τα δείγματα τεμαχίστηκαν και αναμίχθηκαν ώστε να γίνουν όσο το δυνατόν περισσότερο ομοιογενή. Μέρος των ομοιογενοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε σε αεροστεγή δοχεία στους 4°C για ενδεχόμενη χρήση σε μελλοντικά πειράματα.

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, δημιουργήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις κάθε δείγματος σε διάλυμα Ringer's 1/4. Για την πρώτη αραιώση (10^{-1}), διαλύθηκαν 10g από κάθε δείγμα κομπόστ σε 90ml υδατικού διαλύματος Ringer's 1/4. Κάθε αιώρημα ανακινήθηκε με 160 rpm για χρονικό διάστημα 2h.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, από 10^{-2} έως 10^{-12} , μεταφέροντας 1ml από καθεμιά αραιώση σε φιαλίδια (τύπου McCartney) που περιείχαν 9ml διαλύματος Ringer's 1/4. Από τρεις διαδοχικές –καθορισμένες– αραιώσεις κάθε δείγματος, λαμβάνονταν συγκεκριμένες ποσότητες και εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υλικό πρόσφορο για ανάπτυξη και καταμέτρηση των μικροβίων. Η ποσότητα των εμβολίων, το θρεπτικό υπόστρωμα, η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης διαφοροποιούνταν ανάλογα με τον υπό αναζήτηση μικροοργανισμό. Για κάθε αραιώση πραγματοποιούνταν τρεις επαναλήψεις.

8.2. Μέθοδοι καταμέτρησης

Η εκτίμηση του πληθυσμού των ολικών αερόβιων βακτηρίων, των σποριογόνων, των ολικών κολιμορφών, του *Escherichia. Coli*, των κυτταρινολυτικών, των αμυλολυτικών, των πρωτεολυτικών βακτηρίων, των μυκήτων και των ζυμών, έγινε με τη μέθοδο καταμέτρησης Βιώσιμων Αναπαραγωγικών Μονάδων (Colony Forming Units: CFU / g DW). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με την επίστρωση 0.1ml από κάθε αραιώση σε εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, υπό ασηπτικές συνθήκες.

8.3. Προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη των βιο- αποικοδομητών

8.3.1. Ολικά αερόβια βακτήρια

Ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ολικών αερόβιων και των σποριογόνων βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Agar (N.A.), σε συγκέντρωση 28g/L αποιονισμένου νερού (dH₂O), το οποίο πριν τον εμβολιασμό, αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C για 15min).

Για την εκτίμηση των ολικών μεσόφιλων και θερμόφιλων αερόβιων βακτηρίων, εμβολιάστηκαν, αντίστοιχα, εννέα τριβλία (τρεις αραιώσεις επί τρεις επαναλήψεις) τα οποία επώαστηκαν στους 30°C για 48h και εννέα τριβλία (τρεις αραιώσεις επί τρεις επαναλήψεις) τα οποία επώαστηκαν στους 55°C για 48h. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκαν από 10⁻³ έως 10⁻⁸ ανάλογα με το δείγμα και τη θερμοκρασία επώασης.

8.3.2. Σποριογόνα βακτήρια

Για την εκτίμηση των μεσόφιλων και θερμόφιλων σποριογόνων βακτηρίων, εφαρμόστηκαν οι ίδιοι χειρισμοί με τα ολικά αερόβια βακτήρια, με τη διαφορά ότι πριν τον εμβολιασμό, οι αραιώσεις θερμάνθηκαν στους 80°C για 10min. Η καταμέτρηση έγινε σε αραιώσεις από 10⁻³ έως 10⁻⁶, οι οποίες διαφοροποιούνταν ανάλογα με το δείγμα και τη θερμοκρασία επώασης.

8.3.3. Κυτταρινολυτικά βακτήρια

Η εκτίμηση του πληθυσμού των κυτταρινολυτικών βακτηρίων, έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε κυτταρίνη (Eggins and Pugh, 1971).

Για την παρασκευή 1L από το εν λόγω θρεπτικό υπόστρωμα, αναμίχθηκαν 250ml υδατικού διαλύματος κυτταρίνης με 750ml – επίσης- υδατικού διαλύματος ανόργανων αλάτων. Για την παρασκευή του πρώτου, προστέθηκαν 10g κυτταρίνης σε 250ml dH₂O και αναδεύτηκαν για 72h. Η σύνθεση του διαλύματος ανόργανων αλάτων δίνεται στον Πίνακα 8.1. Μετά τη διάλυση των αλάτων, το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6.2 και το διάλυμα αποστειρώθηκε (115°C για 20min). Όταν απέκτησε, θερμοκρασία δωματίου, αναμίχθηκε με το αιώρημα της κυτταρίνης και μοιράστηκε σε τριβλία.

Για την εκτίμηση του πληθυσμού των μεσόφιλων κυτταρινολυτικών βακτηρίων, εμβολιάστηκαν εννέα τριβλία (τρεις αραιώσεις επί τρεις επαναλήψεις) τα οποία επώαστηκαν στους 30°C για 9 ημέρες. Μετά την επώαση, τα τριβλία κατακλύστηκαν με διάλυμα Congo Red (0.1% w/v), το οποίο βάφει την κυτταρίνη που έχει εναπομείνει στο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 10⁻³ έως 10⁻⁶, ενώ καταμετρήθηκαν μονάχα οι αποικίες που περιβάλλονταν από διαυγείς ζώνες.

Πίνακας 8.1.

Διάλυμα ανόργανων αλάτων για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη και καταμέτρηση κυτταρινολυτικών βακτηρίων (Eggins and Pugh, 1971).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (g/L dH ₂ O)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
L-ασπαραγίνη	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCO ₃	0.1
Άγαρ (LabM)	20.0

8.3.4. Αμυλολυτικά βακτήρια

Οι πληθυσμοί των αμυλολυτικών βακτηρίων καταμετρήθηκαν σε τριβλία με δύο στρώσεις θρεπτικών υλικών (Ryckeboer *et al.*, 2003). Η βασική στρώση κάθε τριβλίου αποτελούνταν από 15ml – κατά προσέγγιση- διαλύματος minimal Delafield, ενώ η επιφανειακή από 5ml υδατικού διαλύματος αμύλου 1% (w/v) και 2% (w/v) άγαρ. Αμφότερα τα υλικά αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο, στους 121°C για 20 min. Η σύσταση του διαλύματος minimal Delafield (Delafield *et al.*, 1965) δίνεται στον Πίνακα 8.2. Η διάλυση των συστατικών γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,033M KH₂PO₄ - Na₂HPO₄, με pH 6.8

Για την ανάπτυξη μεσόφιλων και θερμοφίλων αμυλολυτικών βακτηρίων, ορίστηκε επώαση 2 ημερών στους 30°C και 55°C, αντίστοιχα. Μετά την επώαση τα τριβλία κατακλύστηκαν με υδατικό διάλυμα Lugol (0.5% I₂ και 1.0% KI). Οι αποικίες που ανέπτυξαν διαυγή ζώνη, θεωρήθηκαν αποικίες αμυλολυτικών βακτηρίων. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν –ανάλογα με το δείγμα και τη θερμοκρασία επώασης- κυμαίνονταν από 10⁻² έως 10⁻⁷.

Πίνακας 8.2.

Σύσταση διαλύματος minimal Delafield (Delafield *et al.*, 1965).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (g/L)
NH ₄ Cl	1.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.500
ferric ammonium citrate	0.050
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.005
Άγαρ (LabM)	20.000

8.3.5. Πρωτεολυτικά βακτήρια

Δεδομένου ότι ο στόχος ήταν η καταμέτρηση πρωτεολυτικών βακτηρίων που παράγουν καζεάση (casease), χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το Milk Agar (Rysckeboer *et al.*, 2003). Για την παρασκευή του αναμιχθηκε διάλυμα N.A. με ένα εναιώρημα σκόνης γάλακτος εργαστηριακής χρήσης.

Αναλυτικότερα, το πρώτο διάλυμα παρασκευάστηκε διαλύοντας 23g σκόνης N.A. σε 700ml dH₂O. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ανάπτυξης μυκήτων, το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min και ενισχύθηκε με 0.2g κυκλοξαμιδίου (cycloheximide). Το δεύτερο διάλυμα παρασκευάστηκε, διαλύοντας 30g Skimmed Milk Powder σε 300 ml dH₂O και αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min.

Οι αραιώσεις κυμάνθηκαν από 10⁻² έως 10⁻⁷, ανάλογα με το στάδιο της κομποστοποίησης και τη θερμοκρασία επώασης, ενώ η καταμέτρηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση 2 ημερών στους 30°C και 55°C. Αναζητήθηκαν αποικίες που περιβάλλονταν από διαυγή ζώνη.

8.3.6. Μύκητες – Ζύμες

Ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και την καταμέτρηση μυκήτων και ζυμών, παρασκευάστηκε το Sabouraud Dextrose Agar (LabM), σε συγκέντρωση 65g/L dH₂O, το οποίο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C για 15 min). Μετά την αποστείρωση του υλικού και αφού η θερμοκρασία του έφθασε περίπου στους 45°C, προστέθηκε αντιβιοτικό διάλυμα στρεπτομικίνης (1ml ανά 1L θρεπτικού διαλύματος).

Για την παρασκευή του διαλύματος στρεπτομικίνης διαλύθηκαν 3g Streptomycin Sulfate σε 10ml αποστειρωμένου dH₂O. Η εξουδετέρωση μικροοργανισμών από το διάλυμα της στρεπτομικίνης, έγινε με διήθηση μέσω βακτηριολογικού ηθμού (0.22μ). Το διάλυμα μπορούσε να διατηρηθεί στους 4°C για χρονικό διάστημα 3 μηνών.

Οι αραιώσεις των εμβολίων κυμάνθηκαν – ανάλογα με το στάδιο της κομποστοποίησης – από 10⁻¹ έως 10⁻⁶, ενώ η καταμέτρηση των μεσόφιλων και θερμοφίλων μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση 2 ημερών στους 30°C και 55°C, αντίστοιχα.

8.4. Υποστρώματα για περιπτωματικούς δείκτες: Ολικά κολίμορφα και *Escherichia coli*

Για την ανάπτυξη των ολικών κολίμορφων βακτηρίων και του *E. coli*, καθώς και για την καταμέτρηση των βιώσιμων αναπαραγωγικών τους μονάδων, χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το Chromocult – Agar (Merck), σε συγκέντρωση 26,5g/l dH₂O, το οποίο δεν αποστειρώνεται.

Από κάθε δείγμα εμβολιάστηκαν εννέα τριβλία (τρεις αραιώσεις επί τρεις επαναλήψεις) τα οποία επώαστηκαν στους 37°C για 24h. Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις από 10⁻² έως 10⁻⁶. Οι αποικίες των ολικών εμφανίζονταν με κόκκινο χρώμα, ενώ των *E. coli* με ιώδες.

9

Μικροβιολογικές αναλύσεις με μοριακές τεχνικές**9.1. Προετοιμασία δειγμάτων**

Έως τη χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις με μοριακές μεθόδους, τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20 °C.

Πριν να γίνουν οι προσχεδιασμένοι πειραματικοί χειρισμοί, τα δείγματα απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου και υπέστησαν επισταμένη λειοτρίβηση.

9.2. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Ποσότητα 0.25g από κάθε δείγμα προστέθηκε σε eppendorf με 2ml αποσταρωμένου dH₂O. Ακολούθησε ανάδευση με vortex (Stuart Scientific Autovortex SAG) και φυγοκέντρηση στις 500rpm για 2min, ώστε να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα (φυγοκέντρος Eppendorf 5417C). Μέρος του υπερκείμενου διαλύματος (περίπου 1ml) μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000rpm για 2min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίδιο eppendorf μεταφέρθηκε η υπόλοιπη ποσότητα από το δείγμα. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρησης (13.000rpm για 2min) και της απόρριψης του υπερκείμενου και στη συνέχεια το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων με το UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. #12800-50). Τα προϊόντα της απομόνωσης φυλάσσονταν στους 4°C, έως τη στιγμή του επόμενου βήματος.

9.3. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος «Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης», η οποία έχει καθιερωθεί να ονομάζεται PCR ως ακρωνύμιο των αγγλικών Polymerase Chain Reaction, χρησιμοποιείται ευρέως για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε δείγματα που περιέχουν πλήθος αλληλουχιών DNA. Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης αυτής αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων. Στις παραγράφους που ακολουθούν, δίνονται οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων εκκίνησης, τα διαλύματα, οι κύκλοι της θερμοκρασίας και οι έλεγχοι, που έγιναν στο πλαίσιο εφαρμογής της PCR στα δείγματα των υπό κομποστοποίηση τροφικών υπολειμμάτων και κλαδοκάθαρων. Για την εφαρμογή της PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Primus 96plus (MWG AG της Biotech).

9.3.1. Ολιγονουκλεοτίδια εκκίνησης (primers)

Για την εφαρμογή της PCR, χρησιμοποιήθηκε ένα σετ από δύο ολιγονουκλεοτίδια εκκίνησης (primers) για βακτηριακό 16S rDNA (Muyzers *et al.*, 1997). Το σετ περιείχε τους primers 341F με GC-clamp και 907R (Invitrogen™ Life Technologies England), των οποίων οι αλληλουχίες δίνονται στον Πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1.

Αλληλουχίες των primers 341F και 907R, που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση βακτηριακού 16S rDNA με τη μέθοδο της PCR.

PCR PRIMERS	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ
341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
GC-clamp	5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'
907R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

9.3.2. Διαλύματα ενίσχυσης

Για την ενίσχυση των απομονώσεων, χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα τελικού όγκου 50μl. Η σύνθεσή τους (Πίνακας 9.2.) αποτελείτο από το ένζυμο *Thermus aquaticus* DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση, εταιρεία: HyTest #7 T1, Lab Supplies), Reaction Buffer 10x (670mM Tris-HCl, pH 8,8, 166mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), MgCl₂, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP's), τους primers 341F με GC-clamp και 907R και διάλυμα απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων. Τα διαλύματα και των δέκα δειγμάτων περιείχαν 2μl από το διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων και 1μl από κάθε primer. Στο διάλυμα-μάρτυρα (control), οι απομονώσεις των νουκλεϊκών οξέων αντικαταστάθηκαν από αποστειρωμένο dH₂O.

Πίνακας 9.2.

Σύσταση διαλύματος για την ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων με τη μέθοδο της PCR.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
αποστειρωμένο dH ₂ O	38,0
dNTP's	0,5
buffer 10x	5,0
MgCl ₂	2,0
341F με GC-clamp	1,0
907R	1,0
Taq πολυμεράση	0,5
απομ. νουκλεϊκών οξέων	2,0
Ολικός όγκος	50,0

9.3.3. Πρόγραμμα θερμοκρασιών

Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που επιλέχθηκε (Ishii and Takii, 2003) διαρκούσε συνολικά 1h και 48min. Στον Πίνακα 9.3., δίνονται αναλυτικά τα επί μέρους στάδια καθώς και η διάρκεια, η θερμοκρασία και ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε θερμοκρασιακού κύκλου. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αποτελεσματικότητας της PCR (§ 9.4) και στη συνέχεια τα προϊόντα ψύχονταν στους 4°C.

Πίνακας 9.3.

Πρόγραμμα θερμοκρασιακών κύκλων για την εφαρμογή της PCR
(Ishii and Takii, 2003).

ΣΤΑΔΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΚΥΚΛΟΙ	
Hot staff	1x 94°C για 3.0min	
Κύριο στάδιο	25x	94°C για 0.5min
		45°C για 1.0min
		72°C για 1.5min
Final Extension	1x 72°C για 5.0min	

9.4. Έλεγχος των PCR-προϊόντων

Η ενίσχυση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων επιβεβαιώθηκε με ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (w/v). Ως δείκτης μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο ladder Lamda DNA/Hind III (λHindIII) της HT Biotechnology LTD (Cambridge England). Ο όγκος των δειγμάτων και του μάρτυρα ήταν 10μl, ενώ του ladder 4μl. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δέκα δείγματα, ο μάρτυρας και ο ladder αναμίχθηκαν με 0,1μl από τη χρωστική Gel Loading Buffer – Type III (υδατικό διάλυμα 0.25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol και 30% glycerol, κατά Sambrook *et al.*, 1989). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Owl B1A, με ρυθμιστικό διάλυμα Tris Acetate EDTA (TAE) 1x, υπό σταθερή τάση ρεύματος 90V για 30min.

9.4.1. Χρώση του πηκτώματος και παρατήρηση

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μέγεθος και η ποσότητα των ενισχυμένων νουκλεϊκών οξέων, το πήκτωμα αγαρόζης υπέστη χρώση με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), συγκέντρωσης 1μg/ml, για 30 έως 40min και στη συνέχεια, μεταφέρθηκε για οπτική παρατήρηση σε σύστημα με τράπεζα Transillumination UVP (Ultra Violet Products). Η οπτική παρατήρηση των διαχωρισμένων ζωνών έγινε από την οθόνη ηλεκτρονικού υπολογιστή, μέσω του προγράμματος Grab-it. Η τράπεζα και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής βρίσκονταν σε σύνδεση με φωτογραφική μηχανή και συσκευή εκτύπωσης φωτογραφιών (UP-D890, Sony).

9.5. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης με Βαθμιδωση Αποδιατακτικών Παραγόντων (DGGE)

Για το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της «Ηλεκτροφόρησης σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης με Βαθμιδωση Αποδιατακτικών Παραγόντων» (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ή DGGE) (Muyzer *et al.*, 1997).

9.5.1. Προετοιμασία του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% (w/v) με γραμμική διαβάθμιση αποδιατακτικών παραγόντων και διαστάσεις 16x16x1mm (ΜxΥxΠ). Ως αποδιατακτικοί παράγοντες των νουκλεϊκών οξέων επιλέχθηκαν το φορμαμίδιο και η ουρία. Για τη δημιουργία του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (37.5:1), με περιεκτικότητα σε παράγοντες αποδιάταξης 40 και 50%, αντίστοιχα. Για λόγους ευκολίας το πρώτο διάλυμα εφεξής θα ονομάζεται Low και το δεύτερο High.

