



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**«Απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από το έδαφος
με τη συμβολή μικροοργανισμών»**
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΤΖΗΒΓΕΡΗ ΑΡΓΥΡΩ
Α.Μ.: 2009050062

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΓΙΔΑΡΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΧΑΝΙΑ

2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλα την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Βενιέρη Δανάη, όχι μόνο για το πολύ ενδιαφέρον θέμα που ασχολήθηκα αλλά και επειδή ήταν εκεί, πάντα, υπομονετική σε κάθε δυσκολία να μου μαθαίνει κάτι καινούριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την βοηθό του εργαστηρίου περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα διότι ήταν ο άνθρωπος που έζησε από κοντά την προσπάθεια μου και ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα. Και οι δύο μου έμαθαν πάρα πολλά πάνω στο αντικείμενο και με οδήγησαν στο να καταλάβω τελικά τι θα ήθελα να κάνω στο μέλλον μου. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Sagu Maria Liliana και την Βουτσαδάκη Στέλλα από το εργαστήριο του Καθηγητή Νικολαΐδη Νικολάου για τις πολύτιμες και αναγκαίες μετρήσεις που κάνανε στο εργαστήριο τους. Θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους μου στο εργαστήριο Καλέμη Ευαγγελία, Νιάρχο Γιώργο, Τεγκελίδη Χριστίνα και Καραταιρη Βαλάντη για τις πολύ όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο. Ακόμα την Κατσανεβάκη Μαρτσέλα, την Χριστοφορίδου Μαρία και τον Μπούσια Δημήτρη για την απεριόριστη υπομονή τους! Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στήριζαν όλα αυτά τα χρόνια και που χωρίς αυτούς δεν θα είχα φτάσει εδώ που είμαι τώρα.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	4
ΓΕΝΙΚΑ	4
ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΑ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΕΔΑΦΗ	6
ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	11
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	12
ΜΕΤΑΛΛΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ	14
ΚΑΔΜΙΟ	14
ΜΟΛΥΒΔΟΣ	16
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	18
ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	18
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	19
ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ.....	21
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
ΥΛΙΚΑ	24
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	24
ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	24
ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	24
ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	24
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA.....	24
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	25
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	27
ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΒΑΘΙΑ ΨΥΞΗ (-80°C)	28
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	28
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	29
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	30
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΓΝΩΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΓΕΝΗ.....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	31
ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	31
ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ & ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	32

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	36
ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	40
ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ Cd&Pb.....	41
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΓΕΝΙΚΑ

Το περιβάλλον αποτελεί το φυσικό και βιολογικό πλαίσιο του ανθρώπου από το οποίο εξαρτάται άμεσα με πολλούς και πολύπλοκους τρόπους. Η ρύπανση αυτού είναι μια από τις ανθρωπογενείς μη ωφέλιμες επεμβάσεις που τις περισσότερες φορές καταλήγει καταστρεπτική.

Ως ρύπανση περιβάλλοντος αναφέρεται η άμεση ή έμμεση εισαγωγή, στην ατμόσφαιρα, το νερό ή το έδαφος, ουσιών, κραδασμών, θερμότητας ή θορύβου που ενδέχεται να θίξουν την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον.

Τα βαρέα (τοξικά) μέταλλα θεωρούνται από τους πλέον επικίνδυνους ρύπους του περιβάλλοντος, επειδή αυτά και οι ενώσεις τους, σε αντίθεση με τις οργανικές τοξικές ουσίες, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω βιολογικών, χημικών ή φυσικών μέσων σε αβλαβές υποπροϊόν, αλλά παραμένουν ή συσσωρεύονται στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Λουκίδου, 2003). Ακόμα μπορούν να εισέλθουν με απλό τρόπο σε μικρούς ή μεγάλους βιο-γεωχημικούς κύκλους.

Η ρύπανση του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα προκύπτει όταν η ανθρώπινη δραστηριότητα διαταράσσει τις φυσιολογικές βιογεωχημικές δραστηριότητες ή μέσω συμπυκνωμένων απορριμμάτων μετάλλων. Σε αυτό μπορεί να συμβάλλει ένα μόνο μέταλλο, ή μίγματα μετάλλων, που συμβαίνει και πιο συχνά. Η χρήση τους στη χημική βιομηχανία είναι ευρεία, όπως για παράδειγμα βιομηχανίες παραγωγής χρωμάτων, φωτογραφικών υλικών, ηλεκτρονικών υλικών, παρασιτοκτόνων, συσσωρευτών, πυρομαχικών. Τα μεταλλουργεία επίσης χρησιμοποιούν σε διάφορες ποσότητες ενώσεις που περιέχουν βαρέα μέταλλα είτε σαν πρώτη ύλη είτε σαν καταλύτες. Άλλες σημαντικές πηγές ρύπανσης προέρχονται από τη βελτίωση μεταλλευμάτων, την επεξεργασία πυρηνικών υλών καθώς και από διάφορες γεωργικές εργασίες (χρήση παρασιτοκτόνων και λιπασμάτων).

Παραδείγματα συγκεκριμένων προσμίξεων μετάλλων περιλαμβάνουν άλατα αρσενικού, χαλκού και ψευδαργύρου που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως παρασιτοκτόνα σε γεωργικές εργασίες, άλατα αργύρου που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία εγκαυμάτων του δέρματος και ο μόλυβδος ο οποίος χρησιμοποιείται στην παραγωγή μπαταριών, στις επικαλύψεις καλωδίων, σε χρωστικές και κράματα. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν

ενώσεις υδραργύρου που χρησιμοποιούνται σε ηλεκτρικές συσκευές, χρώματα, θερμομέτρα και μυκητοκτόνα και ως συντηρητικά σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα. Η έκταση της ρύπανση από βαρέα μέταλλα γίνεται ακόμη πιο εμφανής αν αναλογιστεί κανείς την ποσότητα των αποβλήτων που παράγονται κατά την επεξεργασία μετάλλων. Για παράδειγμα για κάθε κιλό χαλκού που παράγεται στις ΗΠΑ παράγονται 198kg αποβλήτων έμπορτα με χαλκό (Debus, 1990).

Στα φυσικά συστήματα, τα μέταλλα προέρχονται απ' τα πετρώματα, τα μεταλλικά ορυκτά (μεταλλικά σουλφίδια), και τα ηφαίστεια με τις συνοδεύουσες θερμές πηγές τους και ατμίδες. Η αποσάθρωση απελευθερώνει τα μέταλλα στη διαδικασία του σχηματισμού εδάφους τα οποία είτε γίνονται μέρος του εδάφους, είτε μεταφέρονται στα επιφανειακά νερά ή και στον υδροφόρο ορίζοντα(Περδικάκης, 2003).

Έτσι, ενώ τα μέταλλα είναι διαδεδομένα στη φύση, οι ανθρώπινες δραστηριότητες είναι αυτές που έχουν προκαλέσει τα μέταλλα να συσσωρεύονται στο έδαφος. Η ρύπανση σε τέτοια εδάφη μπορεί να επεκταθεί στα επιφανειακά ύδατα, τα υπόγεια ύδατα και τα ύδατα διηθήσεως. Η ρύπανση από μέταλλα έχει προκύψει εδώ και αιώνες, από τότε που τα μέταλλα έχουν εξορυχτεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε όλη την ανθρώπινη ιστορία.

Τα βαρέα μέταλλα βρίσκονται στο έδαφος με διάφορες μορφές:

- Με τη διαλυτή μορφή στο εδαφικό διάλυμα καθώς και στο νερό στράγγισης.
- Συγκρατούνται από τη στερεή φάση του εδάφους με διάφορες μορφές και ιοντικές καταστάσεις.
- Καταβυθίζονται με τη μορφή αδιάλυτων ενώσεων.
- Προσλαμβάνονται επίσης από τα φυτά που καλλιεργούνται στο έδαφος ή από τα φυτά που αναπτύσσονται σε αυτό.
- Παραμένουν στην αέρια φάση του εδάφους με τη μορφή πτητικών ενώσεων κατά τη μετατροπή τους (Μήτσιος, 2004)

Επιπτώσεις βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον και τον άνθρωπο

Περιβάλλοντα που έχουν υποστεί ρύπανση από μέταλλα θέτουν σε σοβαρούς κινδύνους την ανθρώπινη υγεία καθώς και το φυσικό περιβάλλον. Μέταλλα όπως το αρσενικό, το αλουμίνιο, το αντιμόνιο, το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο ψευδάργυρος, μπορούν να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις όπως καρδιακές ασθένειες, βλάβη του ήπατος, καρκίνο, νευρολογικές και καρδιαγγειακές ασθένειες, βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος, εγκεφαλοπάθεια και αισθητηριακές διαταραχές.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα μετάλλων που είχαν σοβαρές συνέπειες τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον είναι τα παρακάτω.

- Το πρόβλημα της ρύπανσης από υδράργυρο ήρθε στο προσκήνιο στον κόλπο της Minamata, στην Ιαπωνία, ύστερα από την ανακάλυψη υψηλών επιπέδων μεθυλδραργύρου στα ψάρια και στα οστρακοειδή που είχε ως αποτέλεσμα χιλιάδες δηλητηριάσεις και εκατοντάδες θανάτους (Kudoetal., 1998). Η ρύπανση από υδράργυρο προήλθε από ένα εργοστάσιο χημικών το οποίο παρήγαγε μικρές ποσότητες από υψηλής τοξικότητας και βιοδιαθεσιμότητας μεθυλδραργύρου κατά την παραγωγική διαδικασία, το οποίο απέρριπτε στον κόλπο της Minamata και το οποίο τελικά συσσωρευόταν στα ψάρια. Είναι πολύ πιθανό η μικροβιακή δραστηριότητα στο ίζημα να μετέτρεψε το στοιχειακό υδράργυρο που απορρίφθηκε στον κόλπο σε μεθυλδραργύρο.
- Ο μόλυβδος είναι ένα επίσης επικίνδυνο μέταλλο καθώς η δηλητηρίαση από μόλυβδο είναι πολύ συνήθης σε παιδιά και οδηγεί σε προβλήματα συμπεριφοράς που προκύπτουν από τη διαταραχή της νοητικής λειτουργίας ακόμη και από ημιμόνιμες εγκεφαλικές βλάβες. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CenterforDiseaseControl, CDC) και ο Οργανισμός Τοξικών Ουσιών και Μητρώου Ασθενειών (AgencyforToxicSubstancesandDiseaseRegistry, ATSDR), εκτιμούν ότι περίπου το 10% των παιδιών στις ΗΠΑ, έχουν επίπεδα μολύβδου στο αίμα άνω των 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$, ένα εν δυνάμει τοξικό επίπεδο.
- Σε έρευνα που διεξήχθη στο Βέλγιο στην περιοχή Lommel που υπήρχε μεγάλη δραστηριότητα στη χύτευση ψευδαργύρου στο παρελθόν, παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση Cd στο έδαφος (Weyens *et al.*, 2013).