Για τη σύνθεση των διαλυμάτων Low και High προαπαιτήθηκαν τρία stock διαλύματα: ένα διάλυμα 40% ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης, ένα διάλυμα 40% ακρυλαμίδης /bis-ακρυλαμίδης με 40% σε αποδιατακτικούς παράγοντες και ένα διάλυμα 40% ακρυλαμίδης /bis-ακρυλαμίδης με 50% σε αποδιατακτικούς παράγοντες. Η σύνθεση του πρώτου αναφέρεται αναλυτικά στον Πίνακα 9.4. και των άλλων δύο στον Πίνακα 9.5. Όλα φυλάσσονταν στους 4°C.

Πίνακας 9.4.

Σύνθεση stock διαλύματος 40% ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (37,5:1) σε 100ml dH₂O.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (g)
Ακρυλαμίδη	38,93
Bis-ακρυλαμίδη	1,07

Το διάλυμα Low περιείχε 16ml από το stock με περιεκτικότητα 40% σε αποδιατακτικούς παράγοντες, 16μl TEMED και 160μl Ammonium Persulfate. Κατά αναλογία, το διάλυμα High περιείχε 16ml από το stock με περιεκτικότητα 50% σε αποδιατακτικούς παράγοντες, 16μl TEMED και 160μl Ammonium Persulfate (0,1g σε τελικό όγκο 1ml dH₂O).

Το TEMED και το Ammonium Persulfate χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή του πολυμερισμού. Η γραμμική διαβάθμιση των διαλυμάτων Low και High πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικής συσκευής μίξης βαθμίδων (Gradient Delivery System, Model 475 της Biorad).

Πίνακας 9.5.

Σύνθεση stock διαλυμάτων ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης (37.5:1), με περιεκτικότητα 40% και 50% σε αποδιατακτικούς παράγοντες.

	Διάλυμα 40%	Διάλυμα 50%
ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
40% ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης	20ml	20ml
50x TAE Buffer	2ml	2ml
Φορμαμίδιο	16ml	20ml
Ουρία	16,8g	21g
dH ₂ O	Μέχρι 100ml τελ. όγκο	Μέχρι 100ml τελ. όγκο

9.5.2. Συνθήκες DGGE

Η DGGE βασίστηκε στην αναφορά των Ishii and Takii (2003) και πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή D Code™, Universal Mutation Detection System της Biorad (Hercules, Calif.).

Καθένα από τα προϊόντα της PCR (20μl) αναμίχθηκε με 0,1μl από τη χρωστική Gel Loading Buffer – Type III (δες § 9.4.) και μεταφέρθηκε σε ξεχωριστό βοθρίο («πηγάδι») του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V, σε διάλυμα TAE 1x με θερμοκρασία 60°C, για χρονικό διάστημα 6,5 ωρών.

9.5.3. Χρώση του πηκτώματος και οπτική παρατήρηση

Για την εκτίμηση του διαχωρισμού των ζωνών πραγματοποιήθηκε χρώση του πηκτώματος με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), συγκέντρωσης 1μg/ml, για 40min. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε για οπτική παρατήρηση σε σύστημα με τράπεζα Transillumination UVP (δες § 9.4.1).

9.5.4. Ανάγνωση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

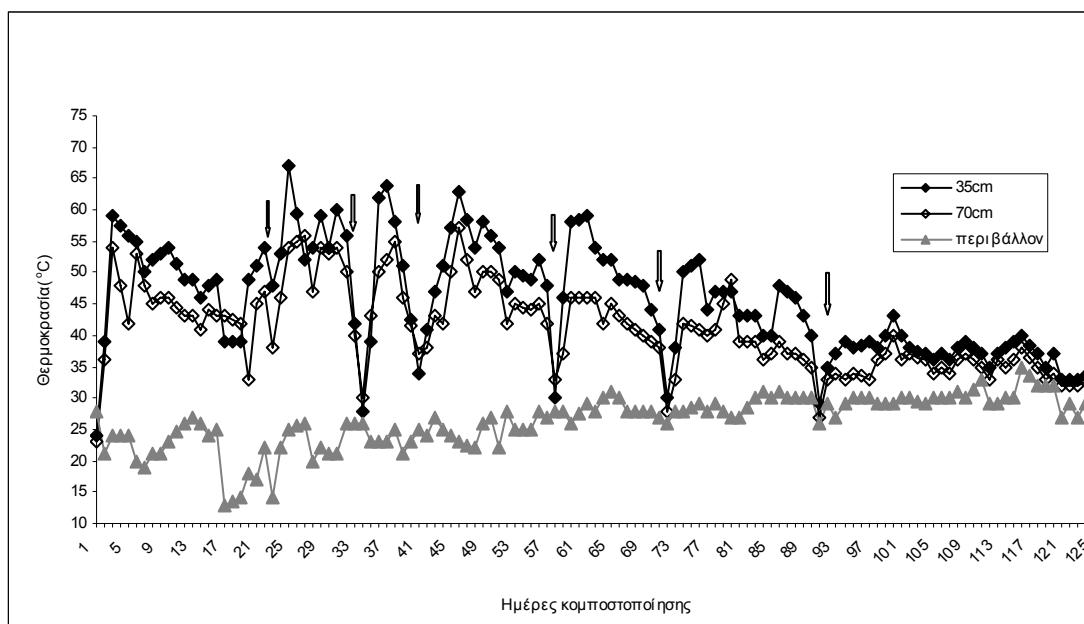
Οι καλά διαχωριζόμενες ζώνες αποκόπηκαν από το πηκτώμα και αφού καθαρίστηκαν από την πολυακρυλαμίδα (μέθοδος Crash & Soak, Maxam et Gilbert [Muyzer *et al.*, 1997]), στάλθηκαν σε αναλυτικό εργαστήριο για ανάγνωση των αλληλουχιών (sequencing). Οι αλληλουχίες που ελήφθησαν συγκρίθηκαν με βάσεις γονιδιακών δεδομένων (GenBank, EMBL, DDBJ, PDB) μέσω του BLASTN (Altschul *et al.*, 1997).

Γ. Αποτελέσματα και σχολιασμός

Μετρήσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων

10.1. Η διακύμανση της θερμοκρασίας

Οι τιμές της θερμοκρασίας περιβάλλοντος και του σωρού σε βάθος 35 και 70cm καταγράφηκαν από την ημέρα της εγκατάστασης των υλικών (16 Μαρτίου 2005) έως και την 125^η ημέρα της κομποστοποίησης (Διάγραμμα 10.i.). Δεδομένου ότι το βάθος των 70cm βρισκόταν κοντά στο έδαφος, εφεξής ο σχολιασμός θα αναφέρεται στο βάθος των 35cm. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η τάση των θερμοκρασιών σε βάθος 70cm ήταν παρόμοια με την τάση των θερμοκρασιών σε βάθος 35cm (Διάγραμμα 10.ii.).



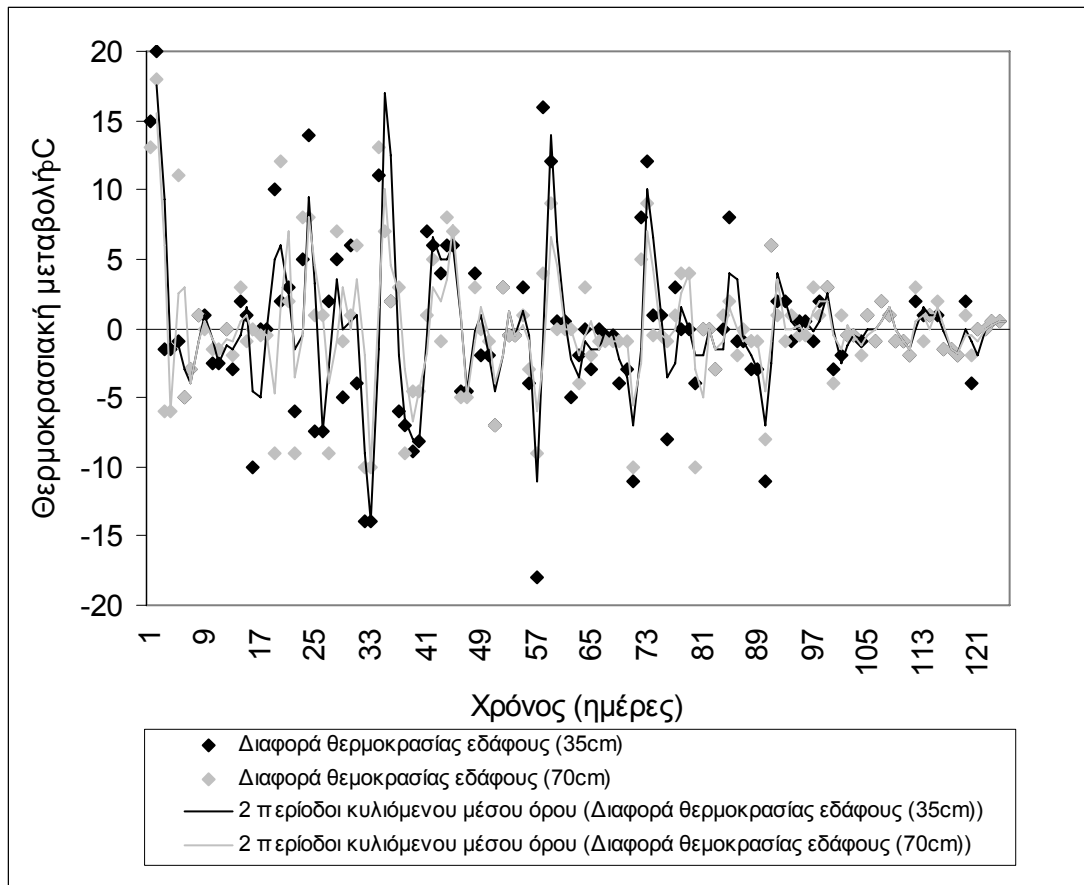
Διάγραμμα 10.i.

Καμπύλες μεταβολής της θερμοκρασίας σε διαφορετικά επίπεδα χώνευσης σε σωρό με οργανικό κλάσμα οικιακών αποβλήτων και κλαδοκάθαρα σε αναλογία 1:1 κατ' όγκο.

Με βέλη σημειώνονται οι μέρες των γυρισμάτων.

Η μετάβαση από το μεσόφιλο στο θερμόφιλο στάδιο πραγματοποιήθηκε μέσα σε χρονικό διάστημα 48h, με θερμοκρασιακή μεταβολή 35°C –από τους 24°C ανέβηκε στους 59°C. Η μέγιστη θερμοκρασία που σημειώθηκε στο θερμόφιλο στάδιο ήταν 67°C και καταγράφηκε την 25^η ημέρα, δύο ημέρες μετά από το 1^ο γύρισμα. Η τιμή αυτή δεν παρεκκλίνει από τις μέγιστες τιμές θερμοκρασίας που έχουν αναφερθεί στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία (de Guardia *et al.*, 1998; Haug, 1993). Η αμέσως επόμενη υψηλή θερμοκρασία ήταν 64°C και σημειώθηκε την 37^η ημέρα, τρεις ημέρες μετά το 2^ο γύρισμα.

Από την 34^η ημέρα, που πραγματοποιήθηκε το 2^ο γύρισμα, οι μέγιστες θερμοκρασίες σημειώνονταν τέσσερις έως πέντε ημέρες μετά από κάθε γύρισμα. Οι τιμές τους ελαττώνονταν με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα μετά την 109^η ημέρα να ταυτίζονται σχεδόν με τις θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Διάγραμμα 10.ii.). Η πτωτική αυτή τάση αποτελεί ένδειξη ότι η διαδικασία της κομποστοποίησης έτεινε να ολοκληρωθεί (Haug, 1993). Αποδυναμώνεται όμως, από το γεγονός ότι το ίδιο χρονικό διάστημα η θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσίαζε σταδιακή αύξηση λόγω εποχικής διακύμανσης.



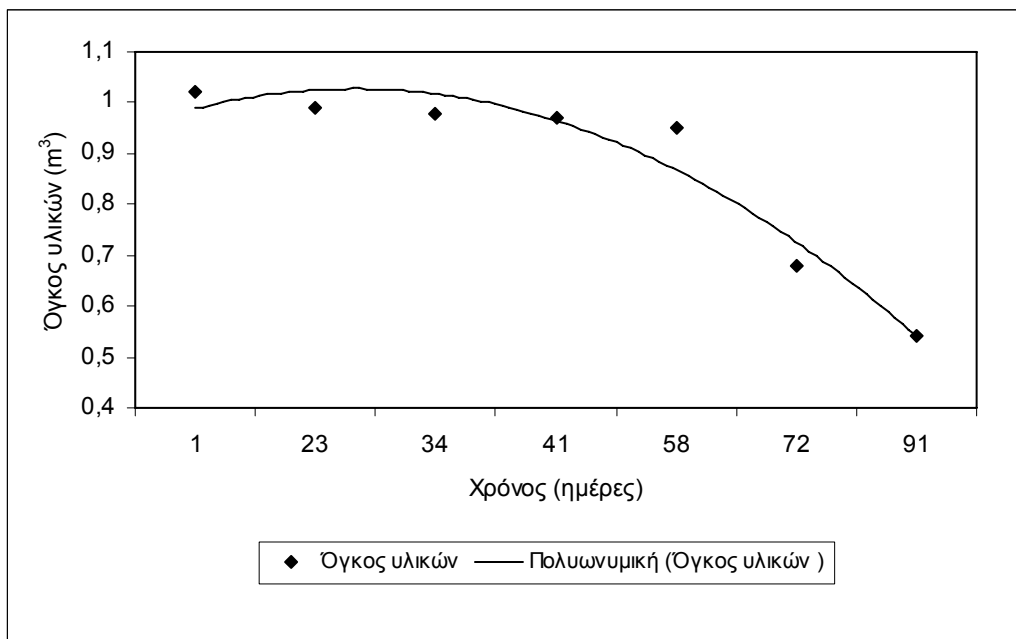
Διάγραμμα 10.ii.

Εικοσιτετράωρες θερμοκρασιακές μεταβολές του υποστρώματος κατά την πορεία της κομποστοποίησης, σε βάθος 35 και 70cm.

Από τις τιμές και τους ρυθμούς μεταβολής των θερμοκρασιών, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μεσόφιλο στάδιο διήρκεσε δύο ημέρες (από 16 έως 18 Μαρτίου 2005), το θερμόφιλο 60 ημέρες (από 18 Μαρτίου έως 16 Μαΐου 2005) και το στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας ξεκίνησε από την 62^η ημέρα (16 Μαΐου 2005) και διήρκεσε μέχρι τη 94^η (17 Ιουνίου). Από τη 94^η ημέρα, ο σωρός πέρασε στο στάδιο της ωρίμανσης.

10.2. Ο όγκος του υποστρώματος

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10.iii., ο όγκος των υλικών παρουσίασε μείωση σε σχέση με το χρόνο. Η μείωση ήταν μικρή, αλλά σταθερή έως την 58^η ημέρα, και ραγδαία μεταξύ της 58^{ης} και 72^{ης} ημέρας. Η τιμή του όγκου του αρχικού δείγματος ήταν 1.02m³ και έφτασε στο 0,54m³ την 93^η ημέρα της κομποστοποίησης, δηλ. μειώθηκε κατά 47,06%. Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών επιβεβαιώθηκε με στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων (R=0.94). Η μείωση που παρατηρήθηκε, ενισχύει την επιλογή της κομποστοποίησης σε εκείνα τα συστήματα διαχείρισης οικιακών αποβλήτων που έχουν κύριο στόχο τη μείωση του όγκου των αποβλήτων.



Διάγραμμα 10.iii.

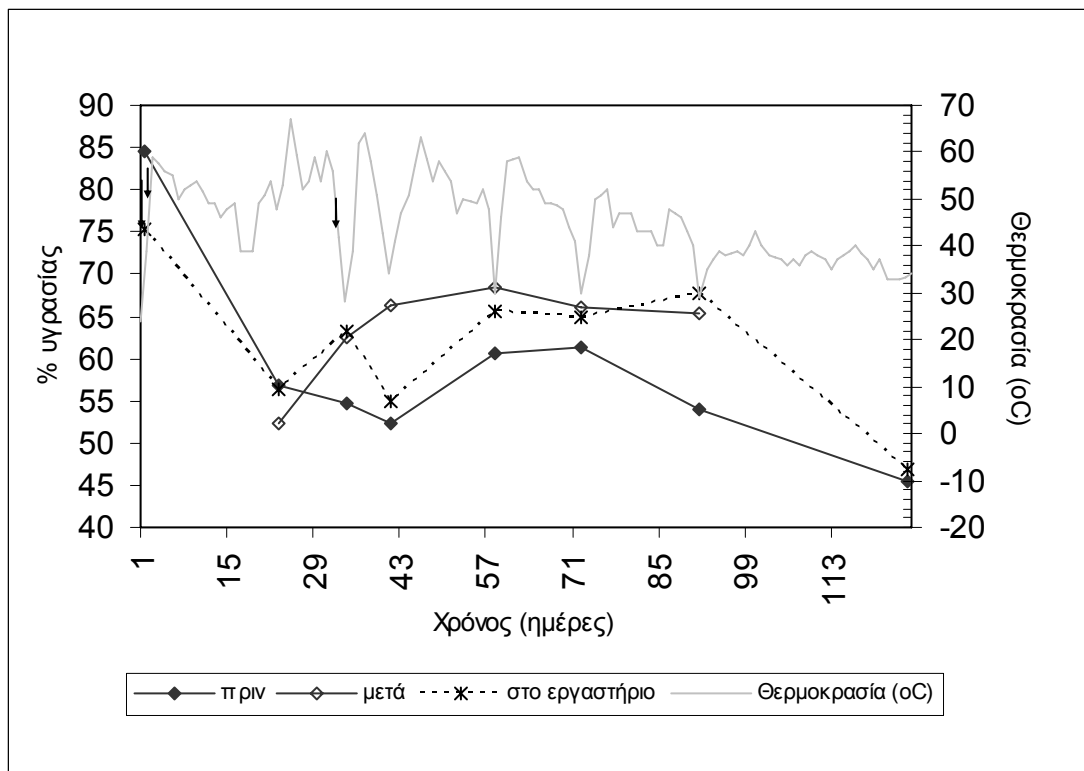
Ο όγκος των υλικών σε συνάρτηση με το χρόνο.
Συντελεστής πολυωνυμικής συσχέτισης R = 0.94.

Οι Miner *et al.* (2001) ισχυρίστηκαν ότι απαιτείται ένα ελάχιστο όριο στον όγκο του υποστρώματος (0,18m³.m⁻¹) προκειμένου να αναπτυχθούν θερμοκρασίες άνω των 43°C. Ωστόσο, με δεδομένο ότι η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι το ισοζύγιο των θερμικών απωλειών και της παραγόμενης θερμότητας, ο κρίσιμος ελάχιστος όγκος του υποστρώματος είναι πιθανόν να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση των αρχικών υλικών (Ishii and Takii, 2003). Τα τροφικά υπολείμματα αποτελούνται από εύκολα διασπάζσιμα σύμπλοκα, οπότε ενδέχεται να προκαλούν μεγαλύτερους ρυθμούς παραγωγής θερμότητας. Κατά συνέπεια, ο κρίσιμος ελάχιστος όγκος για την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών είναι πιθανόν να είναι μικρότερος (Ishii and Takii, 2003). Αν οι παραπάνω υποθέσεις αποδειχθούν ορθές, τότε σε επίπεδο εφαρμογών, ενδέχεται τα μικρής κλίμακας συστήματα κομποστοποίησης τροφικών υπολειμμάτων να παρουσιάζουν ταχύτερους ρυθμούς από τα αντίστοιχα με μεγάλη κλίμακα.

Οι μετρήσεις που ελήφθησαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, στηρίζουν τις συγκεκριμένες υποθέσεις, ενώ βρίσκονται σε αντίθεση με την πρόταση των Miner *et al.* (2001). Ο αρχικός όγκος του υποστρώματος που εξετάστηκε ήταν $1,02\text{m}^3$, ωστόσο αναπτύχθηκαν θερμοκρασίες άνω των 43°C (Διάγραμμα 10.i.) και η διαδικασία της κομποστοποίησης εξελίχθηκε χωρίς προβλήματα.

10.3. Η υγρασία

Στο Διάγραμμα 10.iv. παρουσιάζονται τα εκατοστιαία (%) ποσοστά υγρασίας που μετρήθηκαν πριν και μετά από κάθε γύρισμα. Όπως, επίσης, και τα ποσοστά υγρασίας που μετρήθηκαν στα δείγματα που ελήφθησαν μετά τα γυρίσματα και στάλθηκαν στο εργαστήριο του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου για να υποβληθούν σε μικροβιακές και βιοτεχνολογικές αναλύσεις.



Διάγραμμα 10.iv.

Η διακύμανση του % ποσοστού υγρασίας κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Στο διάγραμμα έχει σημειωθεί η διακύμανση της θερμοκρασίας υποστρώματος. Με τα βέλη σημειώνονται οι ημέρες που έβρεξε ($16^{\text{η}}$ & $17^{\text{η}}$), καθώς και η ημέρα που προστέθηκε νερό.

Για διευκόλυνση της ανάλυσης, στο ίδιο διάγραμμα έχει σημειωθεί η διακύμανση της θερμοκρασίας του υποστρώματος. Τη $16^{\text{η}}$ και $17^{\text{η}}$ ημέρα, έβρεξε, ενώ την $83^{\text{η}}$ έγινε διαβροχή του υποστρώματος χωρίς να πραγματοποιηθεί γύρισμα. Την $26^{\text{η}}$, $33^{\text{η}}$ και $44^{\text{η}}$ ημέρα κατεγράφησαν ισχυροί άνεμοι, οι οποίοι είχαν ως άμεσα παρατηρούμενο αποτέλεσμα την πτώση της θερμοκρασίας.

Τα ποσοστά υγρασίας των τροφικών υπολειμμάτων και των κλαδοκάθαρων κατά την εγκατάσταση του υποστρώματος ανερχόταν στο 84,45% και 37,83%, αντίστοιχα (Πίνακας 10.1.). Το ποσοστό υγρασίας του αρχικού μίγματος (1:1) εκτιμήθηκε στην Κρήτη στο επίπεδο του 79,87% και στην Αθήνα 75,35%. Η διαφορά στη μέτρηση, ίσως, να οφείλεται σε μη αντιπροσωπευτικό δείγμα ή στο γεγονός ότι μεσολάβησαν 20 ημέρες από την ημέρα της δειγματοληψίας μέχρι τη μέτρησή του στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και εμπίπτει μέσα σε αποδεκτά όρια διακύμανσης για τόσο ετερογενή υλικά.

Κατά το θερμόφιλο στάδιο, παρατηρήθηκε απότομη πτώση του ποσοστού υγρασίας, που πιθανόν εξηγείται με την ανάπτυξη της μικροβιακής δραστηριότητας και την συνακόλουθη αύξηση της θερμοκρασίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι το σχετικά χαμηλό ποσοστό υγρασίας που καταγράφηκε την 41^η ημέρα της κομποστοποίησης (52,27%), παρόλο που είχαν περάσει μόλις επτά ημέρες από το προηγούμενο (το 3^ο κατά σειρά) γύρισμα. Χονδρικά, από το 5^ο γύρισμα και μετά, δηλαδή από την 72^η ημέρα, το ποσοστό υγρασίας άρχισε σταδιακά να ελαττώνεται. Την 125^η ημέρα παρακολούθησης έφτασε στο 45,54% σύμφωνα με τις μετρήσεις της Κρήτης.

10.4. Τα πτητικά στερεά

Κατά παραδοχή, το ποσοστό των πτητικών στερεών αντιστοιχεί στο ποσοστό της οργανικής ύλης (§ 3.1.6), η οποία εξαρτάται άμεσα από τη φύση του αρχικού υλικού που θα υποβληθεί σε κομποστοποίηση.

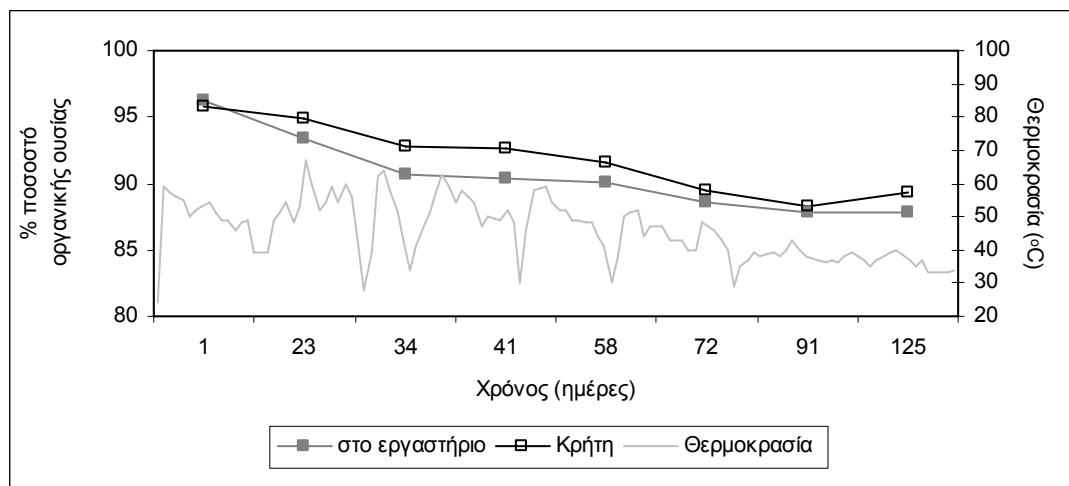
Πίνακας 10.1.

Φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά για τα κλαδοκάθαρα, τα τροφικά υπολείμματα και το (1:1) μίγμα τους.

Υλικά	Χαρακτηριστικά υλικών				
	Υγρασία (%)	pH	Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (μS/cm)	C/N	Οργανική Ουσία (%)
Κλαδοκάθαρα	37,83	6,45	570	138,44	97,19
Τροφ. Υπολ.	84,45	4,14	1760	25,16	93,71
Μείγμα (1:1)	79,87	4,21	2860	41,65	95,82

Στον Πίνακα 10.1 δίνονται τα εκατοστιαία ποσοστά (%) οργανικής ουσίας των κλαδοκάθαρων, των τροφικών υπολειμμάτων και του (1:1) μίγματος αυτών. Ενώ, στο Διάγραμμα 10.v. παρουσιάζονται τα εκατοστιαία (%) ποσοστά πτητικών στερεών όπως υπολογίστηκαν στα δείγματα της Κρήτης και της Αθήνας. Γενικά, παρατηρήθηκε πτωτική τάση από την ημέρα της εγκατάστασης μέχρι την 72^η ημέρα (από 95,82% του αρχικού δείγματος

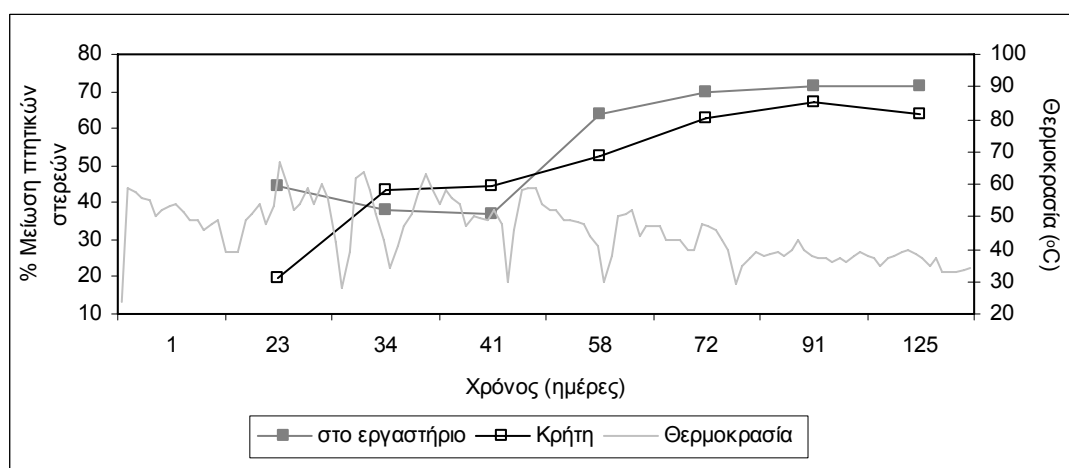
έως 89,54% στην Κρήτη και από 96,2% του αρχικού δείγματος έως 88,50% στην Αθήνα). Από την 72^η ημέρα και μετά, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση των τιμών.



Διάγραμμα 10.v.

Η διακύμανση του ποσοστού οργανικής ουσίας (πηητικών στερεών) κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Σημειώνεται και η διακύμανση της θερμοκρασίας υποστρώματος.

Για να εκτιμηθεί ο βαθμός βίο-αποικοδόμησης του υποστρώματος υπολογίστηκε η μείωση των πηητικών στερεών σε σχέση με την περιεκτικότητα του αρχικού υλικού (τύπος 7.4.1., βλέπε § 7.4.) και οι τιμές της απεικονίστηκαν στο Διάγραμμα 10.vi. Οι μεταβολές που σημειώθηκαν μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου δείγματος δεν είναι άμεσα συγκρίσιμες με τις υπόλοιπες, διότι μεσολάβησε μεγάλο χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δειγματοληψιών.



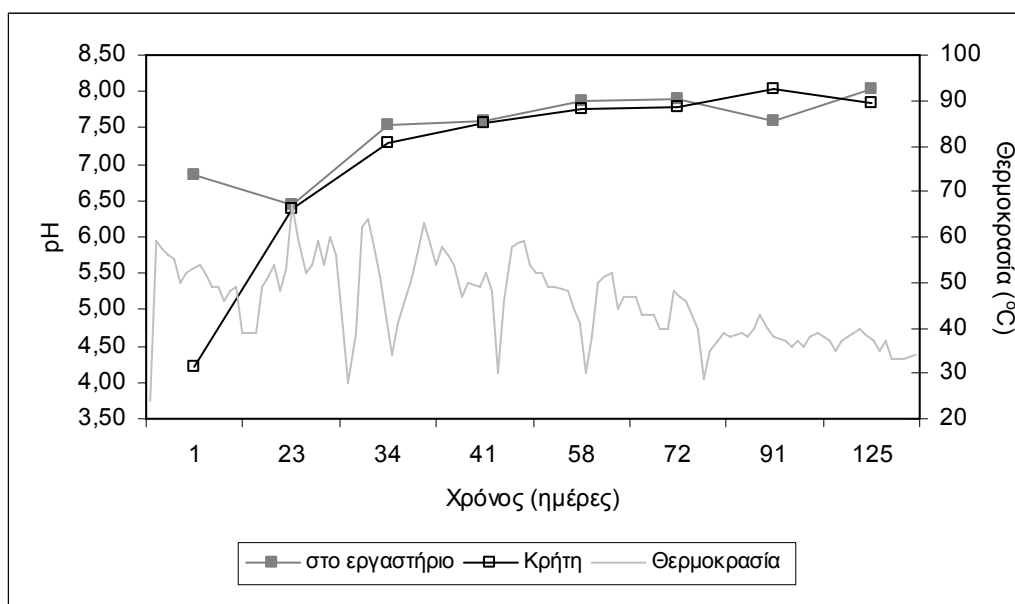
Διάγραμμα 10.vi.

Η διακύμανση της μείωσης του % ποσοστού των πηητικών στερεών κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Σημειώνεται επιπλέον η διακύμανση της θερμοκρασίας υποστρώματος.

Η συνολική μείωση στα πτητικά στερεά που σημειώθηκε στο υποστρώμα, βάσει των μετρήσεων του εργαστηρίου στην Αθήνα, ήταν της τάξης του 71,63%. Το αντίστοιχο ποσοστό, που προέκυψε από τις μετρήσεις του εργαστηρίου στην Κρήτη, ήταν 63,63%. Αξιοσημείωτο είναι ότι λίγο πριν το τέλος περίπου της θερμοφιλικής φάσης, δηλαδή την 58^η ημέρα της κομποστοποίησης, το ποσοστό των πτητικών είχε μειωθεί κατά 64,01% σύμφωνα με την εκτίμηση της Αθήνας ή κατά 52,31% βάσει των μετρήσεων της Κρήτης. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10.vi., η μείωση των πτητικών στερεών εμφάνισε χαμηλές τιμές από τη στιγμή που σημειώθηκε η μέγιστη θερμοκρασία έως ότου η θερμοκρασία άρχισε να πέφτει. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με την αναφορά των Papadimitriou και Balis (1996).

10.5. Η οξύτητα

Στον Πίνακα 10.1 δίνονται οι αρχικές τιμές του pH για τα κλαδοκάθαρα, τα τροφικά υπολείμματα και το 1:1 μίγμα αυτών, όπως μετρήθηκαν στην Κρήτη, ενώ στο Διάγραμμα 10.vii. οι τιμές του pH που σημειώθηκαν καθ' όλη την πορεία της κομποστοποίησης.



Διάγραμμα 10.vii.

Η διακύμανση του pH με το χρόνο. Στο διάγραμμα απεικονίζεται και η διακύμανση της θερμοκρασίας του υποστρώματος.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα προβάλλονται επιπλέον, οι διακυμάνσεις του pH των δειγμάτων που εστάλησαν στο εργαστήριο, όπως αυτές προσδιορίστηκαν 2 έως 4 ώρες πριν τις μικροβιακές και βιοτεχνολογικές αναλύσεις.

Με εξαίρεση το αρχικό δείγμα, οι τιμές παρουσιάζουν ανοδική πορεία (από 4,21 έως 7,84 την 125^η ημέρα σύμφωνα με την Κρήτη, από 6,85 έως 8,03 σύμφωνα με την Αθήνα), γεγονός που υποστηρίζεται από τη διεθνή βιβλιογραφία. Οι Benito *et al.* (2003) παρατήρησαν

ότι οι τιμές του pH σε «πράσινα» απόβλητα, αυξάνονταν κατά την πρόοδο της κομποστοποίησης -από 6,9 την ημέρα της εγκατάστασης σε 8,1 την 190^η ημέρα.

Το pH του αρχικού δείγματος, υπολογίστηκε 4,21 στην Κρήτη και 6,85 στην Αθήνα. Η μέτρηση της Κρήτης αντανakλάει πειστικότερα τις αρχικές ιδιότητες του μίγματος και είναι σύμφωνη με πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές (Eklind *et al.*, 1997). Η μεγάλη απόκλιση που παρουσιάζει η μέτρηση στην Αθήνα, πιθανόν να οφείλεται στο ότι το δείγμα παρέμεινε στους 4°C για 20 ημέρες πριν φτάσει στο εργαστήριο. Η υψηλή τιμή του pH που μετρήθηκε στην Αθήνα, προσεγγίζει την τιμή που μετρήθηκε την 20^η ημέρα της κομποστοποίησης (pH 7,15). Η διαπίστωση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι η βίο-αποικοδόμηση συνεχίστηκε και στους 4°C. Αν η υπόθεση αυτή αποδειχθεί ορθή, τότε ίσως μπορεί να ερμηνευτεί με την υπόθεση των Atlas and Bartha (1981), σχετικά με τη δράση δύο μικροβιακών κοινοτήτων στην αρχή της κομποστοποίησης: μίας μεσόφιλης οξυάντοχης (π.χ. μυκήτων) και μίας θερμόφιλης οξύφοβης. Οι 4°C ενδεχομένως να είναι εντός του εύρους θερμοκρασιών της πρώτης μικροβιακής κοινότητας.