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΑ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΕΔΑΦΗ

Το έδαφος διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ασφάλεια των τροφίμων, δεδομένου ότι καθορίζει την πιθανή σύνδεση των τροφίμων και των ζωοτροφών στη ρίζα της τροφικής αλυσίδας. Ωστόσο, η ποιότητα των εδαφικών πόρων, όπως ορίζεται από τις πιθανές επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία από την εξάπλωση των βλαβερών στοιχείων μέσω της τροφικής αλυσίδας δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στην Ευρώπη, λόγω έλλειψης στοιχείων με επαρκή λεπτομέρεια και αξιοπιστία (Alloway, 1990; Tóth *et al.*, 2016).

Η πρώτη εναρμονισμένη δειγματοληψία επιφανειακού εδάφους και συνεπής διαδικασία ανάλυσης της Ευρωπαϊκής Ένωσης έδωσε μετρήσεις ιχνοστοιχείων από περίπου 22.000 τοποθεσίες. Αυτή η μοναδική συλλογή πληροφοριών επιτρέπει να έχουμε μια αξιόπιστη εικόνα της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Sb, Co και Ni).

Η ρύπανση του εδάφους από βαρέα μέταλλα είναι ένα από τα προβλήματα σε προτεραιότητα στις συζητήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων στην Ευρώπη (CECH, 2006) αλλά και παγκοσμίως (Kong, 1998).

Ο αριθμός των περιοχών που έχουν υποστεί ρύπανση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και οι εκτάσεις που επηρεάζονται από αυτές, υπογραμμίζουν την έκταση του προβλήματος.

Η έρευνα LUCAS για τα επιφανειακά χώματα με πυκνότητα δειγματοληψίας 1μέρος/200km² άνοιξε νέες προοπτικές στον τομέα αυτό. Η έρευνα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για να φτιαχτεί μια συνεπής χωρική βάση δεδομένων των ιδιοτήτων του εδάφους για περιβαλλοντικές αξιολογήσεις είτε σε περιφερειακή, είτε σε ηπειρωτική κλίμακα, για όλους τους βασικούς τύπους χρήσης γης σε όλη την Ευρώπη (http://esdac.jrc.ec.europa.eu/ESDB_Archive/eusoils_docs/other/EUR26102EN.pdf).

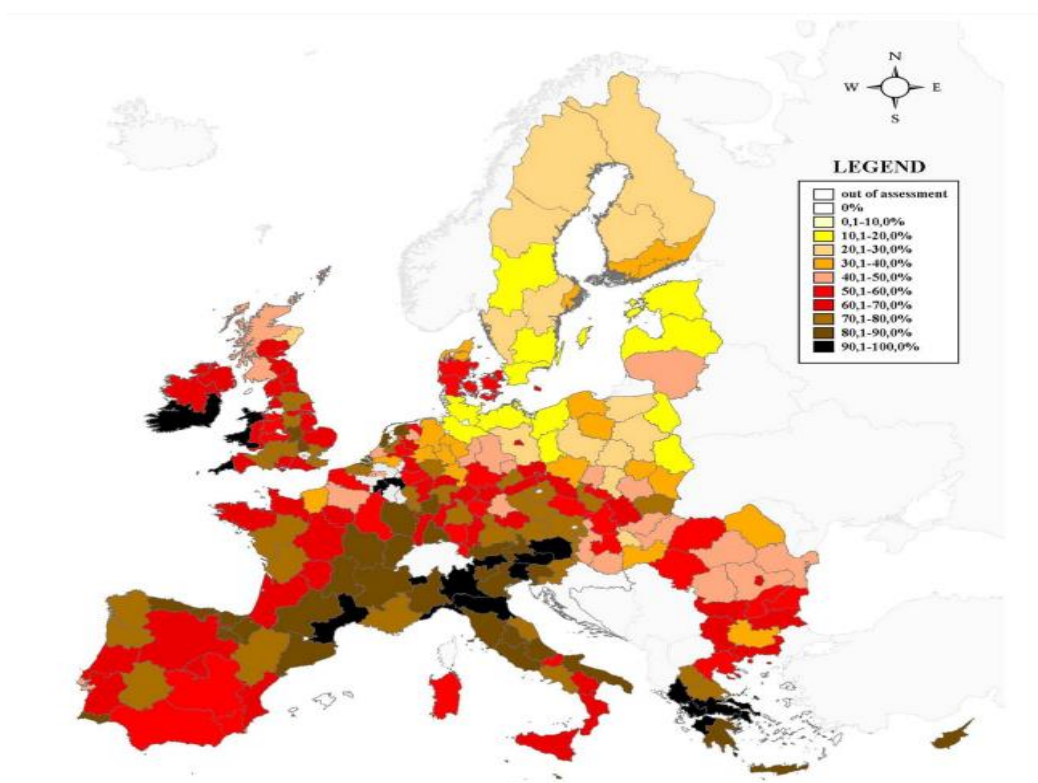
Καθώς η είσοδος των βαρέων μετάλλων στα εδάφη συσσωρεύεται στην επιφάνεια και οι καλλιέργειες και τα λιβάδια γρασιδιού προσλαμβάνουν τα θρεπτικά τους κατά κύριο λόγο από τη ζώνη αυτή, η συγκεκριμένη έρευνα παρουσιάζει επαρκείς πληροφορίες για την εκτίμηση του φορτίου των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον και τη δυνατότητα να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα.

Η περιεκτικότητα του εδάφους σε βαρέα μέταλλα αξιολογήθηκε έναντι κατωτάτων ορίων ρύπανσης από συγκεκριμένα στοιχεία και των αναγκών για αποκατάσταση.

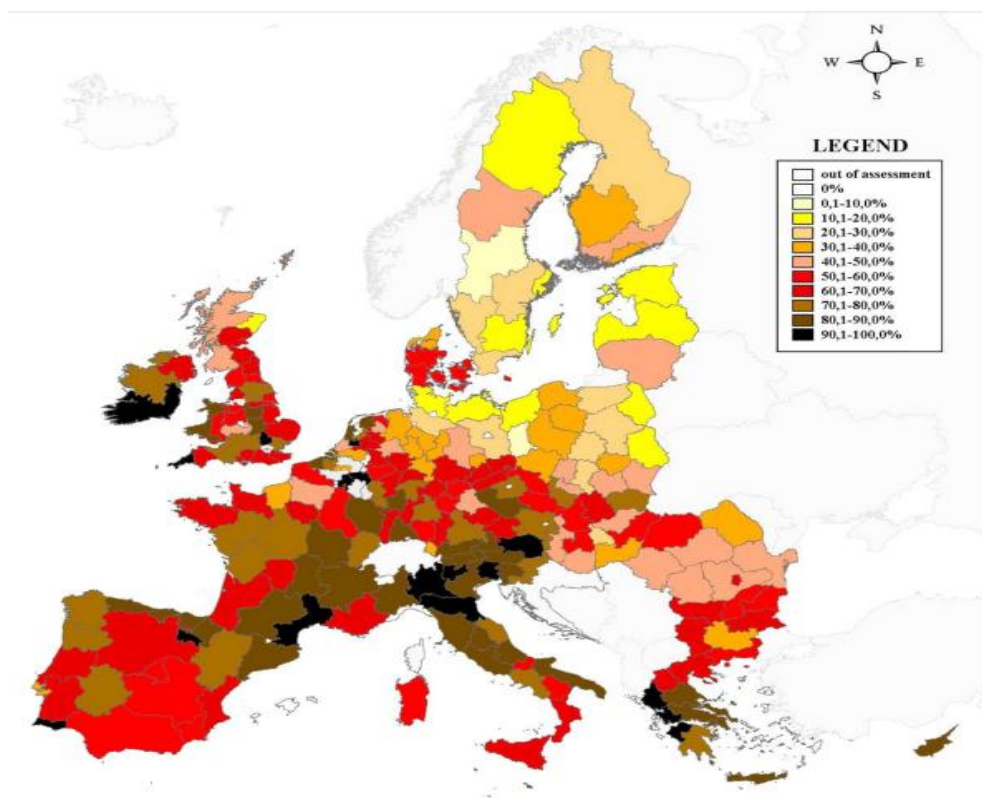
Πίνακας 1. Τιμές κατωφλίου και ενδεικτικές τιμές για τα μέταλλα στο έδαφος. Οι ενδεικτικές τιμές έχουν οριστεί με βάση είτε τους οικολογικούς κινδύνους (e), είτε με βάση τους κινδύνους για την υγεία (t).

Substance (symbol)	Threshold valuemg/kg	Lower guideline valuemg/kg	Higher guideline valuemg/kg
Antimony (Sb) (p)	2	10 (t)	50 (e)
Arsenic (As) (p)	5	50 (e)	100 (e)
Mercury (Hg)	0.5	2 (e)	5 (e)
Cadmium (Cd)	1	10 (e)	20 (e)
Cobalt (Co) (p)	20	100 (e)	250 (e)
Chrome (Cr)	100	200 (e)	300 (e)
Copper (Cu)	100	150 (e)	200 (e)
Lead (Pb)	60	200 (t)	750 (e)
Nickel (Ni)	50	100 (e)	150 (e)
Zinc (Zn)	200	250 (e)	400 (e)
Vanadium (V)	100	150 (e)	250 (e)

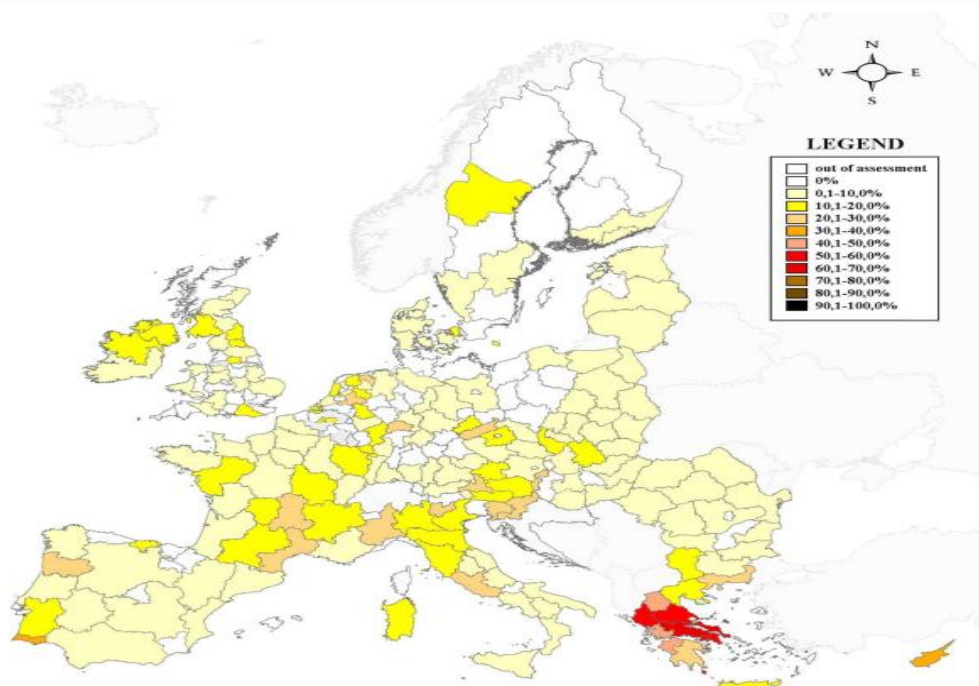
Στις παρακάτω εικόνες (1-4) εμφανίζεται το ποσοστό των δειγμάτων που έχουν υψηλή συγκέντρωση σε συνδυασμό όλων των βαρέων μετάλλων που φαίνονται και στον πίνακα 1.