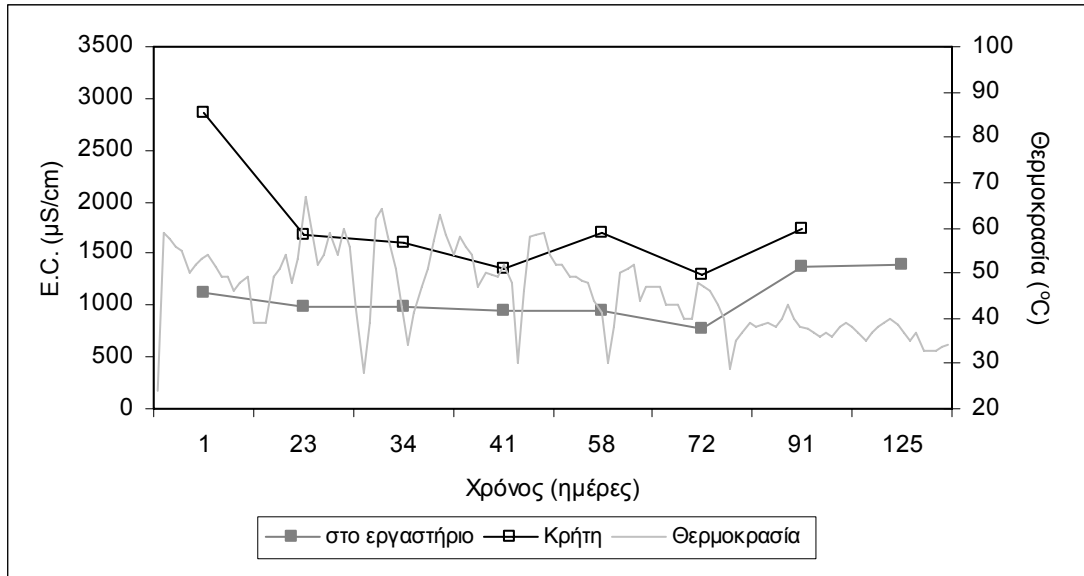
10.6. Ο λόγος C/N

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.1., ο λόγος C/N για τα κλαδοκάθαρα και τα τροφικά υπολείμματα ήταν, αντίστοιχα, 138,44 και 25,16. Το ίδιο μέγεθος για το 1:1 μίγμα τους έλαβε κατά την εγκατάσταση τιμή 41,65, ενώ κατά το 1^ο και 2^ο γύρισμα, 105,80 και 34,51, αντίστοιχα. Από τις τιμές των αρχικών υλικών, γίνεται εμφανές ότι η μίξη τους ήταν αναγκαία προκειμένου να εξελιχθεί απρόσκοπτα η διαδικασία της κομποστοποίησης. Η τιμή που σημειώθηκε στο 1^ο γύρισμα, πιθανόν να οφείλεται σε λάθος κατά τη δειγματοληψία, λόγω της ετερογένειας του υλικού. Είναι πιθανόν, το δείγμα να αποτελείτο από μεγαλύτερο ποσοστό κλαδοκάθαρων.

10.7. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα

Στον Πίνακα 10.1 δίνονται οι τιμές της Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας (E.C.) των κλαδοκάθαρων, των τροφικών υπολειμμάτων και του (1:1) μίγματος αυτών. Ενώ, στο Διάγραμμα 10.iv. απεικονίζονται γραφικά οι αντίστοιχες τιμές δειγμάτων που ελήφθησαν κατά την κομποστοποίηση, τόσο στο εργαστήριο της Κρήτης όσο και της Αθήνας.

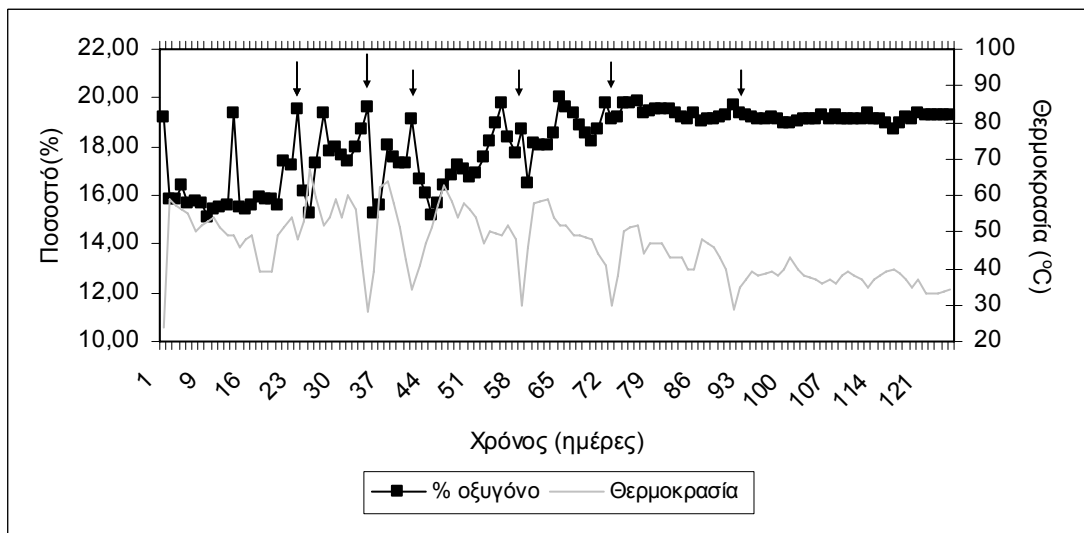
Παρότι, οι μετρήσεις στην Κρήτη διέφεραν από τις μετρήσεις στην Αθήνα (εξαιτίας των πειραματικών χειρισμών), εντούτοις η τάση τους φαίνεται όμοια. Κατά την πορεία της κομποστοποίησης, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διακύμανση των τιμών. Έως την 72^η ημέρα οι τιμές παρουσίαζαν σταθερότητα, ενώ μετά παρουσίασαν μία μικρή άνοδο. Πάντως, δεν ξεπέρασαν την τιμή των 4mS/cm που έχει οριστεί ως ανώτατο όριο εφαρμογής των κομποστ για την καλλιέργεια φυτών (Μανιός και Μανιαδάκης, 2001).

**Διάγραμμα 10.viii.**

Η διακύμανση της Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας (E.C.) με το χρόνο και τη θερμοκρασία.

10.8. Οι μετρήσεις των αερίων

Στο διάγραμμα 10.ix. απεικονίζεται γραφικά η διακύμανση της εκατοστιαίας συγκέντρωσης O_2 στο υπόστρωμα της κομποστοποίησης με το χρόνο. Καθ' όλη την περίοδο παρακολούθησης του υποστρώματος, το ποσοστό του O_2 κυμάνθηκε πάνω από 15%, τιμή που διασφαλίζει ότι τουλάχιστον στους μακροπόρους είχαν διαμορφωθεί αερόβιες συνθήκες.

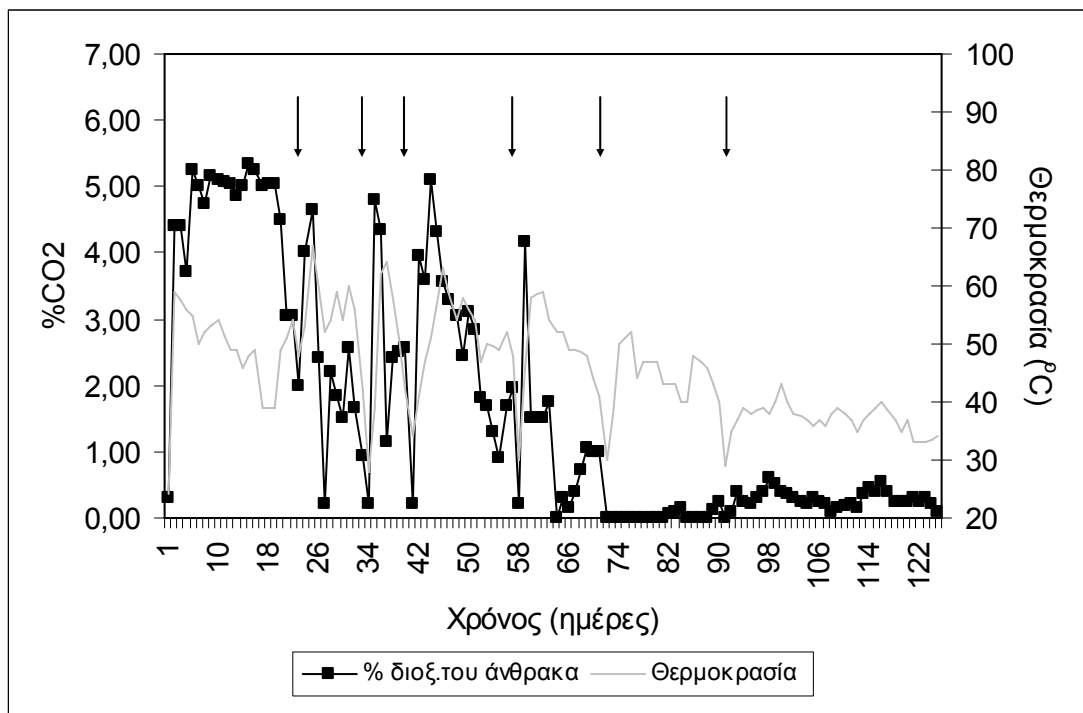
**Διάγραμμα 10.ix.**

Διακύμανση της συγκέντρωσης του O_2 στο υπόστρωμα με το χρόνο.

Με βέλη σημειώνονται τα γυρίσματα.

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος σε μοριακό οξυγόνο (O_2) καθορίζεται από τον εκάστοτε ρυθμό διάχυσης και το μικροβιακό μεταβολισμό (Miller, 1996), η αύξηση του εκατοστιαίου ποσοστού O_2 αντανάκλαει τη μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας καθώς η διαδικασία της κομποστοποίησης εξελίσσεται. Αυτό γίνεται ευκολότερα κατανοητό από τις μεταβολές στη συγκέντρωση του O_2 που σημειώνονταν μετά τα γυρίσματα του υποστρώματος, αλλά και από τους πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων (§1.1, διάγραμμα 11.i.). Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί των ολικών μεσόφιλων και θερμοφιλων βακτηρίων παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές μέχρι την 93^η ημέρα, γεγονός που συνοδεύεται από χαμηλές τιμές O_2 .

Στο Διάγραμμα 10.x. απεικονίζεται η συγκέντρωση CO_2 (σε εκατοστιαίο ποσοστό) με το χρόνο. Όπως ήταν αναμενόμενο οι τιμές κυμαίνονται αντιστρόφως ανάλογα με τις τιμές του O_2 και σχεδόν αγγίζουν το 0 μετά από τα γυρίσματα. Οι μηδενικές τιμές που παρουσιάζονται την 27^η και 64^η ημέρα πιθανόν να οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα.



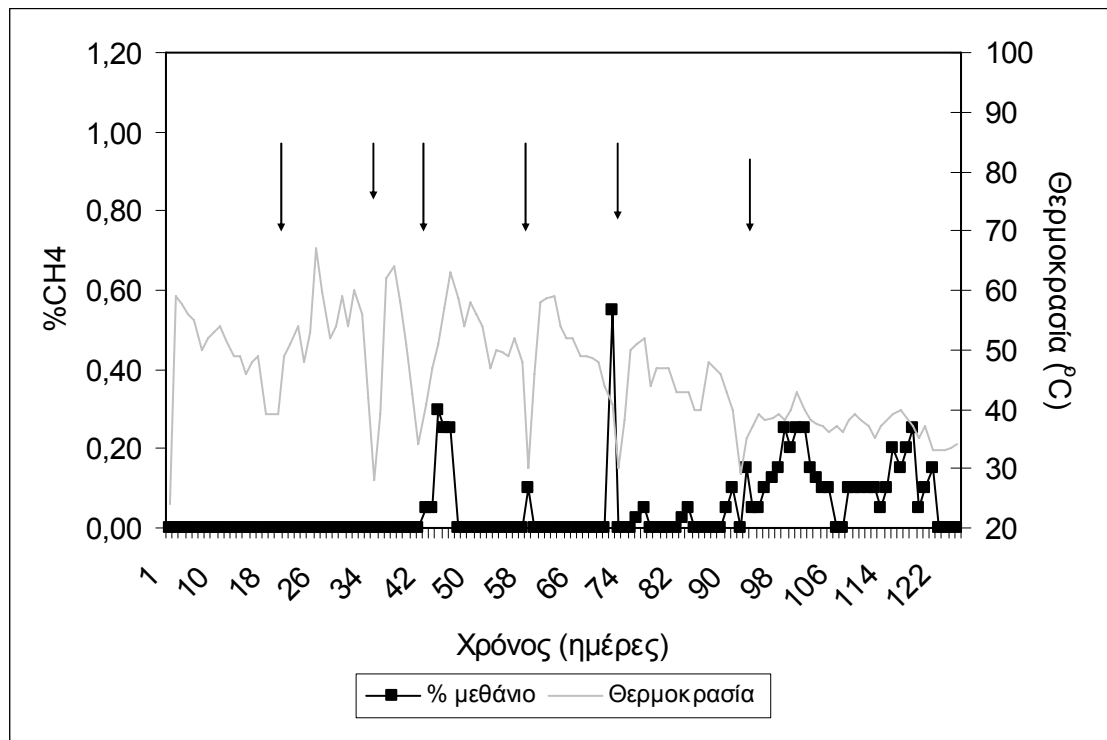
Διάγραμμα 10.x.

Διακύμανση της συγκέντρωσης του $\%CO_2$ στο υπόστρωμα με το χρόνο. Με βέλη σημειώνονται οι ημέρες των γυρισμάτων.

Από την 23^η ημέρα που πραγματοποιήθηκε το πρώτο γύρισμα μέχρι το τέλος παρακολούθησης της θερμοκρασίας, οι τιμές του CO_2 ήταν σε συμφωνία με τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας. Οι παρεκκλίσεις που παρατηρήθηκαν έως την 23^η ημέρα, πιθανόν να οφείλονται στους χειρισμούς του αρχικού υποστρώματος. Σύμφωνα με τους Beck-Friis *et al.*

2001) οι μέγιστες τιμές του CO₂ σημειώθηκαν κατά τη μετάβαση από το θερμόφιλο στάδιο στο μεσόφιλο. Στην παρούσα εργασία, σημειώθηκαν λίγο νωρίτερα, όταν είχαν διανυθεί τα 2/3 του θερμόφιλου σταδίου.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα υπό κομποστοποίηση οργανικά υποστρώματα είναι πιθανόν είτε να συνυπάρχουν αερόβια και αναερόβια μικροπεριβάλλοντα, το ένα κοντά στο άλλο, είτε να υπάρχουν μεγαλύτερες ζώνες με αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Miller *et al.*, 1989). Με αποτέλεσμα, ακόμη και όταν η παρουσία οξυγόνου στους πόρους του υποστρώματος είναι αποδεδειγμένη, να ανιχνεύονται προϊόντα αναερόβιου μεταβολισμού, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N₂O) και το μεθάνιο (CH₄) (Beck-Friis *et al.*, 2000, Hellebrand, 1998, Hellmann *et al.*, 1997, Schattner-Schmidt *et al.*, 1995). Στην υπό εξέταση διαδικασία κομποστοποίησης ανιχνεύτηκε ποσότητα CH₄, και οι συγκεντρώσεις της εκφρασμένες σε εκατοστιαία ποσοστά παρουσιάζονται στο διάγραμμα 10.xi.



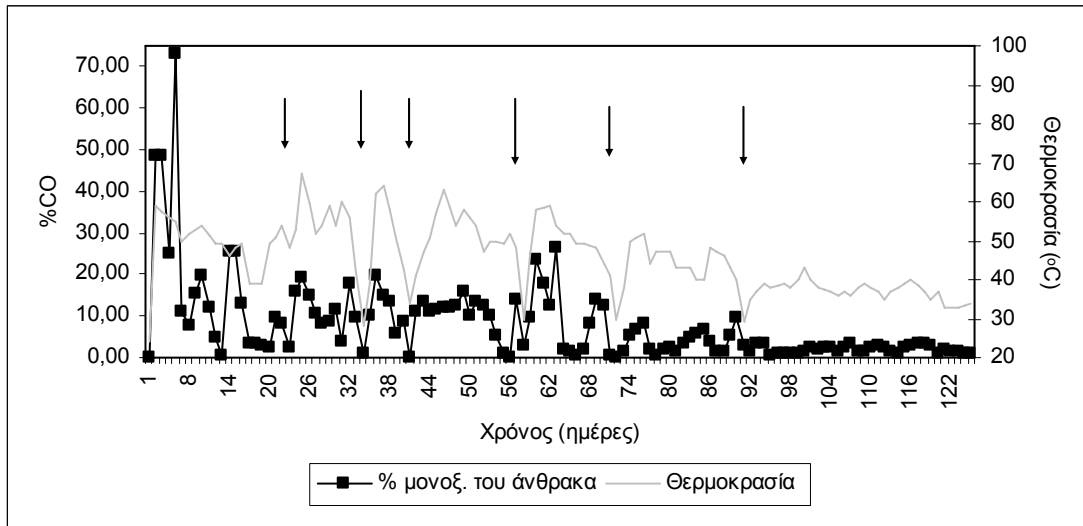
Διάγραμμα 10.xi.

Διακύμανση της συγκέντρωσης του CH₄ στο υπόστρωμα με το χρόνο. Με τα βέλη σημειώνονται τα γυρίσματα.

Οι πρώτες μετρήσεις ελήφθησαν μεταξύ της 42^{ης} και 46^{ης} ημέρας, όταν η διαδικασία διένυε ακόμη το θερμόφιλο στάδιο και ενώ είχε πραγματοποιηθεί γύρισμα την 41^η ημέρα. Γεγονός, που δεν συνδέεται άμεσα με την επιβεβαιωμένη δραστηριότητα θερμόφιλων μικροοργανισμών που παράγουν CH₄ (Jäckel *et al.* 2005). Η παραγωγή CH₄ που σημειώθηκε την 58^η, 71^η και 91^η ημέρα της διαδικασίας αναστάληκε με το γύρισμα του σωρού. Από την

93^η ημέρα και έπειτα, διαπιστώνεται συχνότερα παραγωγή CH₄ η οποία ενδεχομένως να μπορούσε να συνδεθεί με την μείωση των ολικών βακτηρίων.

Στο διάγραμμα 10xii. απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του CO όπως μετρήθηκαν από την 1^η έως την 125^η ημέρα της εγκατάστασης. Οι υψηλές τιμές που σημειώθηκαν το πρώτο δεκαήμερο της διαδικασίας, πιθανόν να δείχνουν ότι η μεταβολική δράση ήταν τόσο μεγάλη, που η οξυγόνωση του C ήταν ατελής.



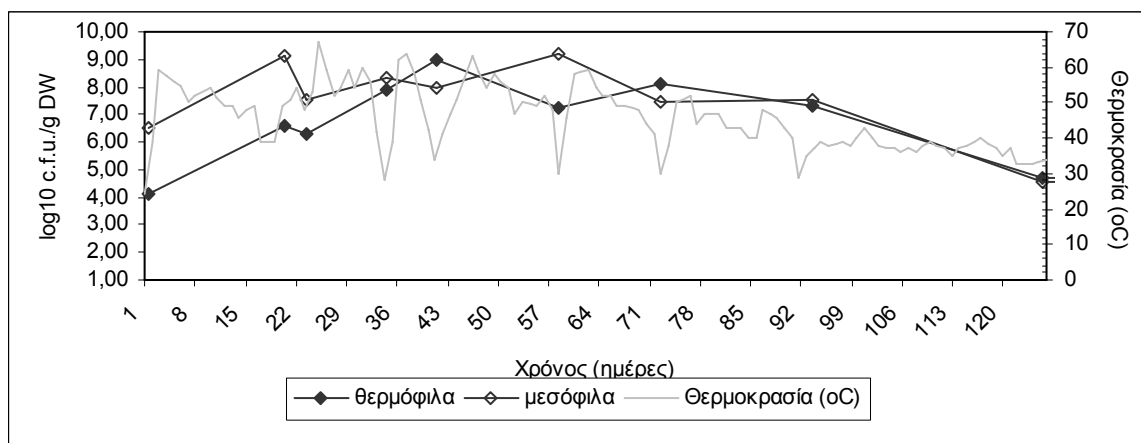
Διάγραμμα 10.xii.

Διακύμανση της συγκέντρωσης του %CO στο υπόστρωμα με το χρόνο. Με τα βέλη σημειώνονται τα γυρίσματα.

11

Μετρήσεις μικροβιακών πληθυσμών με κλασικές μεθόδους**11.1. Ολικά βακτήρια**

Η διακύμανση των μικροβιακών πληθυσμών των ολικών μεσόφιλων και θερμόφιλων βακτηρίων απεικονίζεται στο διάγραμμα 11.i. Στο αρχικό υλικό, ο πληθυσμός των ολικών μεσόφιλων βακτηρίων ήταν κατά μέσο όρο $3,42 \cdot 10^6$ c.f.u./g DW, ενώ των θερμόφιλων $1,27 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW. Από την 23η ημέρα που πραγματοποιήθηκε το 1ο γύρισμα έως την 58η που η θερμόφιλη φάση της κομποστοποίησης σχεδόν ολοκληρώθηκε, ο πληθυσμός των ολικών μεσόφιλων κυμάνθηκε από $3,35 \cdot 10^7$ c.f.u./g DW έως $1,70 \cdot 10^9$ c.f.u./g DW, ενώ ο πληθυσμός των θερμόφιλων κυμάνθηκε από $2,13 \cdot 10^6$ c.f.u./g DW έως $1,75 \cdot 10^7$ c.f.u./g DW.

**Διάγραμμα 11.i.**

Η διακύμανση του πληθυσμού των ολικών θερμόφιλων και μεσόφιλων βακτηρίων κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

Η μέγιστη τιμή των μεσόφιλων πληθυσμών ($1,75 \cdot 10^7$ c.f.u./g DW) σημειώθηκε στο τέλος του θερμόφιλου σταδίου. Σύμφωνα με τους Droffner *et al.* (1995) ορισμένα μεσόφιλα βακτήρια διαθέτουν μηχανισμούς επιβίωσης και αναπαραγωγής σε υψηλές τιμές της θερμοκρασίας. Από το μέσο έως το τέλος του θερμόφιλου σταδίου, οι τιμές των ολικών μεσόφιλων σημείωσαν πτωτική πορεία. Ο πληθυσμός των ολικών μεσόφιλων κατά το θερμόφιλο στάδιο κυμάνθηκε στα ίδια σχεδόν επίπεδα με τον πληθυσμό των θερμόφιλων ολικών βακτηρίων. Γεγονός, που δεν συμφωνεί με το συμπέρασμα του Miller (1996), ότι όταν η θερμοκρασία φτάσει περίπου στους 45°C , τα μεσόφιλα βακτήρια, σταδιακά θανατώνονται ή αδρανοποιούνται και τα διαδέχονται οι

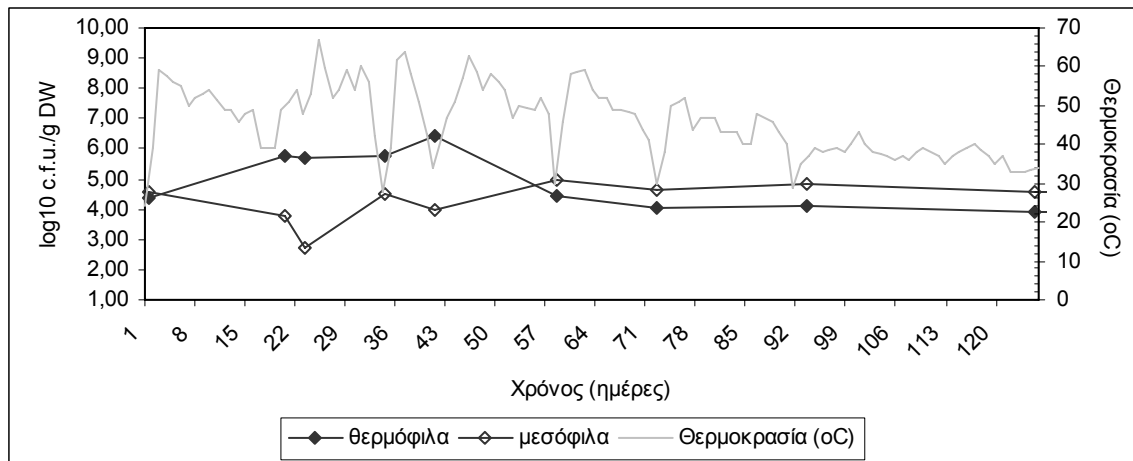
θερμόφιλοι πληθυσμοί. Κατά την 7^η δειγματοληψία, η οποία πραγματοποιήθηκε κατά το στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας, ο πληθυσμός των θερμόφιλων παρουσίασε μία μικρή άνοδο. Από την 8^η ωστόσο, και έπειτα άρχισε να μειώνεται – έως το τέλος του συγκεκριμένου σταδίου με γρήγορο ρυθμό και στο στάδιο ωρίμανσης με μικρότερο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις παρατηρήσεις των Fogarty και Tuoninen (1991) και Hassen et al. (2001).

Η μέγιστη τιμή των θερμόφιλων πληθυσμών ($1,07 \cdot 10^9$ c.f.u./g DW) σημειώθηκε την 41η ημέρα, κατά το θερμόφιλο στάδιο και αφού η θερμοκρασία είχε σημειώσει τις υψηλότερες της τιμές. Από τη 41η ημέρα και έπειτα, η διακύμανση του πληθυσμού των θερμόφιλων ολικών ακολούθησε τη διακύμανση της θερμοκρασίας του υλικού. Συγκεκριμένα, παρουσίασε πτώση στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα να φτάσει το επίπεδο του πληθυσμού των mesóφιλων βακτηρίων και έπειτα –στο στάδιο της ωρίμανσης- σταθεροποιήθηκε.

Η γενική τάση που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς τόσο των θερμόφιλων όσο και των mesóφιλων βακτηρίων, από το στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας και μετά, σε σχέση με το θερμόφιλο στάδιο, ήταν πτωτική. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Ryckeboer *et al.* (2003) και Stenbro – Olsen (1998), αλλά σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Beffa *et al.* (1996).

11.2. Σποριογόνια βακτήρια

Η διακύμανση του πληθυσμού των mesóφιλων και θερμόφιλων σποριογόνων βακτηρίων απεικονίζεται στο διάγραμμα 11.ii. Διακυμάνσεις στους πληθυσμούς των θερμόφιλων, αλλά και των mesóφιλων σποριογόνων, παρουσιάζονται μονάχα στο θερμόφιλο στάδιο της κομποστοποίησης.



Διάγραμμα 11.ii.

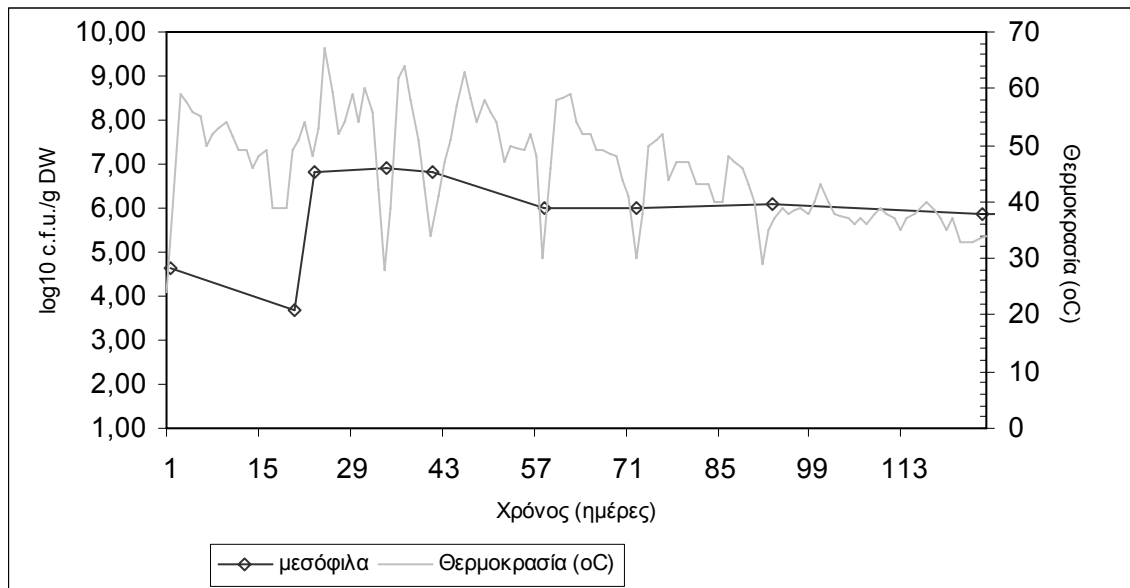
Η διακύμανση των σποριογόνων βακτηρίων με το χρόνο.

Στο στάδιο αυτό, ο πληθυσμός των μεσόφιλων σποριογόνων κυμάνθηκε από $3,62 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW έως $4,21 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW, ενώ των θερμοφίλων από $2,30 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW έως $1,17 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW.

Από την έναρξη του σταδίου πτώσης της θερμοκρασίας έως και το τέλος του σταδίου ωρίμανσης, οι τιμές των πληθυσμών παρέμειναν σχεδόν σταθερές, στο επίπεδο των μετρήσεων που ελήφθησαν στο αρχικό υλικό. Σύμφωνα με αποτελέσματα εργασιών των Tuomela et al. (2000) και Fogarty και Tuoninen (1991), ο πληθυσμός των σποριογόνων εμφανίζεται μεγαλύτερος στο θερμοφίλο στάδιο. Διχογνωμούν, ωστόσο, εν μέρει με τους Hassen et al. (2001), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού στο μεσόφιλο στάδιο και στην αρχή –μόνο- του θερμοφίλου σταδίου, και στη συνέχεια, πτώση που συνεχίστηκε και στο στάδιο της ωρίμανσης. Από τις μετρήσεις που ελήφθησαν στην παρούσα εργασία, φαίνεται ότι ο πληθυσμός των μεσόφιλων σποριογόνων βακτηρίων μειώνεται κατά το θερμοφίλο στάδιο και επανακάμπτει στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας για να παραμείνει σταθερός έως το στάδιο της ωρίμανσης. Αντίθετα, ο πληθυσμός των θερμοφίλων αυξήθηκε σημαντικά κατά το θερμοφίλο στάδιο και επανήλθε στο αρχικό του επίπεδο στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας.

11.3. Κυτταρινολυτικά βακτήρια

Στο διάγραμμα 11.iii. παρουσιάζεται η καμπύλη διακύμανσης του πληθυσμού των μεσόφιλων κυτταρινολυτικών βακτηρίων. Όπως, φαίνεται η μέγιστη τιμή ($8,06 \cdot 10^6$ c.f.u./g DW) σημειώθηκε στο μέσο του θερμοφίλου σταδίου, την 34^η ημέρα και ακολουθήθηκε από μία μικρή



Διάγραμμα 11.iii.

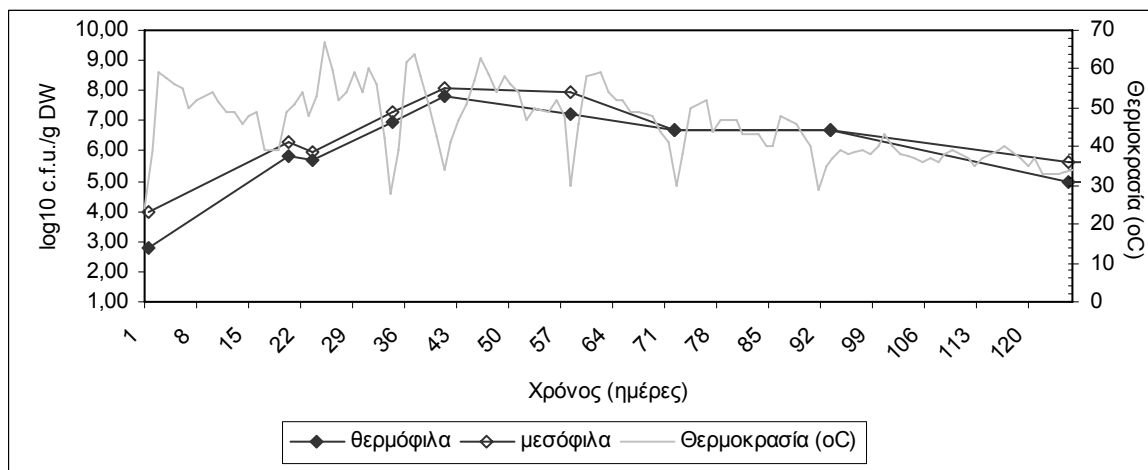
Η διακύμανση του πληθυσμού των μεσόφιλων κυτταρινολυτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

πτώση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα που έχουν εξαγάγει οι Dan Levanon και Pluda (2002) και Ryskeboer *et al.* (2003), και πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Shilesky and Maniotis, 1969; Gray *et al.*, 1971).

Στα στάδια που ακολούθησαν, οι τιμές του πληθυσμού παρουσίασαν σχετική σταθερότητα. Η διατήρηση αυτή των τιμών σε υψηλό επίπεδο κατά το στάδιο της ωρίμανσης, ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η κυτταρίνη δεν αποτελεί εύκολα αφομοιώσιμο υλικό. Έτσι, η αποικοδόμησή της έπεται της αποικοδόμησης άλλων ευκολότερα αποικοδομήσεων ενώσεων. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι πληθυσμοί δεν ήταν τόσο υψηλοί όσο στο τέλος του θερμοφιλου σταδίου, πιθανόν να εξηγείται είτε από την πτώση του ποσοστού υγρασίας στο υλικό, η οποία κάνει την κυτταρίνη απρόσβλητη από τη δράση των ενζύμων, είτε την παρουσία προστατευτικών ουσιών, όπως η λιγνίνη (Stutzenberger *et al.*, 1970).

11.4. Αμυλολυτικά βακτήρια

Στο διάγραμμα 11.iv. παρουσιάζεται η καμπύλη διακύμανσης του πληθυσμού των μεσόφιλων και θερμοφίλων αμυλολυτικών βακτηρίων. Έντονες διακυμάνσεις στους συγκεκριμένους πληθυσμούς των παρουσιάζονται μονάχα στο θερμοφιλο στάδιο της κομποστοποίησης. Από την 23^η έως την 41^η ημέρα της κομποστοποίησης, ο πληθυσμός των μεσόφιλων βακτηρίων κυμάνθηκε από $9 \cdot 10^5$ c.f.u./g DW έως $1,25 \cdot 10^8$ c.f.u./g DW, ενώ των θερμοφίλων από $5,41 \cdot 10^5$ c.f.u./g DW έως $6,96 \cdot 10^9$ c.f.u./g DW. Από την 58^η ημέρα έως την 125^η, οι πληθυσμοί σημείωσαν πτώση, η οποία ακολουθήθηκε από σταθεροποίηση στο στάδιο της ωρίμανσης.



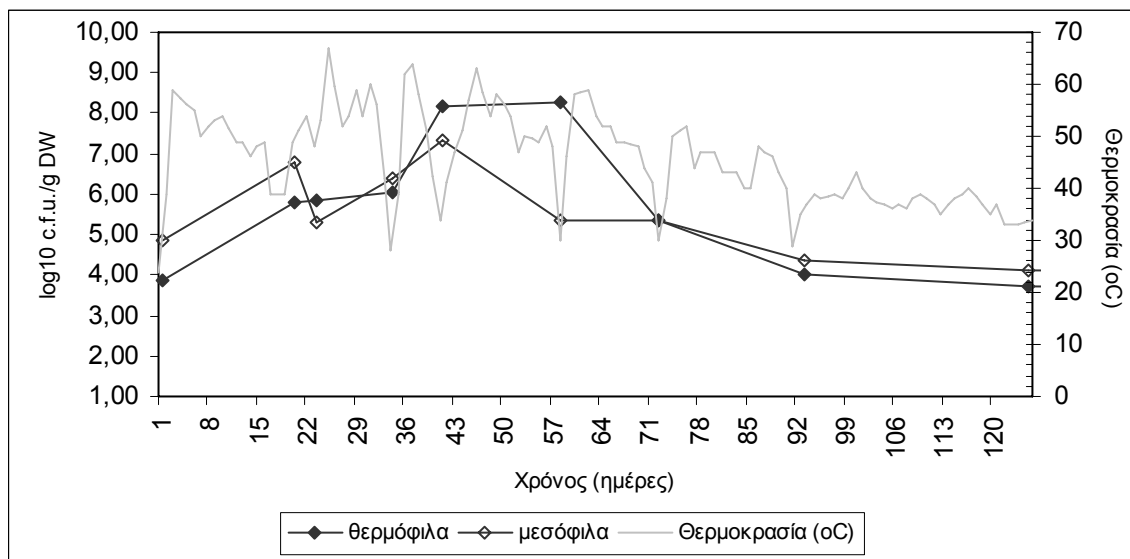
Διάγραμμα 11.iv.