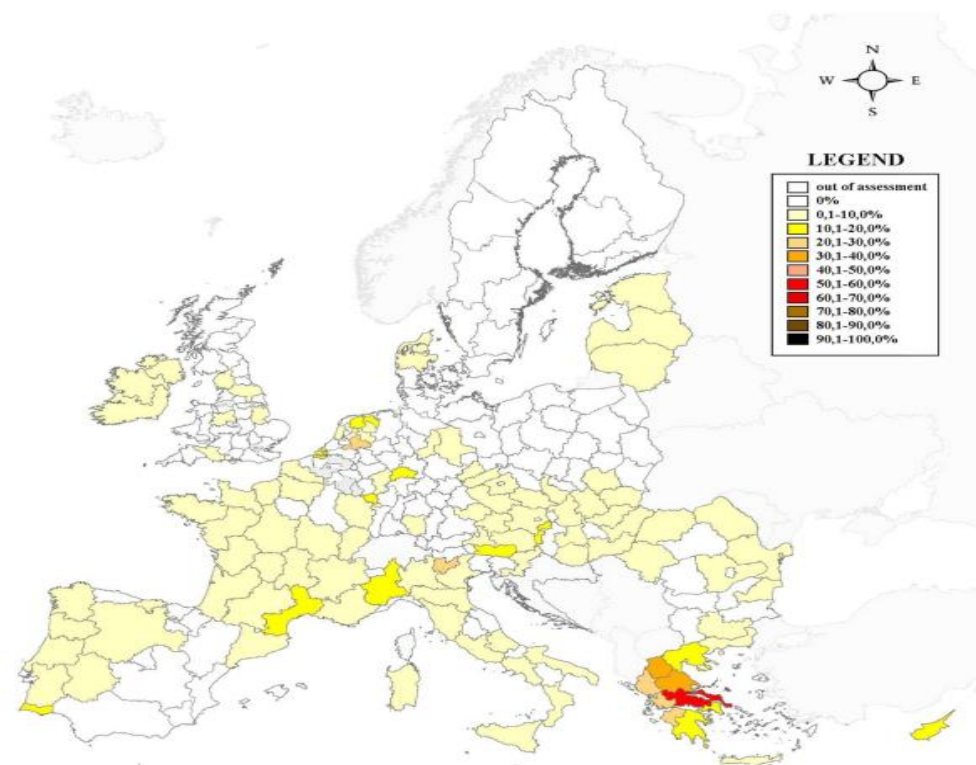
Εικόνα 1. Ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις πάνω από την οριακή τιμή σε όλα τα δείγματα LUCAS.



Εικόνα 2. Ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις πάνω από την οριακή τιμή στα δείγματα LUCAS από γεωργικές εκτάσεις.



Εικόνα 3. Ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις πάνω από την κατώτερη ενδεικτική τιμή στα δείγματα LUCAS από γεωργικές εκτάσεις.



Εικόνα 4.Ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις πάνω από την υψηλότερη ενδεικτική τιμή στα δείγματα LUCAS από γεωργικές εκτάσεις.

Οι περισσότερες περιοχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν πολύ υψηλά ποσοστά δειγμάτων τα οποία έχουν συγκεντρώσεις πάνω από τα όρια της έρευνας, τόσο στην συνολική περιοχή όσο και στην γεωργική τους γη. Μπορεί εύκολα κανείς να παρατηρήσει διαφορές ανά περιοχές. Η βορειοανατολική και κεντρική Ευρώπη είναι λιγότερο επηρεασμένες περιοχές από τις υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, ενώ τα περισσότερα εδαφικά δείγματα στη δυτική Ευρώπη και τη Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, έχουν συγκεντρώσεις πάνω από τα όρια της έρευνας σε τουλάχιστον ένα είδος τοξικού μετάλλου.

Το σχετικά υψηλό ποσοστό (6,24%) των δειγμάτων με συγκέντρωση κάθε είδους τοξικού μετάλλου πάνω από τις ενδεικτικές τιμές που προορίζονται για γεωργική χρήση δείχνει ότι περίπου 137.000 km² γεωργικής γης επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό.

ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Μια σημαντική έννοια που πρέπει να καθοριστεί σε σχέση με τα μέταλλα είναι η βιοδιαθεσιμότητα. Ένα βιοδιαθέσιμο μέταλλο είναι εκείνο που μπορεί να προσληφθεί από έναν μικροοργανισμό, ένα φυτό ή ένα ζώο. Τα βιοδιαθέσιμα μέταλλα συνήθως αποτελούνται από τα ιοντικά είδη τα οποία μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ελεύθερα ιοντικά είδη σε ένα διάλυμα. Τα μέταλλα λοιπόν μπορούν να βρίσκονται και στη βιοδιαθέσιμη μορφή τους αλλά και στην μη διαθέσιμη στο περιβάλλον, αλλά μόνο το βιοδιαθέσιμο τμήμα μπορεί να αποβεί τοξικό στα μικρόβια, στα φυτά και στα ζώα. Ως αποτέλεσμα, το συνολικό μέταλλο σε ένα δείγμα δεν αντανakλά απαραίτητα τον βαθμό βιολογικής τοξικότητας του μετάλλου, κάνοντας δύσκολο να εκτιμηθεί με ακρίβεια η έκταση του κινδύνου που εγκυμονεί η ρύπανση από βαρέα μέταλλα. Γενικά, η βιοδιαθέσιμη συγκέντρωση ενός μετάλλου είναι πολύ χαμηλή σε σχέση με τη συνολική συγκέντρωση του μετάλλου (Maier *et al.*, 2009).

Η κατανόηση της τύχης των μετάλλων στα εδάφη και στα ιζήματα είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των συνεπειών των μετάλλων στους ζώντες οργανισμούς, για τον προσδιορισμό της διήθησης των μετάλλων στα υπόγεια ύδατα και τη μεταφορά των μετάλλων έως την τροφική αλυσίδα. Οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι λόγω των βαρέων μετάλλων συνδέονται άμεσα με τις συγκεντρώσεις τους στο εδαφικό διάλυμα. Συγκεντρώσεις μετάλλων υψηλής βιοδιαθεσιμότητας στο έδαφος έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πρόσληψη τους από τα φυτά και διήθηση τους από το έδαφος. Σε αντίθεση τα μέταλλα που καθιζάνουν ή παίρνουν τη μορφή συμπλόκων στη στερεά φάση του εδάφους, συνιστούν πολύ πιο μειωμένο περιβαλλοντικό κίνδυνο.

Λόγω της τοξικότητας και της παρουσίας των μετάλλων στο περιβάλλον, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλαπλούς τρόπους αντιμετώπισης τόσο των απαραίτητων όσο και των ανεπιθύμητων τοξικών μετάλλων. Τα επίπεδα των απαραίτητων μετάλλων θα πρέπει να ρυθμίζονται προσεκτικά ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής παροχή ενώ αποφεύγεται η τοξικότητα. Η διαδικασία αυτή συχνά αναφέρεται ως ομοιόσταση, η ικανότητα δηλαδή ενός οργανισμού να διατηρεί σταθερές τις συνθήκες του εσωτερικού του περιβάλλοντος (RoaneandKellogg, 2014).

Όλοι οι οργανισμοί πρέπει να διατηρούν την ομοιόσταση με σκοπό να διατηρήσουν την κυτταρική τους λειτουργία. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν την περίσσεια μετάλλων είναι η άντληση των μεταλλικών ιόντων εκτός των κυττάρων τους, ενώ ταυτόχρονα περιορίζουν την πρόσληψη των μετάλλων.

Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν μηχανισμούς που απομονώνουν και ακινητοποιούν τα μέταλλα, ενώ άλλοι ενισχύουν τη διαλυτότητα των μετάλλων στο περιβάλλον.

Λόγω ιοντικών αλληλεπιδράσεων, τα μέταλλα έχουν την τάση να δεσμεύονται σε πολλές κυτταρικές συνδέσεις και να εκτοπίζουν τα απαραίτητα μέταλλα από την θέση τους. Τα μέταλλα επίσης λόγω διάφορων συνδέσεων διαταράσσουν τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα με αποτέλεσμα η διαμόρφωση των πρωτεϊνών και του DNA να αλλάζει και η λειτουργία τους να διακόπτεται. Για παράδειγμα το κάδμιο συχνά συναγωνίζεται τον καταλυτικό ψευδάργυρο εντός των ενζύμων, καθιστώντας έτσι το ένζυμο ανενεργό και δεσμεύεται με το DNA προκαλώντας τροποποιήσεις στη στερεοδομή του.

Οι μικροοργανισμοί συχνά χρησιμοποιούν συγκεκριμένες οδούς μεταφοράς ώστε να φέρουν τα απαραίτητα μέταλλα γι' αυτά, διαμέσου της κυτταρικής τους μεμβράνης, στο κυτταρόπλασμα. Δυστυχώς, τα τοξικά μέταλλα μπορούν επίσης να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω διάχυσης, κάποιων συστημάτων προσρόφησης ή χρησιμοποιώντας μονοπάτια που έχουν σχεδιαστεί από το κύτταρο για άλλα απαραίτητα μέταλλα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλων και μικροβίων μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη ανάπτυξη αυτών, σε μη φυσιολογικές μορφολογικές αλλαγές καθώς και σε αναστολή των βιοχημικών διεργασιών σε μεμονωμένα κύτταρα. Οι τοξικές επιδράσεις των μετάλλων μπορεί επίσης να είναι εμφανείς σε αποικιακό επίπεδο. Λόγω τοξικότητας των μετάλλων, ο πληθυσμός και η ποικιλομορφία μπορούν να ελαττωθούν.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μετάλλων: τα μέταλλα, τα μεταλλοειδή και τα βαρέα μέταλλα. Τα μέταλλα, γενικά, είναι μια κατηγορία χημικών στοιχείων που σχηματίζουν στιλπνά στερεά τα οποία είναι καλοί αγωγοί της θερμότητας και της ηλεκτρικής ενέργειας. Ωστόσο, υπάρχουν και μέταλλα που δεν ταιριάζουν σε αυτόν τον ορισμό. Για παράδειγμα, ο υδράργυρος είναι υγρό. Στοιχεία όπως το αρσενικό, το βόριο, το γερμάνιο και το τελλούριο γενικά θεωρούνται μεταλλοειδή ή ημιμέταλλα επειδή οι ιδιότητές τους βρίσκονται κάπου ενδιάμεσα σε εκείνες των μετάλλων και των μη μετάλλων. Τα βαρέα μέταλλα ορίζονται με διάφορους τρόπους, με βάση τον σχηματισμό κατιόντων υδροξειδίου, το ειδικό βάρος τους είναι μεγαλύτερο από 5 g/mL και πιο πρόσφατα έχουν συσχετιστεί με τη βιολογική και την περιβαλλοντική τοξικότητα (Fergusson, 1990).

Ως αποτέλεσμα της πολυπλοκότητας των χημικών ορισμών, τα μέταλλα έχουν επίσης ταξινομηθεί σε τρεις επιπλέον κατηγορίες βάσει των βιολογικών λειτουργιών τους και τα αποτελέσματα που επιφέρουν: (1) τα πολύτιμα - βασικά μέταλλα με γνωστές βιολογικές λειτουργίες (2) τα τοξικά μέταλλα και μεταλλοειδή και (3) τα μη πολύτιμα μέταλλα με άγνωστες βιολογικές επιδράσεις.

- Στα πολύτιμα - βασικά μέταλλα που έχουν ουσιώδεις λειτουργίες στους μικροοργανισμούς ανήκουν τα εξής: Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Se, Sn, V, W και Zn (Holden and Adams, 2003). Σε γενικές γραμμές, αυτά τα μέταλλα είναι απαραίτητα για την ενεργότητα ενζύμων, τη μεταφορά μορίων, την πρωτεϊνική δομή και τον έλεγχο της οσμωτικής πίεσης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρότι πρόκειται για μέταλλα απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και μεταβολισμό, σε μεγάλες συγκεντρώσεις ακόμα και αυτά μπορεί να καταλήξουν τοξικά.
- Στα τοξικά μέταλλα ανήκουν: Ag, Al, As, Au, Ge, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb και Sn. Η τοξικότητα των μετάλλων μπορεί να εμφανιστεί με διάφορους τρόπους συμπεριλαμβανομένης της εκτόπισης των απαραίτητων μετάλλων από τη φυσιολογική τους θέση σύνδεσης επί των βιολογικών μορίων, την αναστολή της ενζυμικής λειτουργίας και τη διάσπαση της δομής του νουκλεϊκού οξέος. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωσή τους. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων ενεργοποιούν επιθετικούς μηχανισμούς αντίστασης των μικροοργανισμών, που αυξάνουν την μικροβιακή αντοχή σε αυτά τα μέταλλα. Γενικά η τοξικότητα ενός μετάλλου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προέλευση του, η οποία με τη σειρά της επιδρά στην βιοδιαθεσιμότητα του μετάλλου.
- Τα μη τοξικά μέταλλα περιλαμβάνουν τα: Rb, Cs, Sr και Ti. Αυτά τα μέταλλα κάποιες φορές συσσωρεύονται στα κύτταρα ως αποτέλεσμα της μη ειδικής δέσμευσής τους και μεταφορά τους (Avery, 1995).

ΜΕΤΑΛΛΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΔΜΙΟ

Πρόκειται για ένα μέταλλο με ατομικό βάρος 112,40, πυκνότητα 8,642 g/mL και σημείο στίξεως στους 309,2°C. Σύμφωνα με το ειδικό βάρος του ανήκει στα βαρέα μέταλλα. Είναι σχετικά σπάνιο μέταλλο και κατατάσσεται στην 67^η θέση αφθονίας μεταξύ των στοιχείων στο στερεό φλοιό της γης (Μήτσιος, 2004). Ανακαλύφθηκε το 1817 από τον Γερμανό χημικό F. Strohmayer.

Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία ως προστατευτικό κάλυμμα στο ατσάλι, σε διάφορες χρωστικές ουσίες για πλαστικά, βερνίκια και για το σμάλτο, ως σταθεροποιητής σε πλαστικά, καθώς και σε μπαταρίες Ni-Cd, σε φωτοβολταϊκά κύτταρα και στους μοχλούς ελέγχου των πυρηνικών αντιδραστήρων.

Το κάδμιο δεν είναι από τα μέταλλα που είναι απαραίτητα ως θρεπτικά στοιχεία καθώς δεν λαμβάνει μέρος σε κάποια βιολογική λειτουργία. Η συσσώρευση του σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά καταλήγει, μέσω της τροφικής αλυσίδας, να είναι τοξική για τα ζώα και τον άνθρωπο. Συσσωρεύεται στο ήπαρ, στα νεφρά, στη σπλήνα και το θυρεοειδή αδένες, όπου και προκαλεί σοβαρές παθήσεις, ενώ αντικαθιστά το ασβέστιο των οστών. Η ημιπερίοδος ζωής του στον ανθρώπινο οργανισμό είναι 10-30 χρόνια. Ένα μέρος παρόλα αυτά, αποβάλλεται με τα ούρα (Λουκίδου, 2003).

Το κάδμιο στο έδαφος και η συμπεριφορά του σε αυτό

Η περιεκτικότητα του καδμίου στο έδαφος αναφέρεται ότι δεν υπερβαίνει το 1 μg/g εδάφους. Άλλες μελέτες δείχνουν τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 0,06 - 1,1 μg/g εδάφους με μέση τιμή 0,53 μg/g εδάφους. Μεγαλύτερες περιεκτικότητες από αυτές οφείλονται κυρίως στην επιβάρυνση των εδαφών από ανθρωπογενείς δραστηριότητες.

Οι κυριότερες φυσικές πηγές του καδμίου στο έδαφος είναι τα ορυκτά ZnS (σφαλερίτης και βουρτσίτης) αλλά και άλλα δευτερεύοντα ορυκτά. Ακόμα, τα ιζηματογενή πετρώματα περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ οι φωσφορίτες (σχιστόλιθοι) έχουν ακόμη μεγαλύτερες (Μήτσιος, 2004).

Η αυξημένη όμως παρουσία του καδμίου, που παρατηρείται κυρίως τις τελευταίες δεκαετίες, στο έδαφος οφείλεται, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στις ανθρωπογενείς

δραστηριότητες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η σκόνη που προέρχεται από τα ελαστικά των αυτοκινήτων λόγω τριβής τους με τον δρόμο, τα οποία και περιέχουν 20-70 $\mu\text{g/g}$ καδμίου, ο καπνός που προέρχεται από τα μεταλλεία εξορύξεως ψευδαργύρου (Zn), ο οποίος περιέχει οξείδια Zn και Cd, όπως επίσης και η προσθήκη των φωσφορικών λιπασμάτων για γεωργικές χρήσεις. Επιπλέον, είναι σημαντικό να προστεθεί η σημασία που έχει η ατμοσφαιρική απόθεση του καδμίου στο έδαφος, καθώς η συνολική του εισροή τόσο από την ξηρή απόθεση, όσο και από τις βροχοπτώσεις κυμαίνεται από 2,6 μέχρι 19 g καδμίου ανά εκτάριο το χρόνο στις αγροτικές περιοχές (Μήτσιος, 2004).

Σύμφωνα με τον Holm (1996), κατά την αποσάθρωση των μητρικών πετρωμάτων, το κάδμιο διαλύεται και μεταβαίνει στο εδαφικό διάλυμα με την μορφή ιόντων Cd^{2+} . Με τη χρήση ειδικών μοντέλων έχει αποδειχθεί ότι σε όξινα εδάφη, στο εδαφικό διάλυμα, κυριαρχούν οι εξής μορφές του καδμίου : Cd^{2+} , CdSO_4 και CdCl_4^+ , ενώ σε αλκαλικά εδάφη Cd^{2+} , CdCl^+ , CdSO_4 και CdHCO_3^+ .

Η συγκέντρωση του καδμίου στο έδαφος εξαρτάται από:

- Τη δέσμευση του καδμίου από τη στερεή φάση του εδάφους.
- Την καταβύθιση του καδμίου.

Σε όλους τους τύπους εδαφών, η ενεργότητα (activity) του καδμίου επηρεάζεται έντονα από την τιμή του pH του εδάφους. Στα όξινα εδάφη, η διαλυτότητα του καδμίου επηρεάζεται από την οργανική ουσία, τα οξείδια και τα υδροξείδια, ενώ στα αλκαλικά εδάφη καθοριστικό ρόλο για την αποκατάσταση της ισορροπίας στο εδαφικό διάλυμα παίζει η καταβύθιση των ενώσεων του καδμίου (Μήτσιος, 2004).

Βιοδιαθεσιμότητα Καδμίου

Ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει την πρόσληψη του καδμίου από τα φυτά είναι η τιμή του pH του εδάφους. Σε όξινο περιβάλλον η οργανική ύλη μπορεί να ελέγχει τη διαλυτότητα του μετάλλου, ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον η κατακρήμνιση των ενώσεων του καδμίου ερμηνεύει την ισορροπία του (Κανελλάκης, 2003).

Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του καδμίου που περιέχεται στο εδαφικό διάλυμα, τόσο αυξάνεται και η πρόσληψη του καδμίου από τα φυτά. Αυτό συμβαίνει γιατί η αναλογία του υδατοδιαλυτού καδμίου ελαττώνεται λόγω κάποιας ελάττωσης του δυναμικού οξειδοαναγωγής των εδαφών (Μήτσιος, 2004).

Έχει παρατηρηθεί ακόμα ότι η απορρόφηση του καδμίου κυμαίνεται σε διάφορα επίπεδα ανάλογα με το φυτικό είδος. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα βρέθηκε στο σπανάκι και στα γογγύλια.