Η διακύμανση του πληθυσμού των θερμοφίλων και μεσόφιλων αμυλολυτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

Σύμφωνα με τους Ryskeboer *et al.* (2003), η παρουσία των αμυλολυτικών βακτηρίων γίνεται έντονη κυρίως μετά το τέλος του θερμόφιλου σταδίου, και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων αμυλόζης, μετά τη διάσπαση ημικυτταρινών, κυτταρινών και λιγνοκυτταρινών. Κάτι τέτοιο δεν ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Η παρουσία των αμυλολυτικών βακτηρίων ήταν έντονη στο θερμόφιλο στάδιο, ενώ η δράση των κυτταρινολυτικών βακτηρίων παρουσιάστηκε στο τέλος του σταδίου αυτού. Οι μεγάλοι πληθυσμοί των αμυλολυτικών κατά το θερμόφιλο στάδιο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, πιθανόν να εξηγούνται με μεγάλες συγκεντρώσεις αμυλόζης στο αρχικό δείγμα, παρά την ανάμιξή του με κλαδοκάθαρα.

11.5. Πρωτεολυτικά βακτήρια

Στο διάγραμμα 11.v. παρουσιάζεται η καμπύλη διακύμανσης του πληθυσμού των μεσόφιλων και θερμόφιλων πρωτεολυτικών βακτηρίων. Από τη 2^η ημέρα έως την 72^η, οπότε και ολοκληρώνεται το θερμόφιλο στάδιο, παρουσιάζονται έντονες διακυμάνσεις στους πληθυσμούς



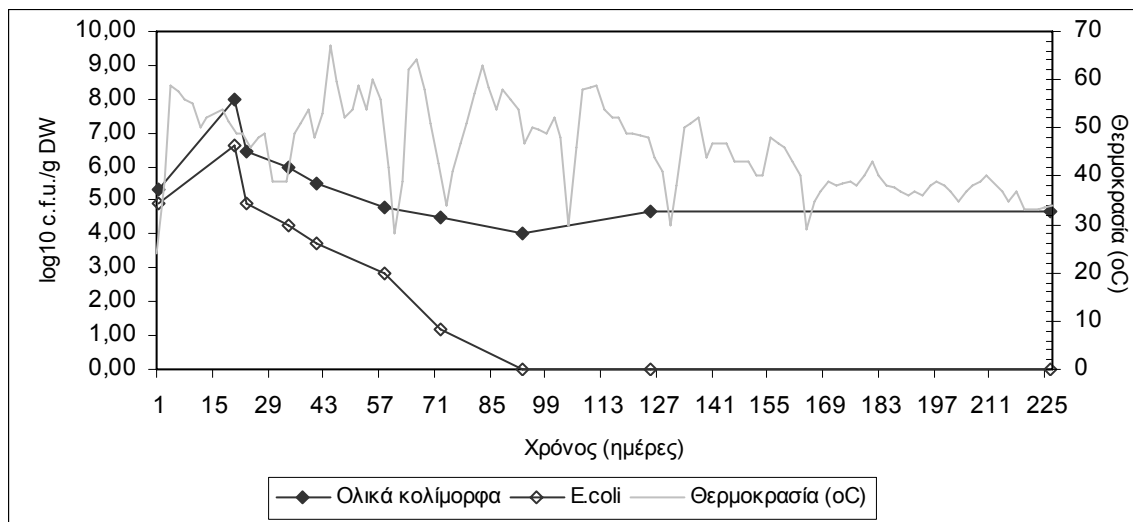
Διάγραμμα 11.v.

Η διακύμανση του πληθυσμού των θερμόφιλων και μεσόφιλων πρωτεολυτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

των συγκεκριμένων βακτηρίων. Από την 73^η ημέρα έως το τέλος των παρατηρήσεων (τη 226^η ημέρα), ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός. Αξιοσημείωτο είναι ο πληθυσμός των μεσόφιλων πρωτεολυτικών σημείωσε τη μέγιστη τιμή ($2,07 \cdot 10^7$ c.f.u./g DW) του στο μέσο περίπου του θερμόφιλου σταδίου (την 41^η ημέρα) και έπειτα άρχισε να μειώνεται. Ο πληθυσμός των θερμόφιλων σημείωσε τη μέγιστη τιμή του ($1,89 \cdot 10^8$ c.f.u./g DW) την 58^η ημέρα, αλλά έλαβε υψηλές τιμές καθόλη τη διάρκεια του θερμόφιλου σταδίου. Οι μεσόφιλοι πληθυσμοί ήταν υψηλότεροι από τους θερμόφιλους τις πρώτες ημέρες της διαδικασίας της κομποστοποίησης, γεγονός που αντιστράφηκε κατά το θερμόφιλο στάδιο. Στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας, καθώς και στο στάδιο ωρίμανσης, οι τιμές των μεσόφιλων και των θερμόφιλων δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Η πτώση που παρουσιάζεται από την 63^η ημέρα και μετά, βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Rysckeboer *et al.* (2003), και οφείλεται πιθανόν στην εξάντληση των πρωτεϊνών στο υπό κομποστοποίηση υλικό.

11.6. Περιπτωματικοί δείκτες

Οι τιμές που παρουσίασε ο πληθυσμός των ολικών κολλίμορφων και του *E. coli* κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης απεικονίζονται στο διάγραμμα 11.vi.



Διάγραμμα 11.vi.

Η διακύμανση του πληθυσμού των Ολικών Κολλίμορφων και του *E. coli* κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

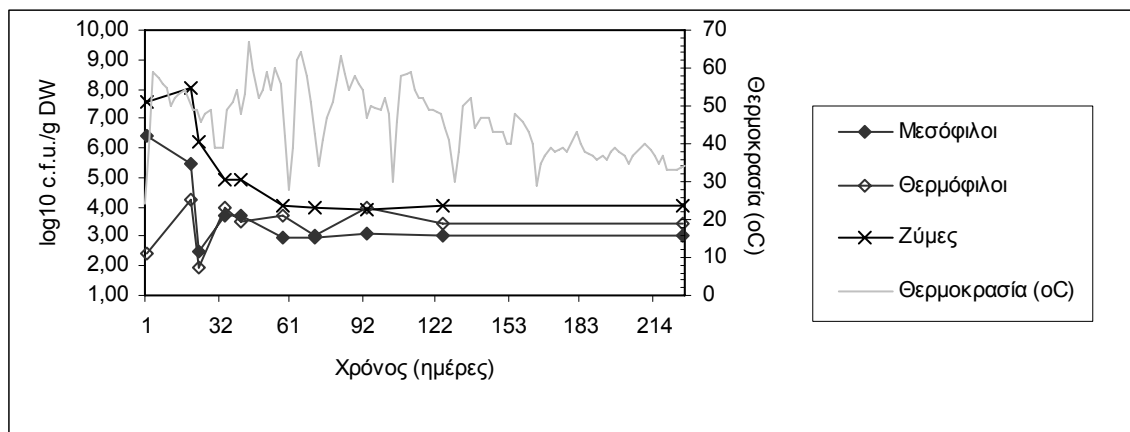
Όπως φαίνεται, ο πληθυσμός των *E. coli* στο αρχικό δείγμα ήταν ($8,37 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW), αυξήθηκε έως την 20^η ημέρα ($4,21 \cdot 10^6$ c.f.u./g DW) και έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία. Από την 93^η ημέρα της διαδικασίας της κομποστοποίησης και μετά οι τιμές του δεν ήταν ανιχνεύσιμες.

Ενώ, μέχρι τη 226^η ημέρα που πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία δεν παρουσιάστηκε ανάκαμψη του πληθυσμού, όπως επισημανθεί σε παλιότερες βιβλιογραφικές αναφορές (Burge *et al.*, 1987).

Αναφορικά με τον πληθυσμό των ολικών κολίμορφων, στο αρχικό δείγμα ήταν της τάξης των $2,01 \cdot 10^5$ c.f.u./g DW. Η μέγιστη τιμή σημειώθηκε την 20^η ημέρα ($1,01 \cdot 10^8$ c.f.u./g DW). Από την 20^η ημέρα έως την 92^η, ο πληθυσμός παρουσίασε πτωτική τάση, αλλά δεν άγγιξε μη ανιχνεύσιμες τιμές. Την 125^η ημέρα σημειώθηκε μικρή αύξηση του πληθυσμού (από $1,04 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW σε $4,71 \cdot 10^4$ c.f.u./g DW). Το γεγονός αυτό δείχνει, ότι οι συνθήκες που διαμορφώθηκαν στο θερμόφιλο στάδιο της συγκεκριμένης διαδικασίας δεν ήταν ικανές να εξουδετερώσουν όλα τα κολίμορφα βακτήρια, από τα οποία κάποια μπορεί να ανήκουν και στην μικροχλωρίδα του εδάφους ή των συστατικών του κομποστ. Ο πληθυσμός των περιττωματικών κολίμορφων θεωρείται πιο ακριβής περιττωματικός δείκτης, αλλά ακόμη καλύτερα ο πληθυσμός του *E.coli*, το οποίο όμως εξουδετερώνεται ήδη από την 92 ημέρα. Παρατηρούμε ότι οι υψηλές θερμοκρασίες του θερμόφιλου σταδίου μείωσαν και σταδιακά μηδένισαν τον πληθυσμό του βακτηρίου αυτού.

11.7. Μύκητες και ζύμες

Στο διάγραμμα 11.vii. εκτίθενται οι μετρήσεις των πληθυσμών των μεσόφιλων και θερμόφιλων μυκήτων, όπως και των ζυμών που αναπτύχθηκαν κατά τη διαδικασία της υπό εξέταση κομποστοποίησης. Δεν ανιχνεύτηκαν ζύμες κατά την επώαση στους 55°C. Από τη 20^η ημέρα που σημειώθηκε η μέγιστη του τιμή ($1,02 \cdot 10^8$ c.f.u./g DW) έως την 72^η ο πληθυσμός τους παρουσίασε πτωτική τάση. Από την 93^η έως τη 226^η παρέμεινε σταθερός.



Διάγραμμα 11.vii.

Η διακύμανση του πληθυσμού των μυκήτων και των ζυμών.

Με εξαίρεση τα τρία πρώτα δείγματα, δηλαδή από την 1^η ημέρα μέχρι και την 23^η της διαδικασίας, οι θερμοφιλοι μύκητες ήταν πληθυσμιακά περισσότεροι από τους μεσόφιλους. Αξιοσημείωτο, πάντως, είναι ότι ο πληθυσμός των θερμοφίλων έλαβε υψηλές τιμές και μετά το θερμοφιλο στάδιο. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, θερμοκρασίες άνω των 55°C, αναστέλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων (Fermor *et al.* 1979; Kane and Mullins, 1973; Brock 1978). Επιπλέον, υπάρχει η άποψη ότι οι πληθυσμοί των μυκήτων επανακάμπτουν στα υποστρώματα της κομποστοποίησης, όταν η θερμοκρασία πέφτει και οι ενώσεις που κυριαρχούν είναι η κυτταρίνη και η λιγνίνη (Chang and Hudson, 1967; Fergus and Sinden, 1969; De Bertoldi *et al.*, 1983; Ryckeboer *et al.* 2003).

12

Μικροβιολογικές αναλύσεις με μοριακές τεχνικές**12.1. Η ανάλυση των βακτηριακών 16S-rDNA κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης**

Οι ζώνες που διαχωρίστηκαν με την εφαρμογή της DGGE φαίνονται στη φωτογραφία 12.1. Δεδομένου ότι ορισμένες από αυτές εμφανίζονται σε περισσότερα από ένα δείγματα, είναι εμφανές ότι ορισμένοι μικροβιακοί πληθυσμοί εξακολουθούν τη δράση τους κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Υπάρχουν, ωστόσο, ζώνες οι οποίες εμφανίζονται στα δείγματα που ελήφθησαν στο θερμόφιλο στάδιο της κομποστοποίησης και εξασθενούν ή εξαφανίζονται μετά. Όπως, επιπλέον υπάρχουν ζώνες που εμφανίζονται μετά το πέρας του θερμόφιλου σταδίου. Η ποικιλότητα αυτή στην κατανομή των ζωνών διαμορφώνει μία εικόνα για τη μικροβιακή διαδοχή των πληθυσμών. Η μέθοδος δεν είναι ποσοτική και επομένως η ένταση χρώσης (φωτεινότητα) των ζωνών δεν είναι ενδεικτική του μεγέθους των πληθυσμών.

12.2. Φυλογενετική ανάλυση

Από τις ζώνες που διαχωρίστηκαν μόνο μία απομονώθηκε και καθαρίστηκε επιτυχώς. Η ζώνη αυτή απομονώθηκε από το τρίτο δείγμα, το οποίο ελήφθη την 23^η ημέρα όταν πραγματοποιήθηκε το 1^ο γύρισμα. Η σύγκριση των αλληλουχιών του με το γονιδίωμα γνωστών βακτηρίων μέσω του Blastn (Altschul *et al.*, 1997) δίνεται στον πίνακα 12.1 και έδειξε ότι υπάρχει 98% ομοιότητα με το *Sphingobacterium faecium* (IFO 15299).

Το γένος *Sphingobacterium* περιλαμβάνει πέντε είδη (*S. spiritivorum*, *S. multivorum*, *S. mizutaii*, *S. antarcticum*, *S. faecium*, και *S. Thalophilum*), τα οποία έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό την παρουσία σφιγγοφοσφωλιπιδίων και κεραμιδίων, που συνήθως απαντώνται στις μεμβράνες ευκαρυωτικών κυττάρων (Naka *et al.*, 2003). Τα *Sphingobacterium* spp. είναι θετικά στην οξειδάση, αρνητικά στο ινδόλιο, αρνητικά κατά gram και σχηματίζουν κτρινωπές αποικίες. Απομονώνονται από το περιβάλλον, αλλά και από κλινικά δείγματα, όπως αίμα και ούρα, από ασθενείς (Naka *et al.*, 2003).

Πίνακας 12.1

Σύγκριση των αλληλουχιών του με το *Sphingobacterium faecium* (IFO 15299) με Blastn.

Query 12 ACTCTGAAC-AGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTG 70
 |||
 Sbjct 368 ACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTG
 427

Query 71 TCAGGGAATAAACCTTTCTACGTGTAGAAAGCTGAATGTACCTGAAGAATAAGGATCGGC
 130
 |||
 Sbjct 428 TCAGGGAATAAACCTTTCTACGTGTAGAAAGCTGAATGTACCTGAAGAATAAGGATCGGC
 487

Query 131 TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGG
 190
 |||
 Sbjct 488 TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGG
 547

Query 191 GTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCCTATAAGTCAGTGGCGAAAGACGGCAGCTTAACTGTC
 250
 |||
 Sbjct 548 GTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCCTATAAGTCAGTGGTGAAGACGGCAGCTTAACTGTC
 607

Query 251 ACAGTGCCTTTGATACTGTTGACTTGAATCTATTTGAAGTGGGCGGAATAAGACAAGTA
 310
 |||
 Sbjct 608 GCAGTGCCTTTGATACTGTAGGACTTGAATCTATTTGAAGTGGGCGGAATAAGACAAGTA
 667

Query 311 GCGGTGAAATGCATAGATATGTCTTAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAAGTTAG
 370
 |||
 Sbjct 668 GCGGTGAAATGCATAGATATGTCTTAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAAGTTAG
 727

Query 371 TATTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 430
 |||
 Sbjct 728 TATTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 787

Query 431 CGCCCTAACGATGATAACTCGATGTTTGCGATACACAGTTAGCGTCTAAGCGAAAGCGT
 490
 |||
 Sbjct 788 CGCCCTAACGATGATAACTCGATGTTTGCGATACACAGTAAGCGTCCAAGCGAAAGCGT
 847

Query 491 TAAGTTATCCACCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGG 546
 |||
 Sbjct 848 TAAGTTATCCACCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGG 903

Score = 991 bits (500), Expect = 0.0, Identities = 528/536 (98%), Gaps = 1/536 (0%),
 Strand=Plus/Plus

Δ. Συμπεράσματα

13

Συμπεράσματα

1. Το μεσόφιλο στάδιο διήρκεσε δύο ημέρες (από 16 έως 18 Μαρτίου 2005), το θεرمόφιλο 60 ημέρες (από 18 Μαρτίου έως 16 Μαΐου 2005) και το στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας ξεκίνησε από την 62^η ημέρα (16 Μαΐου 2005) και διήρκεσε μέχρι τη 94^η (17 Ιουνίου). Από τη 94^η ημέρα, ο σωρός πέρασε στο στάδιο της ωρίμανσης.
2. Ο όγκος των υλικών παρουσίασε μείωση με το χρόνο. Γεγονός, που ενισχύει την επιλογή της κομποστοποίησης σε εκείνα τα συστήματα διαχείρισης οικιακών αποβλήτων που έχουν κύριο στόχο τη μείωση του όγκου των αποβλήτων.
3. Κατά την πορεία της κομποστοποίησης, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διακύμανση των τιμών της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.
4. Όταν η θερμοκρασία φτάσει περίπου στους 45°C, τα μεσόφιλα βακτήρια, σταδιακά θανατώνονται ή αδρανοποιούνται και τα διαδέχονται οι θεرمόφιλοι πληθυσμοί.
5. Ο πληθυσμός των μεσόφιλων σποριογόνων βακτηρίων μειώνεται σημαντικά κατά το θερμόφιλο στάδιο και επανακάμπτει στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας για να παραμείνει σταθερός έως το στάδιο της ωρίμανσης. Αντίθετα, ο πληθυσμός των θερμόφιλων αυξήθηκε σημαντικά κατά το θερμόφιλο στάδιο και επανήλθε στο αρχικό του επίπεδο στο στάδιο πτώσης της θερμοκρασίας.
6. Η διατήρηση αυτή του πληθυσμού των κυτταρινολυτικών βακτηρίων σε υψηλό επίπεδο κατά το στάδιο της ωρίμανσης, ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η κυτταρίνη δεν αποτελεί εύκολα αφομοιώσιμο υλικό και κατά συνέπεια, δεν αναμένεται να διασπαστεί μέχρι το τέλος της περιόδου παρακολούθησης.
7. Η παρουσία των αμυλολυτικών βακτηρίων ήταν έντονη στο θερμόφιλο στάδιο, ενώ η δράση των κυτταρινολυτικών βακτηρίων παρουσιάστηκε στο τέλος του σταδίου αυτού. Οι μεγάλοι πληθυσμοί των αμυλολυτικών κατά το θερμόφιλο στάδιο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, πιθανόν να εξηγούνται με μεγάλες συγκεντρώσεις αμυλόζης στο αρχικό δείγμα, παρά την ανάμιξή του με κλαδοκάθαρα.
8. Οι θερμόφιλοι μύκητες ήταν πληθυσμιακά περισσότεροι από τους μεσόφιλους και έλαβαν τις υψηλότερες τιμές τους μετά το θερμόφιλο στάδιο.
9. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες κομποστοποίησης, επήλθε υγιεινοποίηση του αρχικού υλικού, σε σχέση με δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Από την 93^η ημέρα της διαδικασίας της κομποστοποίησης και μετά οι τιμές των *E. coli* δεν ήταν ανιχνεύσιμες και μέχρι τη 226^η ημέρα που πραγματοποιήθηκε η