Καθώς το κάδμιο μετακινείται εύκολα μέσα στο φυτό από τις ρίζες προς τα φύλλα, επόμενο είναι όταν η συγκέντρωση του καδμίου μέσα στο εδαφικό διάλυμα είναι υψηλή, να συσσωρεύεται μια μεγάλη ποσότητα στους ιστούς των φύλλων (Khan *et al.*, 2010; PanandYu, 2011).

ΜΟΛΥΒΔΟΣ

Ο μόλυβδος είναι ένα ακόμα μέταλλο που δεν είναι απαραίτητο για τα ζώα και τα φυτά. Αποτελεί ένα από τα πολύ επικίνδυνα δηλητήρια για τον άνθρωπο και κυρίως για τα πολύ νεαρά άτομα καθώς οι ιστοί και τα όργανα τους είναι ακόμα πολύ ευαίσθητα. Ο μόλυβδος είναι ικανός να επηρεάσει την πνευματική ανάπτυξη, τη λειτουργία των νεφρών καθώς και τη χημεία του αίματος.

Συνήθως στο έδαφος τον συναντάμε σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 20 mg/kg εδάφους. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποδεικνύουν έδαφος που έχει υποστεί ρύπανση από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Λόγω της χαμηλής του διαλυτότητας συσσωρεύεται σε μεγάλο βαθμό στο έδαφος. Οι κυριότερες μορφές που απαντάται είναι: PbS, PbO, PbSO₄ και PbO.PbSO₄ (Μήτσιος, 2004).

Ο μόλυβδος στο έδαφος και η συμπεριφορά του σε αυτό

Αποτελεί ένα από τα λιγότερο διαλυτά βαρέα στοιχεία. Η ημιζωή του μολύβδου στα εδάφη κυμαίνεται από 800 έως 6000 χρόνια. Μερικές από τις δυσδιάλυτες ενώσεις του Pb είναι: Pb(OH)₂, PbCO₃, PbS, PbSO₄, PbO, Pb₃(PO₄)₂, Pb₄O(PO₄)₂. Το είδος των μορφών που απαντάται, εξαρτάται από το pH του εδάφους, την πηγή του Pb, τα παρόντα ανιονικά είδη και τις συνθήκες οξειδοαναγωγής (PanandYu, 2011).

Η συσσώρευση του μολύβδου στην επιφάνεια των εδαφών έχει μεγάλη οικολογική σημασία, γιατί ο μόλυβδος επηρεάζει τη βιολογική δραστηριότητα στα εδάφη. Αυξημένα επίπεδα μολύβδου στο έδαφος είναι δυνατό να περιορίσουν την ενζυμική δράση στους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα στον επιφανειακό ορίζοντα, να συσσωρεύεται οργανική ουσία η οποία δεν αποικοδομείται. Διάφορες συγκεντρώσεις μολύβδου που

προσδιορίστηκαν σε εδαφικά διαλύματα ήταν της τάξεως του 10^{-7} M και του 10^{-9} M (Μήτσιος, 2004).

Οι κυριότερες γεωχημικές προελεύσεις του μολύβδου αποτελούν τα ορυκτά τα οποία περιέχουν πυρίτιο, τα ιζηματογενή πετρώματα, τα ορυκτά της αργίλου καθώς και η οργανική ουσία. Ο μολύβδος επίσης μπορεί να εμφανιστεί στο έδαφος λόγω ατμοσφαιρικής απόθεσης και λόγω γεωργικών δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα μέσω της χρήσης αρσενικού μολύβδου ως φυτοφάρμακο για τον ψεκασμό των οπωροφόρων δέντρων.

Η κινητικότητα και η συγκράτηση του μολύβδου από τη στερεή φάση του εδάφους εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την τιμή του pH και την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων. Η επίδραση της οργανικής ουσίας στη συγκράτηση του μολύβδου είναι σημαντικότερη σε σχέση με την καταβύθιση του ως ανθρακικό άλας ή την προσρόφηση του από τα ένυδρα οξείδια. Έχει παρατηρηθεί βέβαια η εκλεκτική προσρόφηση του μολύβδου από τα οξείδια του σιδήρου, σε σχέση με το χούμο και τον καολινίτη και είναι γνωστό ότι στα εδάφη τα οποία βρίσκονται δίπλα σε δρόμους μόνο το 0,7% του ποσοστού του μολύβδου είναι σε ανταλλάξιμη μορφή, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό, είναι δεσμευμένο από την οργανική ουσία του εδάφους και ένα μικρό μόνο ποσοστό του μολύβδου βρέθηκε να είναι δεσμευμένο στα οξείδια του σιδήρου (Μήτσιος, 2004).

Βιοδιαθεσιμότητα μολύβδου

Ο μολύβδος προσλαμβάνεται από τα ριζικά τριχίδια μέσω μιας παθητικής διαδικασίας και συγκρατείται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ρίζας. Η ποσότητα του μολύβδου που προσλαμβάνεται από τα φυτά σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του μολύβδου που υπάρχει στο έδαφος. Η πρόσληψη του μολύβδου από τα φυτά αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου και με την πάροδο του χρόνου. Όσο αυξάνεται η τιμή του pH του εδάφους, συνήθως μέσω ασβέστωσης, ο ρυθμός πρόσληψης του μολύβδου από τα φυτά ελαττώνεται, καθώς και όσο η θερμοκρασία του εδάφους ελαττώνεται.

Έχει υποστηριχθεί ότι ο μολύβδος είναι δυνατό να συνδεθεί στενά με την κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων και με τον τρόπο αυτό τα είδη που είναι ανθεκτικά στις συγκεντρώσεις του μολύβδου, μπορούν να δεσμεύσουν και να αδρανοποιήσουν μεγάλες ποσότητες μολύβδου (Μήτσιος, 2004).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Πιστεύεται ότι οι μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει τους μηχανισμούς άμυνάς τους κυρίως λόγω της έκθεσής τους σε αυτά από τότε που συνυπήρξαν στον πλανήτη. Βέβαια, καθώς τα τελευταία τουλάχιστον 50 χρόνια η ανθρωπογενής παρέμβαση στο περιβάλλον αυξήθηκε, παρατηρείται και ανάπτυξη σε όλους αυτούς τους μηχανισμούς άμυνας. Έτσι, όσο αυξάνεται η ανθρωπογενής παρέμβαση και επιβάρυνση του περιβάλλοντος με μέταλλα, τόσο αυξάνεται και η ανάγκη να μελετηθεί παραπάνω η τοξικότητα των μετάλλων στους μικροοργανισμούς και οι μηχανισμοί άμυνάς τους, ώστε τελικά να αναπτυχθούν και καινούριες μέθοδοι αποκατάστασης επιβαρυσμένων εδαφών (Zhang *et al.*, 2009).

Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύ έξυπνους μηχανισμούς αντίστασης στα μέταλλα και αποτοξίνωσης από αυτά. Πολλούς από τους προσδιοριστικούς παράγοντες αντίστασης βρίσκονται κωδικοποιημένοι στα χρωμοσώματα. Υπάρχουν βέβαια και μερικοί που βρίσκονται κωδικοποιημένοι στα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως τα πλασμίδια. Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα μέταλλα μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες. Αυτές περιλαμβάνουν:

- Γενικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που δεν απαιτούν επιβάρυνση μετάλλων.
- Γενικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που ενεργοποιούνται από την επιβάρυνση μετάλλων.
- Μηχανισμούς ανθεκτικότητας που ενεργοποιούνται μόνο από ένα συγκεκριμένο μέταλλο(RoaneandKellogg, 2014).

ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η δέσμευση των μετάλλων σε εξωκυτταρικά υλικά έχει τη δυνατότητα να ακινητοποιήσει το μέταλλο και με αυτό τον τρόπο να αποτραπεί η είσοδός του στο κύτταρο. Η δέσμευση των μετάλλων από ανιονικές ομάδες στην επιφάνεια κυττάρων απαντάται σε έναν μεγάλο αριθμό κατιονικών μετάλλων, όπως το κάδμιο, ο μόλυβδος, ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος. Η ικανότητα αυτή των κυττάρων, να απορροφούν τα μέταλλα, έχει αναπτυχθεί τεχνολογικά και έχει χρησιμοποιηθεί στην αφαίρεση μετάλλων από ρεύματα αποβλήτων.

- Η εξωκυτταρική δέσμευση συνήθως εμφανίζεται σε εξωπολυμερή που αποτελούνται από υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες και κάποιες φορές από

νουκλεϊκά και λιπαράοξέα (SchiewerandVolesky, 2000). Ένα εξωπολυμερές είναι ένα βιοπολυμερές που εκκρίνεται από έναν οργανισμό στο περιβάλλον του. Αυτά τα εξωπολυμερή ή αλλιώς οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες είναι συνήθη σε φυσικά περιβάλλοντα και ουσιαστικά παρέχουν μικροβιακή προστασία ενάντια στην ξήρανση, την φαγοκυττάρωση και τον παρασιτισμό. Τα εξωπολυμερή αυτά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στη δέσμευση βαρέων μετάλλων, όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και το ουράνιο. Η απομάκρυνση μετάλλων μέσω της διαδικασίας παραγωγής εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών, έχει ως αποτέλεσμα την ακινητοποίηση των μετάλλων και την πρόληψη τυχόν εισόδου στο κύτταρο. Για παράδειγμα η ακινητοποίηση του μολύβδου από εξωπολυμερή έχει αποδειχθεί σε αρκετά βακτηριακά είδη, όπως ο *Staphylococcus aureus*. Γενικά αυτός ο μηχανισμός λαμβάνει χώρα κατά του μολύβδου.

- Ένα δεύτερο εξωκυτταρικό μόριο που παράγεται μικροβιακά είναι τα σιδηροφόρα (siderophore). Η βιολογική λειτουργία της συγκεκριμένης ένωσης είναι να συλλέγει τον σίδηρο σε περιβάλλοντα όπου η συγκέντρωση είναι χαμηλή και στη συνέχεια να διευκολύνει την μεταφορά του στο κύτταρο. Η ένωση αυτή μπορεί να αλληλεπιδράσει και με άλλα μέταλλα που έχουν παρόμοια χημεία με αυτή του σιδήρου, όπως το αλουμίνιο και το χρώμιο. Μέσω της δέσμευσης των μετάλλων είναι ικανό να μειωθεί η βιοδιαθεσιμότητα και ως εκ τούτου η τοξικότητά τους.
- Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι κατηγορία ενώσεων που παράγονται από πολλούς μικροοργανισμούς που σε πολλές περιπτώσεις εκκρίνονται από το κύτταρο. Αυτές οι ενώσεις έχουν ερευνηθεί για την ικανότητα τους να συγκρατούν μέταλλα, όπως το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο ψευδάργυρος (MaierandSoberon-Chavez, 2000).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Οι ελεύθεροι, μη συμβιωτικοί μικροοργανισμοί, για να αφαιρέσουν τα μέταλλα από το κύτταρο, χρησιμοποιούν συστήματα εκροής μετάλλων βασιζόμενα στην ενέργεια. Αυτοί οι μηχανισμοί καταφέρνουν αποτελεσματικά να αντλήσουν τα τοξικά ιόντα, τα οποία έχουν εισέλθει στο κύτταρο, εκτός κυττάρου. Ένα παράδειγμα είναι η αντίσταση στο κάδμιο με βάση αυτή την εκροή. Έχουν μελετηθεί αρκετά βακτήρια όσον αφορά στην αντίστασή τους στο κάδμιο, όπως *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria* sp.,

Pseudomonas putida και *Staphylococcus aureus* καθώς και μερικά κυανοβακτήρια, μύκητες και άλγη.

Οι Naik και Dubey (2013) αναφέρουν ότι ο μόλυβδος (Pb) προκαλεί σοβαρές βλάβες στους οργανισμούς, καθώς είναι μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο μέταλλο. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζουν βακτηρικά στελέχη, που χρησιμοποιούν μια ποικιλία προστατευτικών μηχανισμών για να επιβιώσουν σε πολύ υψηλά επίπεδα μολύβδου χωρίς καμία επίπτωση στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους. Προκειμένου να αντέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου, τα βακτήρια αυτά αναπτύσσουν διάφορους μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν εκροή, εξωκυττάρια παγίδευση, βιορρόφηση, καθίζηση, αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων, αυξημένη παραγωγή σιδηροφόρων και ενδοκυτταρική βιοσυσσώρευση (Naik *et al.*, 2013)

Τα βακτήρια επίσης μπορούν να χρησιμοποιήσουν και άλλους μηχανισμούς ξεχωριστά ή σε συνδυασμό με άλλους όπως η μεθυλίωση. Η συγκεκριμένη διεργασία θεωρείται μηχανισμός αντίστασης εξαρτώμενος από τα μέταλλα, επειδή μόνο ορισμένα μέταλλα μεθυλιώνονται. Η μεθυλίωση μπορεί να αυξήσει την μεταβλητότητα του μετάλλου, καθώς και την τοξικότητα του μετάλλου, αυξάνοντας έτσι την διείσδυση των μετάλλων μέσω κυτταρικής μεμβράνης. Ωστόσο, με ορισμένα μέταλλα όπως το σελήνιο, μπορεί να δράσει διαφορετικά, μειώνοντας την τοξικότητα τους. Η μεθυλίωση παρατηρείται επίσης στον μόλυβδο και στον κασσίτερο. Η μεθυλίωση σαν διαδικασία διευκολύνει την διάχυση του μετάλλου μακριά από το κύτταρο, μειώνοντας έτσι αποτελεσματικά την συνολική τοξικότητα του μετάλλου (Zhang *et al.*, 2009).

Ακολουθεί ο συνοπτικός Πίνακας 2 που παρουσιάζει είδη μικροοργανισμών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων:

Πίνακας 2. Μικροοργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί για ορισμένα βαρέα μέταλλα.[3]

Μικροοργανισμοί	Βαρέα μέταλλα
<i>Bacillus spp.</i>	Cu, Zn
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	U, Cu, Ni
<i>Zooglea spp.</i>	Co, Ni, Cd
<i>Citrobacter spp.</i>	Cd, U, Pb
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au, Cu, Ni, U, Pb, Hg, Zn
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, Zn, Ag, Th, U
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cd, Cu, Zn
<i>Phizopus arrhizus</i>	Ag, Hg, P
<i>Stereum hirsutum</i>	Cd, Pb, Ca
<i>Phormidium valderium</i>	Cd, Co, Cu, Ni
<i>Ganoderma applanatus</i>	Cd, Pb
<i>Volvariella volvacea</i>	Cu, Hg, Pb

ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η βιοαποκατάσταση (bioremediation) αποτελεί την δυνατότητα καταστροφής επιβλαβών ουσιών με τη χρήση μικροοργανισμών, ενζύμων ή φυτών. Σκοπός της διαδικασίας είναι η μετατροπή τοξικών ουσιών σε λιγότερο τοξικές μορφές (Vidali, 2001).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι βιοαποκατάστασης από τοξικά μέταλλα, όπως η βιοδιέγερση (biostimulation), η βιοαύξηση (bioaugmentation) και η φυτοεξυγίανση (phytoremediation).

- Η φυτοεξυγίανση είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φυτά σε συνδυασμό με τους ενδογενείς μικροοργανισμούς, με σκοπό να απομακρυνθούν ή να μετατραπούν οργανικοί και ανόργανοι ρύποι (Agarry et al., 2014)
- Όσον αφορά στη βιοδιέγερση (biostimulation), πρόκειται για μια μέθοδο αποκατάστασης των εδαφών, με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου,

με σκοπό την ενίσχυση των αυτόχθονων μικροοργανισμών. Στόχος της μεθόδου είναι η δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών ώστε να παραχθούν τα απαραίτητα ένζυμα για την διάσπαση των ρύπων (Vidali, 2001).

- Τέλος η βιοαύξηση (bioaugmentation) είναι μια τεχνική κατά την οποία στην εξεταζόμενη περιοχή προστίθενται μικροοργανισμοί για την μείωση των ρύπων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στον έλεγχο της ανθεκτικότητας μικροοργανισμών που βρίσκονται στο έδαφος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και στη δυνατότητα απομάκρυνσής τους.

Τα στάδια εκτέλεσης συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Συλλογή δειγμάτων εδάφους από διάφορες περιοχές του Ν. Χανίων και απομόνωση αυτόχθονων βακτηρίων.
- Έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων αυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επιλεγμένων διαλυμάτων βαρέων μετάλλων.
- Έλεγχος απομάκρυνσης των μετάλλων από τα διαλύματα ως αποτέλεσμα δράσης των βακτηρίων.
- Ταυτοποίηση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών.
- Έλεγχος ανθεκτικότητας των ταυτοποιημένων στελεχών σε δείγματα εδάφους, κατόπιν προσθήκης των μετάλλων.
- Δυνατότητα απομάκρυνσης των μετάλλων από τα δείγματα εδάφους κατόπιν δράσης των βακτηρίων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm
- Διάλυμα Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1), (Sigma-Aldrich)
- Λυσοζύμη - Lysozyme molecular biology grade (Applichem)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADERayra)
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- Μετρητής αποικιών (Stuart)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

- Cadmium nitrate tetrahydrate (Cd), 20911 (FlukaChemika)
- Lead(II) nitrate (Pb), 31137 (Riedel-de Haen)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Nutrient Agar (HiMedia Laboratories)
- Nutrient Broth (HiMedia Laboratories)
- Διάλυμα NaCl 0,9wt%

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE), συγκέντρωσης 50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0, αποστειρωμένο στους 121 °C για 15min.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme lysis buffer, 100mM NaCl, 500mM Tris, pH 8.0, Lysozyme 30 mg/mL.
- Διάλυμα 10% SDS.
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K 20 mg/mL.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η διαδικασία της δειγματοληψίας έγινε κατά το μήνα Οκτώβριο του 2014. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από τον νομό Χανίων, τα μισά εκ των οποίων από την περιοχή του δήμου Ακρωτηρίου Χανίων και τα άλλα μισά από τη δημοτική ενότητα Μουσούρων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τις πρωινές ώρες και το βάθος εκσκαφής ήταν περίπου 0,5 m. Οι μέρες που συλλέχθηκαν τα δείγματα ήταν ηλιόλουστες.

Η επεξεργασία των δειγμάτων, δηλαδή το κοσκίνισμα και οι μικροβιολογική ανάλυση γινόταν σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 24 ωρών από τη δειγματοληψία.

Πίνακας 3. Περιοχές Δειγματοληψιών

<u>Δείγμα</u>	<u>Τοποθεσία δειγματοληψίας</u>	<u>Σχόλια</u>	<u>Ημερομηνία</u>
1	Δήμος Πλατανιά, περιοχή Κουφού Χανίων	Χωματώδης περιοχή ανάμεσα σε καλλιεργήσιμα χωράφια με ρεβυθιές	17/10/2014
2	Αρώνι, Ακρωτήρι Χανίων	Χωματώδης περιοχή δίπλα από κατοικήσιμη περιοχή	16/10/2014
3	Βατόλακος	Χωματώδης περιοχή ανάμεσα σε καλλιεργήσιμα χωράφια με πορτοκαλιές	14/10/2014
4	Παραλία Αγίου Ονούφριου	Αμμώδης περιοχή	21/10/2014
5	Άγιος Ονούφριος	Χωματώδης περιοχή δίπλα από την παραλία	21/10/2014
6	Αλικιανός	Χωματώδης περιοχή ανάμεσα σε καλλιεργήσιμα χωράφια με λεμονιές	21/10/2014
7	Πολυτεχνείο Κρήτης	Χωματώδης περιοχή	24/10/2014

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΔΑΦΙΚΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

Η περιεχόμενη στο έδαφος υγρασία είναι σημαντική για την ύπαρξη των μικροοργανισμών και μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη φυσική εμφάνιση αλλά και τις ιδιότητες των εδαφών. Ακόμα, χρησιμεύει και στη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών των μικροοργανισμών και την απομάκρυνση των άχρηστων ουσιών.

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων αναφέρονται σε ξηρό έδαφος.

Η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία αναφέρεται συνήθως ως «βαρομετρική περιεχόμενη υγρασία», θg , η οποία είναι η μάζα του νερού ανά μονάδα μάζας ξηρού χώματος.

$$\theta g = \frac{m - d}{d}$$

Όπου m η μάζα του νερού χώματος και d η μάζα του ίδιου χώματος μετά την ξήρανση σε κλίβανο.

Όλα τα δείγματα κοσκινίστηκαν και στη συνέχεια ζυγίστηκαν 25g (=m). Έπειτα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 105°C για 24 ώρες. Ύστερα ζυγίστηκαν πάλι και σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο προσδιορίστηκε η εδαφική τους υγρασία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Υγρασία των εδαφικών δειγμάτων

Δείγμα	θg
1	0,0341
2	0,0804
3	0,0852
4	0,0022
5	0,0038
6	0,1290
7	0,0253

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Για την απομόνωση των βακτηριακών στελεχών των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ακολουθήθηκε η τεχνική της επιφανειακής διασποράς σε στερεό θρεπτικό υλικό (άγαρ).