τελευταία δειγματοληψία δεν παρουσιάστηκε ανάκαμψη του πληθυσμού,

Ε. Βιβλιογραφία

Ελληνόγλωσσα

- ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣ, ΓΡ. (1994).** Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Univercity Studio Press. Θεσσαλονίκη, 1994.
- ΜΑΝΙΟΣ, Β.Ι. (1979).** Διερεύνηση δυνατότητας παρασκευής φυτοχώματος από την εκχυλισμένη ελαιοπυρήνα. Διδακτορική Διατριβή, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών.
- ΜΑΝΙΟΣ, Β.Ι., και Γ. ΚΡΙΤΣΩΤΑΚΗΣ (2000).** Εφαρμογές κομπόστ στη γεωργία. Εισήγηση στη 2^η συνάντηση εργασίας του δικτύου ΚΟΜΠΟΣΤ-NET, Ξάνθη, Οκτώβριος, σς.1-6.
- ΜΑΝΙΟΣ, Β.Ι., και Κ.Μ. ΜΑΝΙΑΔΑΚΗΣ (2001).** Προδιαγραφές ποιότητας κομπόστ. Ολοκληρωμένη Διαχείριση Οργανικών Αποβλήτων και Υπολειμμάτων. Δημερίδα «ΚΟΜΠΟΣΤ-NET», Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα, σελ. 119-122.
- ΜΠΑΛΗΣ, Κ. (1996).** Σημειώσεις για το Εργαστήριο του Μαθήματος «Βιοτεχνολογία Μικροοργανισμών». Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ξενόγλωσσα

- ALEXANDER, M. (1977).** Soil Microbiology. New York, New York: John Wiley and Sons.
- ALEXANDER, M., and F.E. CLARK (1965).** Nitrifying Bacteria. In *Methods of Soil Analysis, Part 2* (A.L. Page *et al.*, eds). American Society of Agronomy, Madison USA. Pp. 1477-1483.
- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER, and D. J. LIPMAN(1997.** "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25** 3389-3402.
- APHA (1992).** Standard methods for examination of water and wastewater. 18th edition. APHA, AWWA, WPCF, Washington DC.
- ATLAS, R.M., and R. BARTHA (1981).** Microbial Ecology. Fundamentals and applications. , Addison Wesley Longman, Menlo Park, California.
- AUST, S.D., and J.T. BENSON (1993).** The fungus among us: use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutant. *Environ. Health Perspect.* **10** 232-233.
- BALESDENT, J., C. CHENU, M. BALABANE (2000).** Relationship of soil organic matter dynamic to physical protection and tillage. *Soil Tillage Res.* **52** 215-230.
- BALIS, C. (1992).** Composting in Greece. In *Composting and compost quality assurance criteria* (D.V. Jackson, J-M. Merillot, and P. L'Hermite, eds.). Commission of the european communities, Brussels, Luxembourg, pp.377-401.
- BECK-FRIIS, B., M. PELL, U. SONNESSON, H. JÖNSSON, and H. KIRCHMANN (2000).** Formation and emission of N₂O and CH₄ from compost heaps of organic household waste. *Environmental Monitoring and Assessment* **62**, 317-331.
- BECK-FRIIS, B., S. SMÅRS, H. JÖNSSON, and H. KIRCHMANN (2001).** Gaseous emissions of carbon dioxide, ammonia and nitrous oxide from organic household waste

in a compost reactor under different temperature regimes. *J. of Agricultural Engineering Research* **78** 4, 423–430.

BECK-FRIIS, B., S. SMÅRS, H. JÖNSSON, Y. EKLIND, and H. KIRCHMANN (2003).

Composting of source-separated household organics at different oxygen levels: Gaining an understanding of the emission dynamics. *Compost Science and Utilization* **11** (1), 41–50.

BEFFA, T. M. BLANC, P.-F. LYON, G. VOGT, M. MARCHIANI, J.L. FISCHER, and M. ARAGNO (1996). Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80°C). *Appl. Environ. Microbiol.* **62** 1723-1727.

BEFFA, T., M. BLANC, L. MARILLEY, J.L. FISHER, P.F. LYON, and M. ARAGNO (1996). Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. In *The Science of Composting* (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp. 149-161.

BISHOP, P.L., and C. GODFREY (1983). Nitrogen transformations during sludge composting. *BioCycle* **24**, 34-39.

BLANC, M., L. MARILLEY, T. BEFFA, and M. ARAGNO (1999). Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rRNA) methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28** 141-149.

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

BOLLEN, G.J., and D. VOLKER (1996). Phytohygienic aspects of composting. In *The Science of Composting* (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp. 233-246.

BOLLEN, G.J., D. VOLKER, and A.P. WIJNEN (1989). Inactivation of soil-borne plant pathogens during small-scale composting of crop residues. *Neth J. Pl. Pathol.* **95**, suppl. **1**, 19-30.

BRINTON, W.F., and M.W. DROFFNER (1994). Microbial approaches to characterization of composting processes. *Compost Sci. Utiliz.* **2**, 12-17.

BROCK, T.D. (1978). *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer-Verlag, New York.

BRUNS, C., GOTTSCHALL, ZELLER, W. SCHUELER, and H. VOGTMANN (1993). Survival rates of plant pathogens during composting of biogenic wastes in commercial composting plants under different decomposition conditions. In *Soil, biota, nutrient cycling and farming systems* (M.G. Paoletti, W. Foissner, and D. Coleman eds). Lewis Publ./ CRC Press, Boca Raton, p. 42-51.

BURGE, W.D., N.K. ENKIRI, and D. HUSSONG (1987). *Salmonella* regrowth in compost as influenced by substrate. *Microb. Ecol.* **14**, 243-253.

- BURROWS, S. (1951).** The chemistry of mushroom composts. II. Nitrogen changes during the composting and cropping processes. *J. Sci. Food Agric.* **2**, 403-410.
- CANET, R., and F. POMARES (1998).** Changes in physical, chemical, and physicochemical parameters during the composting of municipal solid wastes in two plants in Valencia. *Biores. Technol.* **51**, 259-264.
- CARLYLE, R.E. and A.G. NORMAN (1941).** Microbial thermogenesis in the decomposition of plant material. Part II. Factors involved. *J. Bacteriol.* **4** 699-724.
- CARPENTER-BOGGS, L., A.C. KENNEDY, and J.P. REGANOLD (1998).** Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4062-4064.
- CHANG, Y. (1967).** The fungus of wheat straw compost. II. Biochemical and physiological studies. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **50** 649-666.
- CHANG, Y., and H.J. HUDSON (1967).** The fungi of wheat straw compost. I. Ecological studies. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **50** 667-677.
- CHEN, W.A.C., and D.M. GRIFFIN (1966).** Soil physical factors and the ecology of fungi. V. Further studies in relatively dry soils. *Trans Bri. Mycol. Soc.* **49** 419-426.
- CHOI, M.H., and Y.-H. PARK (1998).** The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Letters in Applied Microbiology* **26**, 175-178.
- COONEY, D.G., and E. EMERSON (1964).** *Thermophilic Fungi: An Account of Their Biology, Activities and Classification.* W.H. Freeman, San Francisco.
- COROMINAS, E., F. PERESTELO, M.L. PEREZ, and M.A. FALCON (1987).** Microorganisms and environmental factors in composting of agricultural waste of the Canary Islands. In *Compost: Production, Quality and Use* (DeBertoldi, M., M.P. Ferranti, P.L. Hermite, and Zucconi (Eds.)). Elsevier Science, London, pp.127-138.
- CORTI, C., I. CRIPPA, GENEVINI, and M. CENTEMERO (1998).** Compost use in plant nurseries: Hydrological and physicochemical characteristics. *Compost Science & Utilization* **6** 34-45.
- DAY, M., M. KRZYMIEN, K. SHAW, L. ZAREMBA, W.R. WILSON, C. BOTDEN, and B. THOMAS (1998).** An investigation of the chemical and physical changes occurring during commercial composting. *Compost Sci. and Util.* **6** (2) 44.
- DE BERTOLDI, M., F. ZUCCONI, and M. CIVILINI (1988).** Temperature pathogen control and product quality. *BioCycle* February 1988, 43-50.
- DE BERTOLDI, M., G. VALLINI, and A. PERA (1983).** The biology of composting: A Review. *Waste Management and Research* **1**, 167-176.
- DE GUARDIA, D. ROGEAU, F. BEGNAUD, and S. QUINTO (1998).** Characterization of green wastes transformations occurring while composting. Proceedings of the Eighth International Conference of the European Cooperative Research Network. Recycling of

Agricultural Municipal and Industrial Residues in Agriculture, Rennes, France 26-29 May, Cemagref, France, pp. 185-202.

- DEES, P.M., and W.C. GHIORSE (2001).** Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology* **35** (2), 207-216.
- DELAFIELD, F.P., M. DOUDEROFF, J. PALLERONI, C.J. LUSTY, and R. CONTOPOULOS (1965).** Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* **90**, 1455-1466.
- DERIKX, P.J.L., H.J.M.O. CAMP, C. Van Der DRIFT, L.J.L.D. Van GRIENSVEN, and G.D. VOGELS (1990).** Biomass and biological activity during the production of compost used as a substrate in mushroom cultivation. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3029-3034.
- DROFFNER, M.L., W. F. BRINTON, JR and E. EVANS (1995).** Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50–70°C) composting environments. *Biomass and Bioenergy* **8** (3) 191-195.
- EGGINS, and PUGH (1962).** Methods in Microbiology. Booth C. Academic Press, London, Vol 4, 1971.
- EKLIND, Y., B. BECK-FRIIS, S. BENGTSSON, J. EJLERTSSON, H. KIRCHMANN, B. MATHISEN, E. NORDKVIST, U. SONNESON, B.H. SVENSSON, and L. TORSTENSSON (1997).** Chemical characterization of source-separated organic household waste. *Swedish Journal of Agricultural Research* **27**, 167–178.
- EPSTEIN, E., and J.J. EPSTEIN (1988).** Public health issues and composting. *BioCycle* August 98, 50-53.
- FARRELL, J.B. (1993).** Fecal pathogen control during composting. In *Science and Engineering of composting: Design, microbiological and utilization aspects* (H.A.J. Hoitink, H.M. Keener, eds.). Pub: Renaissance, Worthington, Ohio, USA, 282-300.
- FCQAO (FEDERAL COMPOST QUALITY ASSURANCE ORGANISATION) (1994).** Methods Book for the Analysis of Compost, in addition with the Results of the Parallel Interlaboratory Test 1993. Kompost- Information Ne. 230. Budesgutegemeinschaft Kompost e.V. University of Essen, Germany.
- FERGUS, C.L. (1964).** Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycologia* **56**, 286-294.
- FERGUS, C.L. (1971).** Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycologia* **63**, 426-431.
- FERGUS, C.L. and J.W. SINDEN (1969).** A new thermophilic fungus from mushroom compost: *Thielavia thermophila* sp. nov. *Can. J. Bot.* **47** 1635-1637.
- FERMOR, T.R., J.F. SMITH, and D.M. SPENCER (1979).** The microflora of experimental mushroom composts. *J. Horticult. Sci.* **54**, 137-147.

- FESTENSTEIN, G.N., J. LACEY, F.A. SKINNER, P.A. JENKINS, and J. PEPYS (1965).** Self-heating of hay and grain in Dewar flasks and the development of the farmer's lung antigens. *J. Gen. Microbiol.* **41** 389-407.
- FINSTEIN, M.S, and M.L. MORRIS (1975).** Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 113-151.
- FINSTEIN, M.S, F.C. MILLER, J.A. HOGAN, and P.F. STORM (1987).** Analysis of EPA guidance on composting sludge. Part III. Oxygen, moisture, odor, pathogens. *BioCycle* **28**, 38-44.
- FINSTEIN, M.S., F.C. MILLER, P.F. STORM, S.T. MCGREGOR, and K.M. PSARIANOS (1983).** Composting ecosystem management for waste treatment. *Bio/Technol.* **1**, 347-353.
- FIRESTONE, M.K., and E.A. DAVIDSON (1989).** Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In *Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere* (Andreae, M.O., and D.S. Schimel, eds.). pp 7-21. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- FOCHT, D.D., and W. VERSTRAETE (1977).** Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advanced Microbiological Ecology* **1**, 135-214.
- FORSYTH, W.G.C., and D.M. WEBLEY (1948).** The microbiology of composting. II. A study of the aerobic thermophilic bacterial flora developing in grass composts. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* 1948 34-39.
- GARCIA, C., T. HERNANDEZ, F. COSTA, B. CECCANTI, and C. CIANTI (1992).** Changes in ATP content, enzyme activity and inorganic nitrogen species during composting of organic wastes. *Canadian Journal of Soil Science* **72**, 243- 253.
- GOLSTEIN N., W.A. YANKO, J.M. WALKER, and W. JAKUBOWSKI (1988).** Determining pathogen levels in sludge products. *BioCycle* **29**, 44-47.
- GOLUENKE, G.E. (1991).** Principles of composting. In *The staff of biocycle journal of waste recycling.*.
- GRAY, K.R., K. SHERMAN, and A.J. BIDDLESTONE (1971).** A review of composting – part 1. *Process Biochemistry* **6**: 32-36.
- GREGORY, P.H., M.E. LACEY, G.N. GESTENSTEIN, and F.A. SINNER (1963).** Microbial and biochemical changes during the moulding of hay. *J. Gen. Microbiol.* **33**, 147-174.
- HANSGATE, A.M., P.D. SCHLOSS, A.G. HAY, and L.P. WALKER (2005).** Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology* **51** (2), 209-124.
- HARDY, G.E., and K. SIVASITHAMPARAM (1991).** Suppression of *Phytophthora Root Rot* by a composted *Eucalyptus* bark mix. *Aust. J. Bot.* **39** 153-159.

- HARDY, G.E., and K. SIVASITHAMPARAM (1998).** Microbial, chemical and physical changes during composting of eucalyptus (*Eucalyptus calophylla* and *Eucalyptus diversicolor*) bark mix. *Biology and Fertility of Soils* **8**, 260-270.
- HARPER, E.R., F.C. MILLER, and B.J. MacCAULEY (1992).** Physical management and interpretation of an environmentally controlled composting ecosystem. *Aust. J. Exp. Agric.* **32**, 657-667.
- HAUG, R.T. (1979).** Engineering principles of sludge composting. *J. Water Pollut. Control Fed.* **51**, 2189-2206.
- HAUG, R.T. (1993).** The Practical Book of Compost Engineering. Lewis Publishers, Boca Raton.
- HAUG, R.T. (1996).** Composting plant design and process management. In *The Science of Composting*, part I (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp.60-70.
- HAUKE, H., H. STÖPPLER, and R. GOTTSCHALL (1996).** Development of compost products. In *The Science of Composting* (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp.475-494.
- HAYES, W.A. (1968).** Microbiological and biochemical changes in composting straw/horse manure mixtures. *Mushroom Sci.* **7**, 173-186.
- HE, Y., Y. INAMORI, M. MIZUOCHI, H. KONG, N. IWAMI, and T. SUN (2000).** Measurements of N₂O and CH₄ from the aerated composting of food waste, *Sci. Tot. Environm.* **254**, 65-74.
- HEDGER, N.J., and H.J. HUDSON (1970).** *Thielavia thermophila* and *Sporotrichum thermophila*. *Trans. British Mycol. Soc.* **54** 497-500.
- HELLEBRAND, H.J. (1998).** Emission of nitrous oxide and other trace gases during composting of grass and green waste. *Journal of Agricultural Engineering Research* **69** 365-375.
- HELLMAN, B., L. ZELLES, A. PALOJÄRVI, and Q. BAI (1997).** Emission of climate – relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting. *Applied Microbiology* **63**, 1011-1018.
- HERRMANN, R.F., and J.F. SHANN (1997).** Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microbial Ecology* **33**, 78-85.
- HESS, T.F., I. GRDZELISHVILI, H. SHENG, and C.J. HOVDE (2004).** Heat inactivation of *E. coli* during manure composting. *Compost Science & Utilization* **12**(4), 314-322.
- HILLMAN, K. (2000).** Modification of the intestinal microflora with starches. In *Animal, Food Science research report for 1999*. Pub SAC 21-24.
- HIRUKI, C., and D.S. TEAKLE (1987).** Soil-borne viruses of plants. In *Current topics in vector research*. Vol 3. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 177-215.