Η αραίωση των δειγμάτων ήταν υποχρεωτική καθώς τα κύτταρα σε αυτά βρίσκονταν σε υψηλή συγκέντρωση. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις με αποστειρωμένο νερό από τις οποίες ελήφθη ποσότητα που επιστρώθηκε σε θρεπτικό υλικό PeptoneYeast Agar.

Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 72h. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράζονται σε CFUs/γξηρού χώματος (Πίνακας 4).

Πίνακας 5. Πληθυσμός μικροοργανισμών στα δείγματα εδάφους

Δείγμα	CFU/gr ξηρού χώματος
1	$3,1 \times 10^8$
2	$6,2 \times 10^8$
3	$1,9 \times 10^8$
4	$4,5 \times 10^5$
5	$4,8 \times 10^7$
6	$1,8 \times 10^7$
7	$2,8 \times 10^7$

Από τα τρυβλία του κάθε δείγματος επιλέχθηκαν ορισμένες αποικίες, οι οποίες διέφεραν στη μορφολογία μεταξύ τους. Τελικά επιλέχθηκαν 37 αποικίες, οι οποίες αντιστοιχούν σε 37 βακτήρια. Αυτά ήταν τα πιθανά προς μελέτη βακτήρια, τα οποία αφού συλλέχθηκαν, φυλάχθηκαν στην βαθιά ψύξη (-80 °C).

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΒΑΘΙΑ ΨΥΞΗ (-80°C)

Η συντήρηση έγινε ως εξής:

Καλλιέργεια του βακτηρίου σε θρεπτικό υλικό Nutrient Broth, το οποίο περιείχε διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v & επώαση για 24 h. Κατόπιν της επώασης η καλλιέργεια φυλάσσεται στους -80°C.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε με τη χρήση διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και των ενζύμων πρωτεϊνάσης K και λυσοζύμης.

Διαλύματα που παρασκευάστηκαν για την απομόνωση του γενετικού υλικού:

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris- EDTA (TE): Το διάλυμα αποτελείται από Tris 50mM και EDTA 50mM (pH 8,0 & αποστείρωση σε αυτόκαυστο).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme Lysis buffer: Το διάλυμα αποτελείται από NaCl 100mM, Tris 500mM (pH 8.0) και από το ένζυμο λυσοζύμη συγκέντρωσης 30mg/mL.

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Λήψη 1mL υγρής καλλιέργειας.
2. Φυγοκέντρωση στις 4000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Λήψη ιζήματος & διάλυση προσθέτοντας 467μL TE.
4. Προσθήκη 30μL SDS συγκέντρωσης 10w/v.
5. Προσθήκη 3μL διαλύματος ενζύμου πρωτεϊνάση-K συγκέντρωσης 20mg/mL και 100μL διαλύματος Lysozyme lysis buffer. Ανάδευση με πιπέτα.
6. Επώαση στους 65°C για 1 h. Η επώαση γίνεται σε Block Heater.
7. Προσθήκη 80μL CTAB που περιέχει 0.7% χλωριούχο νάτριο.
8. Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά.
9. Προσθήκη 750μL διαλύματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
10. Έντονη ανάδευση με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα Vortex.
11. Φυγοκέντρωση στα 6000 g για 10 λεπτά.
12. Λήψη της υδατικής φάσης και μεταφορά της σε νέο eppendorf.

13. Προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης και ανάδευση με πιπέτα.
14. Παραμονή στους -20°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
15. Φυγοκέντρωση στα 10.000 g και στους 4°C για 20 λεπτά.
16. Απόρριψη του υπερκείμενου και λήψη του ιζήματος (DNA).
17. Καθαρισμός του γενετικού υλικού προσθέτοντας 500μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και αναδεύοντας με πιπέτα.
18. Φυγοκέντρωση στα 10.000 g και στους 4°C .
19. Απόρριψη της αιθανόλης, λήψη του ιζήματος και επανάληψη της διαδικασίας καθαρισμού του γενετικού υλικού με προσθήκη αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και εκ νέου φυγοκέντρωση στα 10.000 g και στους 4°C για 10 λεπτά.
20. Λήψη του ιζήματος και τοποθέτηση του eppendorf στους 37°C στο Blockheater προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη.
21. Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50μL TE.
22. Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20°C .

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Μία από τις μεθόδους για τον προσδιορισμό της ποσότητας και καθαρότητας του DNA είναι η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται φωτομέτρηση του γενετικού υλικού στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση (*Optical Density* – *OD*) στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκέντρωσης του γενετικού υλικού στο υπό εξέταση δείγμα. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μιας μονάδας αντιστοιχεί σε 50 μg/ml δίκλωνου DNA, 40 μg/ml μονόκλωνου DNA και RNA και περίπου σε 20 μg/ml μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η αναλογία των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, αντίστοιχα (OD_{260}/OD_{280}) επιτρέπει τον προσδιορισμό της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Η τιμή της αναλογίας για υψηλής καθαρότητας DNA είναι 1.8. Εάν υπάρχει επιμόλυνση πρωτεϊνών ή φαινόλης η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατος ο ακριβής προσδιορισμός της ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του γενετικού υλικού χρησιμοποιείται ο εξής τύπος:

$$C_{DNA} = OD_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times d, \text{ όπου } d \text{ συντελεστής αραίωσης}$$

Σύμφωνα με την ποσότητα και την καθαρότητα των δειγμάτων DNA, επιλέχθηκαν 11 από τα συνολικά 37 στελέχη, τα οποία, ύστερα από την ταυτοποίηση τους ελέγχθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους απέναντι στα βαρέα μέταλλα.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR (polymerase chain reaction) χρησιμοποιώντας το απομονωμένο DNA των βακτηριακών στελεχών και τους ακόλουθους εκκινητές (universal primers) (Dupont, et al., 2013):

- 8F: 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
- 1492R: 5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'

Το μίγμα και οι κύκλοι αντίδρασης της PCR ήταν τα εξής:

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1x
MgCl ₂	2,5mM
dNTPs	0,25mM
Primer 8F	0,5μM
Primer 1492R	0,5μM
Taq	2U
DNA	70ng

Κύκλοι αντίδρασης της PCR

95°C	4min	30 κύκλοι
95°C	1min	
55°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	7min	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % και ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (DNAsequencing) στην εταιρία StarSEQ (Γερμανία).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΓΝΩΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΓΕΝΗ

Σε αυτό το σημείο έγινε ταυτοποίηση των αλληλουχιών μέσω του προγράμματος επεξεργασίας Bioedit και της βάσης δεδομένων αλληλουχιών NCBI (National Center for Biotechnology Information) - BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>ncbi].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Για τον έλεγχο ανθεκτικότητας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιλέχθηκαν 11 από τα συνολικά 37 απομονωμένα στελέχη, λόγω καλύτερης σχέσης ποσότητας-καθαρότητας του απομονωμένου τους DNA. Για τα στελέχη αυτά ελέγχθηκε η βιωσιμότητά τους κατά την παραμονή/επώασή τους σε υγρό θρεπτικό διάλυμα που περιείχε τα δύο μέταλλα υπό εξέταση (Cd&Pb) σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων που ελέγχθηκαν ήταν 50,100,200,300 και 400 mg/L. Η διάρκεια του ελέγχου ήταν 4 ημέρες και για κάθε μια από αυτές γινόταν η μέτρηση και καταγραφή της οπτικής απορρόφησης του κάθε υγρού δείγματος (600nm), καθώς και καλλιέργεια αυτού στο κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό ώστε να καταγράφεται η αύξηση ή μείωση του πληθυσμού του κάθε στελέχους με το πέρασμα των ημερών.

Έτσι συνοπτικά, σε κάθε βακτήριο αντιστοιχούν 10 δείγματα, 5 που αντιστοιχούν στον έλεγχο παρουσίας Cd και 5 που αντιστοιχούν στον έλεγχο παρουσίας Pb.

Κάθε δείγμα περιείχε:

- επιθυμητή συγκέντρωση του μετάλλου
- ανάλογη ποσότητα Nutrient Broth
- βακτηριακό στέλεχος σε συγκέντρωση 10^5 CFU/mL.

Ο συνολικός όγκος του διαλύματος σε δείγμα ήταν 30mL.

Η συγκέντρωση κάθε στελέχους (10^5 CFU/mL) στα δείγματα υπολογίστηκε βάσει φωτομέτρησης στα 600 nm πυκνού εναιωρήματος κάθε στελέχους [οπτική απορρόφηση (OD) ίση με 0.1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση βακτηρίου είναι 10^8 CFU/mL].

Κάθε ημέρα γινόταν λήψη δείγματος από κάθε διάλυμα ώστε να επιστρωθεί ποσότητα 200μL σε δύο τρυβλία. Τα τρυβλία αυτά αφήνονταν για περίπου 20min προκειμένου να ενσωματωθεί στο θρεπτικό υλικό το δείγμα και στη συνέχεια αφήνονταν για 24-48 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

Στο τέλος των τεσσάρων ημερών που διήρκεσε ο έλεγχος ανθεκτικότητας των επιλεγμένων βακτηρίων στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Καδμίου και Μολύβδου, έγινε έλεγχος των υγρών δειγμάτων όσον αφορά στην συγκέντρωση των δύο αυτών μετάλλων, ώστε να καταγραφεί η αύξηση, μείωση ή παραμονή στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσής τους.

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι μετά το πέρας της διαδικασίας, συλλέχθηκαν αποικίες από τις καλλιέργειες των βακτηρίων κατά την 4^η μέρα, με σκοπό την φύλαξη τους στη βαθιά ψύξη.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ & ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Το τελευταίο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της συμπεριφοράς των βακτηρίων που είχαν τον καλύτερο συνδυασμό ανθεκτικότητας και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων στο φυσικό τους περιβάλλον, δηλαδή στο δείγμα χόματος απ' όπου συλλέχθηκαν, κάτω από συνθήκες ρύπανσης βαρέων μετάλλων σε διάρκεια 7 ημερών.

Από τα έντεκα (11) βακτηριακά στελέχη που ελέγχθηκαν παραπάνω ως προς την ανθεκτικότητα τους στο Κάδμιο και τον Μόλυβδο, επιλέχθηκαν 3 που παρουσίασαν υψηλότερη ανθεκτικότητα. Το καθένα ελέγχθηκε στο δείγμα χόματος απ' όπου συλλέχθηκε. Όλα τα δείγματα χόματος αποστειρώθηκαν ώστε να προστεθούν στη συνέχεια τα βακτήρια ενδιαφέροντος, χωρίς άλλα βακτήρια να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα.