- HOGAN, J.A., F.C. MILLER, and M.S. FINSTEIN (1989).** Physical modeling of the composting ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1082-1092.
- HOITINK, H.A.J., and P.C. FAHY (1986).** Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 93-114.
- HOITINK, H.A.J., Y. INBAR, and M. BOEHM (1991).** Status of composted-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Dis.* **75** 869-873.
- HUGENHOLTZ, P., B.M. GOEBEL, and N.R. PACE (1998).** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.
- HURST, C., P. LONGHURST, S. POLLARD, R. SMITH, B. JEFFERSON, and J. GRONOW (2005).** Assessment of municipal waste compost as a daily cover material for odour control at landfill sites. *Environmental Pollution* **135** 171-177.
- INBAR, Y., Y. HABAR, and Y. CHEN (1993).** Recycling of cattle manure: the composting process and characterization of maturity. *J. Environ. Qual.* **22** 857-863.
- INSAM, H., K. AMOR, M. RENNER, and C. CREPAS (1996).** Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbial Ecology* **31**, 77-87.
- ISHII, K. and S. TAKII (2003).** Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 109-119.
- ISHII, K., M. FUKUI, and S. TAKII (2000).** Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 768-777.
- IVORS, K.L., P.D. COLLOPY, D.M. BEYER, and S. KANG (2000).** Identification of bacteria in mushroom compost using ribosomal RNA sequence. *Compost Science and Utilization* **8**, 247- 253.
- JÄCKEL, U., K. THUMMES, and P. KÄMPFER (2005).** Thermophilic methane production and oxidation in compost. *FEMS Microbiology Ecology* **52**(2), 175-184.
- JERIS, J.C., and W.R. REGAN (1973).** Controlling environmental parameters for optimum composting. *Compost Sci.* **14**, 16-22.
- JIANG, X., J. MORGAN, and M.P. DOYLE (2003).** Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during composting of bovine manure in a laboratory-scale reactor. *J. Food Prot.* **66**, 25-30.
- JOSHUA, R.S., B.J. MaCAULEY, and C.R. HUDSON (1994).** Recycling grease trap sludges. *BioCycle* **35** 46-47.
- KANE, B.E., and J.T. MULLINS (1973).** Thermophilic fungi in a municipal waste compost system. *Mycologia* **65**, 1087-1100.

- KAPETANIOS, E.G., M. LOIZIDOU, and G. VALKANAS (1993).** Compost production from Greek domestic refuse. *Biores. Technol.* **44**, 13-16.
- KEREM, Z., D. FRIESEM, and Y. HADAR (1992).** Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* vs. *Planerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** 1121-1127.
- KLAMMER, M., and E. BAATH (1998).** Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **27**, 9-20.
- KNOWLES, R. (1982).** Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**, 43-70.
- KÖRNER, I., and R. STEGMANN (1996).** N-Dynamics during composting – Overview and experimental results. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer.
- LACEY, J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts, and fodders. In *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance* (G. Sykes, and F.A. Skinner eds.). Academic Press, London, pp. 231-251.
- LASARIDI, K.E., and E.I. STENTIFORD (1997).** Biological parameters for compost stability assessment and process evaluation. In *Proceedings of the International Symposium on composting and use of Composted Materials for Horticulture* (R.A.K. Szmidt ed.) *Acta Horticulturae* **469** pp. 119-127.
- LASARIDI, K.E., E.D. STENDIFORD (1996).** Respirometric techniques in the context of compost stability assessment: principles and practice. In: *The Science of Composting*, part I (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp.274-285.
- LEI, F., and J.S. VANDERGHEYNST (2000).** The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochemistry* **35** (9), 923-929.
- LUNG, A.J., C.M. LIM, J.M. KIM, M.R. MARSHALL, R. NORDSTEDT, N.P. THOMPSON, and C.I. WEI (2001).** Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting. *J. Food Prot.* **64** 1309-1314.
- MAAS, E.V. (1986).** Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research* **1**(1), 12-26.
- MaCAULEY, R.F., B. STONE, K. IYAMA, E.R. HARPER, and F.C. MILLER (1993).** Composting research runs "hot" and "cold" at La Trobe University. *Compost Science & Utilization* **1**, 6-12.
- MAKAWI, A.A.M. (1980).** The effect of thermophilic actinomycetes isolated from compost and animal manure on some strains of *Salmonella* and *Shigella*. *Zeit. Bakteriol.* **135** 12-21.

- MANIOS, T., K. MANIADAKIS, P. BOYTZAKIS, Y. NAZIRIDIS, K. LASARIDI, G. MARKAKIS, and E.I. STENTIFORD (2005).** Greenhouse gases emission in a two-phase olive oil mill sludge windrow pile during composting. *Biodegradation* (in press).
- MATHUR, S.P., G. OWEN, H. DINEL, and M. SCHNITZER (1993).** Determination of compost biomaturity. I literature review. *Biol. Agric. Hortic.* **10**, 65-85.
- McNEVIN, D., and J. BARFORD (2002).** Biofiltration as an odour abatement strategy. *Biochemical Engineering Journal* **5** 231-242.
- MICHEL, F.C., T.L. MARSH, and C.A. REDDY (1996).** Bacterial community structure during yard trimmings composting. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer. pp. 25-42.
- MILLER, F.C. (1989).** Matric water potential as an ecological determinant in compost, a substrate dense system. *Microb. Ecol.* **18**, 59-71.
- MILLER, F.C. (1996).** Composting of Municipal Solid Waste and its Components. In *Microbiology of Solid Waste*. Eds A. C. Palmisano and M.A. Barlaz. CRC Press, pp.: 115-154.
- MILLER, F.C., and M.S. FINSTEIN (1985).** Materials balance in the composting of sewage sludge as affected by process control strategy. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**, 122-127.
- MILLER, F.C., E.R. HARPER, B.J. MacCAULEY (1989).** Field examination of temperature and oxygen relationships in mushroom composting stacks – consideration of stack oxygenation based on utilisation and supply. *Austr. J. Exp. Agric.* **29**, 741-749.
- MILLER, F.C., E.R. HARPER, B.J. MacCAULEY, and A. GULLIVER (1990).** Composting based on moderately thermophilic and aerobic conditions for the production of mushroom compost. *Aust. J. Exp. Agric.* **30**, 287-296.
- MILLNER, P.D., P.B. MARSH, R.B. SNOWDEN, and J.F. PARR (1977).** Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **34** 765-772.
- MINER, Jr F.D., R.T. KOENIG, and B.E. MILLER (2001).** The influence of bulking material type and volume on in-house composting in high-rise, caged layer facilities. *Compost Science and Utilization* **9**, 50-59.
- MORIHARA, K., and O. KOHEI (1992).** Microbial degradation of proteins. In *Microbial Degradation of Natural Products* (G. Winkelmann ed.). VCH-Verlag, Weinheim.
- MORISAKI, N., C.G. PHAE, K. NAKASAKI, M. SHODA, and H. KUBOTA (1989).** Nitrogen transformation during thermophilic composting. *J.Ferment. Bioeng.* **67**, 57-61.
- MUYZER, G., T. BRINKHOFF, U. NÜBEL, C. SANTEGOEDS, H. SCHÄFER, and C. WAWER (1997).** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial

ecology. In *Molecular Microbial Ecology Manual* (A.D.L. Akkermans, J.D.V. Elsas, and F.J.D. Bruijn eds). Kluwer Academic Publishers, pp.1-27.

- NAKA T., N. FUJIWARA, I. YANO, S. MAEDA, M. DOE, M. MINAMINO, N. IKEDA, Y. KATO, K. WATABE, Y. KUMAZAWA, I. TOMIYASU AND K. KOBAYASHI (2003).** Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. [*Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1635** \(2-3\) 83-92.](#)
- NAKASAKI, K., M. SASAKI, M. SHODA, and H. KUBOTA (1985 α).** Change in microbial numbers during thermophilic composting sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 37-41.
- NAKASAKI, K., M. SHODA, and H. KUBOTA (1985 β).** Effect of temperature on composting of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1526-1530.
- NAKASAKI, K., H. YAGUCHI, Y. SASAKI, and H. KUBOTA (1993).** Effects of pH control on composting of garbage. *Waste Management and Research* **11** (2). 117-125.
- NORMAN, A.G. (1930).** The biological decomposition of plant materials. Part III. Physiological studies on some cellulose decomposing fungi. *Annual Appl. Biol.* **17** 575-613.
- OADES, J.M. (1984).** Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil* **76** 319-37.
- OKAFOR, N. (1966).** Thermophilic microorganisms from rotting maize. *Nature* **210**, 220-221.
- ORKA (1992).** ORCA Technical Publication Nr2:A Review of Compost Standards in Europe. ORCA, Brussels.
- OUEDRAOGO, E., A. MANDO, and N.P. ZOMBRE (2001).** Use of compost to improve soil properties and crop productivity under low input agricultural system in West Africa. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **84** 259-266.
- PAPADIMITRIOU, E.K., and C. BALIS (1996).** Comparative study of parameters to evaluate and monitor the rate of a composting process. *Compost Science & Utilization* **1**, 52-61.
- PARE, E.A., H. DINEL, M. SCHNITZER, and S. DUMONTET (1998).** Transformation of carbon and nitrogen during composting of animal manure and shredded paper. *Biol Fertil. Soils* **26**, 173-178.
- PAREDES, C., A. ROIG, M.P. BERNAL, M.A. SANCHEZ-MONEDERO, and J. GEGARRA (2000).** Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fertil. Soils* **32**, 222-227.
- PARR, J.F., E. EPSTEIN, and G.B. WILSON (1978).** Composting sewage sludge for land application. *Agric. Environ.* **4**, 123-137.

- RANDLE, P., and P.B. FLEGG (1978).** Oxygen measurement in a mushroom compost stack. *Scientia Horticulturae* **19**, 315-232.
- REINIKAINEN, O., and M. HERRANEN (2001).** Different methods for measuring compost stability and maturity. In *Proceedings Int. Symposium On Composting of Organic Matter (Balis et al., eds)*. Acta Horticulturae **549**. **ISHYS.**
- RIDDECH, N., S. KLAMMER, and H. INSAM (1996).** Characterisation of microbial communities during composting of organic wastes. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer. pp. 43-52.
- RIEHLE, M.M., A.F. BENNETT, R.E. LENSKI, and A.D. LONG (2003).** Evolutionary changes in heat-inducing gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperatures. *Physiol. Genomics* **14** 47-58.
- RIVERO, C., T. CHIRENJE, L.Q. MA, and G. MARTINEZ (2004).** Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. *Geoderma* **123** 355-361.
- ROBINSON, J.J. and E.I. STENTIFORD (1993).** Improving the aerated static pile composting method by the incorporation of moisture control. *Compost Sci. Util.* **1**, 52-68.
- ROSS, R.C., and P.J. HARRIS (1982).** Some factors involved in Phase II of mushroom compost preparation. *Sci. Hort.* **17**, 223-229.
- ROSS, R.C., and P.J. HARRIS (1983).** The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. *Sci. Hort.* **20** 61-70.
- ROTHBAUM, H.P., and M.H. DYE (1964).** Self-heating of damp wool. Part 3. Self-heating of damp wool under isothermal conditions. *N. Z. J. Sci.* **7**, 119-146.
- RYCKEBOER, J., J. MERGAERT, J. COOSEMANS, K. DEPRINS, and J. SWINGS (2003).** Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 127-137.
- SADAKA, S., and A. EL-TAWEEL (2003).** Effects of aeration and C:N ratio on household waste composting in Egypt. *Compost Science & Utilization* **11** (1), 36-40.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, T. MANIATIS (1989).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SAMSON, R.A., M.J. CRISMAN, and M.R. TANSEY (1977).** Observations on the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **69** 417-423.
- SCHATTNER-SCHMIDT, S., M. HELM, A. GRONAUER, and B. HELLMANN (1995).** Composting biogenic wastes, *Landtechnik* **50**, 364.
- SCHLOSS, P.D. (2002).** Quantifying bacterial population dynamics in composting using 16SrRNA gene probes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- SCHÜLER, C., J. PIKNY, M. NASIR, and H. VOGTMANN (1993).** Effects of composted organic kitchen and garden waste on *Mycosphaerella pinodes* (Berk, et Blox) Vesterg.,

- Causal organism of root rot on peas (*Pisum sativum* L.) *Biolog. Agric. And Hort.* **9** 353-360.
- SHELL, G.L. and J.L. BOYD (1969).** *Composting Dewatered Sewage Sludge*. Report SW-12c, USDHEW/Public Health Service, Environmental Health Services Environmental Control Administration, Bureau of Solid Waste Management, Washington, D.C.
- SOMER, S.G., and H.B. MOLLER (2000).** Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production – effect of straw content, *J. Agric. Sci.* **134**, 327–335.
- STANEK, M. (1971).** Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. *Mushroom Science* **8**, 797-811.
- STENTIFORD, E.I. (1993).** Diversity of composting systems. In *Science and Engineering of Composting* (H.A.J. Hoitink, and H.M. Keener, eds.). Renaissance Publications, Ohio, pp.95-110.
- STENTIFORD, E.I., and T.J. PEREIRA-NETO (1985).** Simplified systems for refuse/sludge composts. *BioCycle* **26** (5), 46-49.
- STRAATSMA, G., R.A. SAMSON, T.W. OLIJNSMA, H.J.M. OP DEN CAMP, J.P.G. GERRITS, and L.J.L.D. VAN GRIENSVEN (1994).** Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** 454-458.
- STRAUCH, D. (1996).** Occurrence of microorganisms pathogenic for man and animals in source separated biowaste and compost – Importance, control, limits, epidemiology. In *The Science of Composting* (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp.224-245.
- STROM, P.F. (1985a).** Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology* **50** (4), 899–905.
- STROM, P.F. (1985b).** Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 906-913.
- STUTZENBERGER, F.J. (1971).** Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.* **22** 147-152.
- SULER, D.J., and M.C. FINSTEIN (1977).** Effect of temperature, aeration, and moisture on CO₂ formation in bench-scale, continuously thermophilic composting of solid wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 345-350.
- SUNDBERG, C., S. SMÅRS, and H. JOHNSON (2004).** Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. [*Bioresource Technology*](#) **95** (2), 145-150.
- SZMIDT, R.A.K. (1996).** Review of compost process-control for product function. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer.

- SZMIDT, R.A.K. (1999).** Report of the National Waste Strategy Composting Task Group: Scottish Environment Protection Agency, Stirling, UK, pp 60.
- SZMIDT, R.A.K., and C. FOX (2001).** Interdependencies for Process Control and Compost Quality. Proceedings of International Symposium on Composting of Organic Matter. *Acta Horticulturae* **549** 55-60.
- TANSEY, M.R. (1981).** Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. *Mycologia* **58** 537-547.
- TCHOBANOGLIOUS, G., H. THIESEN, and S.A. VIGIL (1993).** Integrated Solid Waste Management - Engineering Principles and Management Issues. McGraw-Hill International Editions, Civil Engineering Series, pp. 306-310.
- TENDLER, M.D., and P.R. BURKHOLDER (1961).** Studies on the thermophilic actinomycetes. I. Methods of cultivation. *Appl. Microbiol.* **9** 394-399.
- THOMPSON, W., P. LEEGE, P. MILNER, and M. WATSON (2002).** Test Methods for the Examination of Composts and Composting. The US Composting Council, US Government Printing Office. CDRom.
- TIQUIA, S.M. (1996).** Microbial transformation of nitrogen during composting. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer.
- TIQUIA, S.M., and F.C. Jr MICHEL (1996).** Bacterial diversity in livestock manure composts as characterized by terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) of PCR-amplified 16s rRNA gene sequences. In *Microbiology of Composting* (H. Insam, N. Riddech, S. Klammer, eds). Springer. pp. 65-82.
- TIQUIA, S.M., and N.F.Y. TAM (2000).** Fate of nitrogen during composting of chicken litter. *Environ. Pollut.* **110**, 535-541.
- TIQUIA, S.M., T.L. RICHARD, and M.S. HONEYMAN (2000).** Effect of windrow turning and seasonal temperatures on composting of pig manure from hoop structures. *Environ. Technol.* **21**, 1037-1046.
- TSENG, D.Y., J.J. CHALMERS, and O.H. TUOVINEM (1996).** ATP measurement in compost. *Compost Science and Utilization* **4**, 6-17.
- USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994a).** Innovative uses of compost, Reforestation, Wetlands Restoration and Habitat Revitalization. *EPA530-F-97-046*.
- USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994b).** Innovative uses of compost, Erosion Control, Turf Remediation and Landscaping. *EPA530-F-97-043*.
- USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2002).** Global warming website- Emissions. URL: <http://epa.gov/globalwarming/emissions/index.html>
- VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. (1988).** The Cultivation of Mushrooms. Darlington, Rustington, UK.

- VANDERGHEYNST, J.S., S. PETTYGROVE, T.M. DOOLEY, and K.A. ARNOLD (2003).** Estimating electrical conductivity of compost extracts at different extraction ratios. *Compost Science & Utilization* **12**(3), 202-207.
- VOGTMANN, H., G. BOURS, and W. FUCHSHOFEN (1996).** The influence of composts and mineral fertilizers on the heavy metal concentration and transfer in soil and plants. In *The Science of Composting* (de Betroldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, and T. Papi Eds.). Blackie Academic & Professional pp. 346-354.
- WAGNER, M., R. AMMAN, H. LEMMER, and K-H. SCHLEIFER (1993).** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent method for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1520-1525.
- WAKSMAN, S.A., and T.C. CORDON (1939).** Thermophilic decomposition of plants residues in compost by pure and mixed cultures of micro-organisms. *Soil Sci.* **47**, 217-225.
- WAKSMAN, S.A., W.W. UMBREIT, and T.C. CORDON (1939).** Thermophilic actinomycetes and fungi in soils and in composts. *Soil Science* **47** 37-61.
- WILD, A. (1988).** Plant nutrients in soil: nitrogen. In *Russel's Soil conditions and plant growth* (A. Wild ed). 11th edn. Longman Group UK. Harlow, Essex, pp. 652-694.
- WITTER, E., and J.M. LOPEZ-REAL (1987).** The Potential of sewage sludge and composting in a nitrogen recycling strategy for agriculture. *Biol. Agric. Horticult.* **5**, 1-23.
- WOOD, D.A. (1984).** Microbial processes in mushroom cultivation: large scale solid substrate fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **34** B, 232-240.
- YAOWU, H., Y. INAMORI, M. MIZUOCHI, H. KONG, N. IWAMI, and T. SUN (2001).** Nitrus oxide emissions from aerated composting of organic waste. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2347-2351.
- YUEN, G.Y., and R.D. RAABE (1984).** Effects of small-scale aerobic composting on survival of some fungal plant pathogens. *Plant Dis.* **68**, 134-136.
- ZIMMERMAN, R.A. (1991).** Evaluation of oxygen utilization as an indicator of municipal solid waste compost stability. Phd thesis, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, USA.
- ZWIETERING, M.H., J.T. de KOOS, B.E. HASENACK, J.C. de WIT, and K. van 'T RIET (1991).** Modeling of bacteria growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1094-1101.