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι αυτή η τελευταία διαδικασία συμπεριλάμβανε τα τρία αυτά βακτήρια πριν και μετά τη διαδικασία εγκλιματισμού τους παρουσία των μετάλλων, η οποία πραγματοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο.

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε ένα από τα τρία στελέχη ετοιμάστηκαν έξι (6) δείγματα. Αυτά ήταν τα εξής:

- 100gr χώματος + 300mg/L Pb + 10^5 CFU/mL αρχικού βακτηρίου (προ εγκλιματισμού)
- 100gr χώματος + 300mg/L Pb + 10^5 CFU/mL βακτηρίου κατόπιν εγκλιματισμού με το υπό εξέταση μέταλλο (Pb)
- 100gr χώματος + 300mg/L Cd + 10^5 CFU/mL αρχικού βακτηρίου (προ εγκλιματισμού)
- 100gr χώματος + 300mg/L Cd + 10^5 CFU/mL βακτηρίου κατόπιν εγκλιματισμού με το υπό εξέταση μέταλλο (Cd)
- 100gr χώματος + 300mg/L Pb + 300mg/L Cd + 10^5 CFU/mL αρχικού βακτηρίου (προ εγκλιματισμού)
- 100gr χώματος + 300mg/L Pb + 300mg/L Cd + κατόπιν εγκλιματισμού με τα υπό εξέταση μέταλλα (Cd&Pb)

Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 7 ημέρες, όπου κατά την 2^η, 5^η και 7^η μέρα μια ποσότητα δείγματος καλλιεργούνταν σε τρυβλία petri με στερεό θρεπτικό υλικό nutrient agar, με σκοπό την μέτρηση των αποικιών (CFU/grξηρού χώματος).

Κάθε μια από αυτές τις ημέρες, μικρή ποσότητα κάθε δείγματος του κάθε βακτηρίου ελέγχθηκε ως προς την συγκέντρωση του σε κάδμιο και μόλυβδο με σκοπό τη σύγκριση αύξησης-μείωσης πληθυσμού σε αυτά με την πιθανή μείωση του κάθε μετάλλου.

Τα στερεά δείγματα αναλύθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών μετάλλων με τη χρήση του ICP-MS 7500cx, αφού προετοιμάστηκαν κατάλληλα με τη βοήθεια της υγρής χώνευσης με μικροκύματα (Multiwave 3000, AntonPaar), προκειμένου να παραληφθούν σε διαλυτή μορφή τα προς ανάλυση στοιχεία. Για την υγρή χώνευση χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου EPA3051 (Standard methods in microwave assisted sample preparation, Application Note by Anton Paar). Συγκεκριμένα, ζυγίστηκε ποσότητα στερεού δείγματος (0.25-0.5g) και χωνεύτηκε με 9 mL HNO₃ (>69% traceselectgrade, Fluka) ακολουθώντας το εξής πρόγραμμα:

Πίνακας 6: Πρωτόκολλο υγρής χώνευσης στερεών δειγμάτων.

Stage	Power	Ramp in	Hold	Comment
1	600W	6 min		<u>At 800W:</u> Max Temperature: 200°C Max Pressure: 40bar
2	800W		14min	
3	0W		15min	Reach room temperature

Έπειτα, τα χωνευμένα δείγματα αραιώθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε προσεκτικά, διηθήθηκε (0,45μm, Whatman), αραιώθηκε κατάλληλα και αναλύθηκε με συνθήκες ίδιες με αυτές των υγρών δειγμάτων (παράμετροι λειτουργίας ICP-MS, επεξεργασία και ανάλυση αποτελεσμάτων, έλεγχος αξιοπιστίας χώνευσης και ανάλυσης των στερεών δειγμάτων).

Τέλος, η ανάλυση των δειγμάτων για μέταλλα έγινε με τη χρήση του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με φασματομετρία μαζών (ICP-MS 7500cx coupled with Autosampler Series 3000, both by Agilent Technologies). Κατά την ανάλυση των μετάλλων με το ICP-MS αξιοποιήθηκε η δυνατότητα του οργάνου να λειτουργεί σε collision (He) ή/και reaction (H₂) mode με στόχο την παραγωγή ακόμα πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων λόγω του περιορισμού των ισοβαρών παρεμποδίσεων. Οι συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS ήταν οι ακόλουθες:

Πίνακας 7: Συνθήκες λειτουργίας ICP-MS.

RF power(W)	1500	Collision gas	He
Plasma gas flow (L/min)	0,82	Collision gas flow (mL/min)	4,5
Auxiliary gas flow (L/min)	0,26	Reaction gas	H ₂
Sampling/Skimmer cone	Ni	Reaction gas flow (mL/min)	3,5
Nebulizer type	MicroMist	Solution uptake (uL/min)	160
S/C temperature	2° C	Integration time (sec per mass)	0,30
Replicates	3		

Γενικά, η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης (5 τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, με συντελεστή συσχέτισης (r) της τάξης του 0,99 για κάθε στοιχείο) χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις κατάλληλης καθαρότητας της εταιρείας Merck. Τα όρια ανίχνευσης προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης με κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς (ChemstationSoftwarebyAgilent).

Επιπλέον, έγιναν αναλύσεις στα 3 εξεταζόμενα δείγματα χόματος και καταγράφηκαν οι τιμές του άνθρακα, του αζώτου και του φωσφόρου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

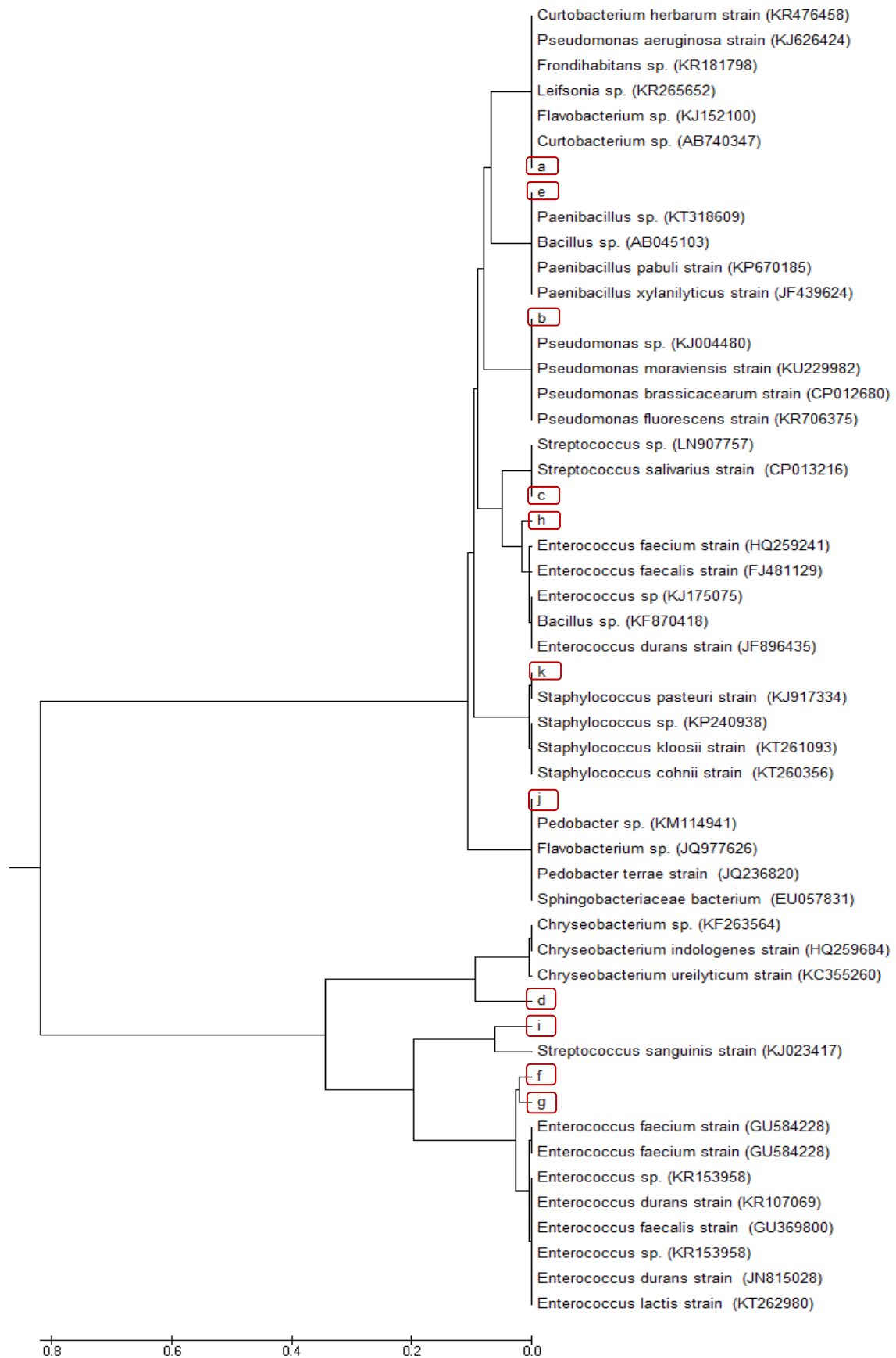
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση βακτηριακών στελεχών από δείγματα εδάφους με καλλιεργητική μέθοδο. Από αυτά επιλέχθηκαν 11 προς ταυτοποίηση, τα οποία προέρχονταν από διαφορετικά δείγματα εδάφους και τα οποία εμφάνισαν διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά στις αναπτυσσόμενες αποικίες. Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στη μεθοδολογία, η ταυτοποίηση έγινε με τη βοήθεια της PCR και τη χρήση universal primers, μέσω της οποίας προέκυψαν προϊόντα στα οποία αναλύθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Με τη χρήση ειδικών λογισμικών προγραμμάτων και της βάσης δεδομένων NCBI (NationalCenterforBiotechnologyInformation) - BLAST (BasicLocalAlignmentSearchTool) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 5 όπου αναγράφονται τα επιλεγμένα στελέχη της μελέτης (a, b, c, d, e, f, g,h, I, jκαι k) και το γένος στο οποίο ανήκουν, βάσει της ταυτοποίησης και του ποσοστού ομοιότητας, όπως αυτά προέκυψαν από τη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος PCR και των αντίστοιχων που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων (NCBI-BLAST).

Το ποσοστό βεβαιότητας/ομοιότητας για το σύνολο των στελεχών κυμάνθηκε από 80 έως 100% και τα ίδια ταυτοποιήθηκαν στα γένη: *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pedobacter* και *Staphylococcus*.

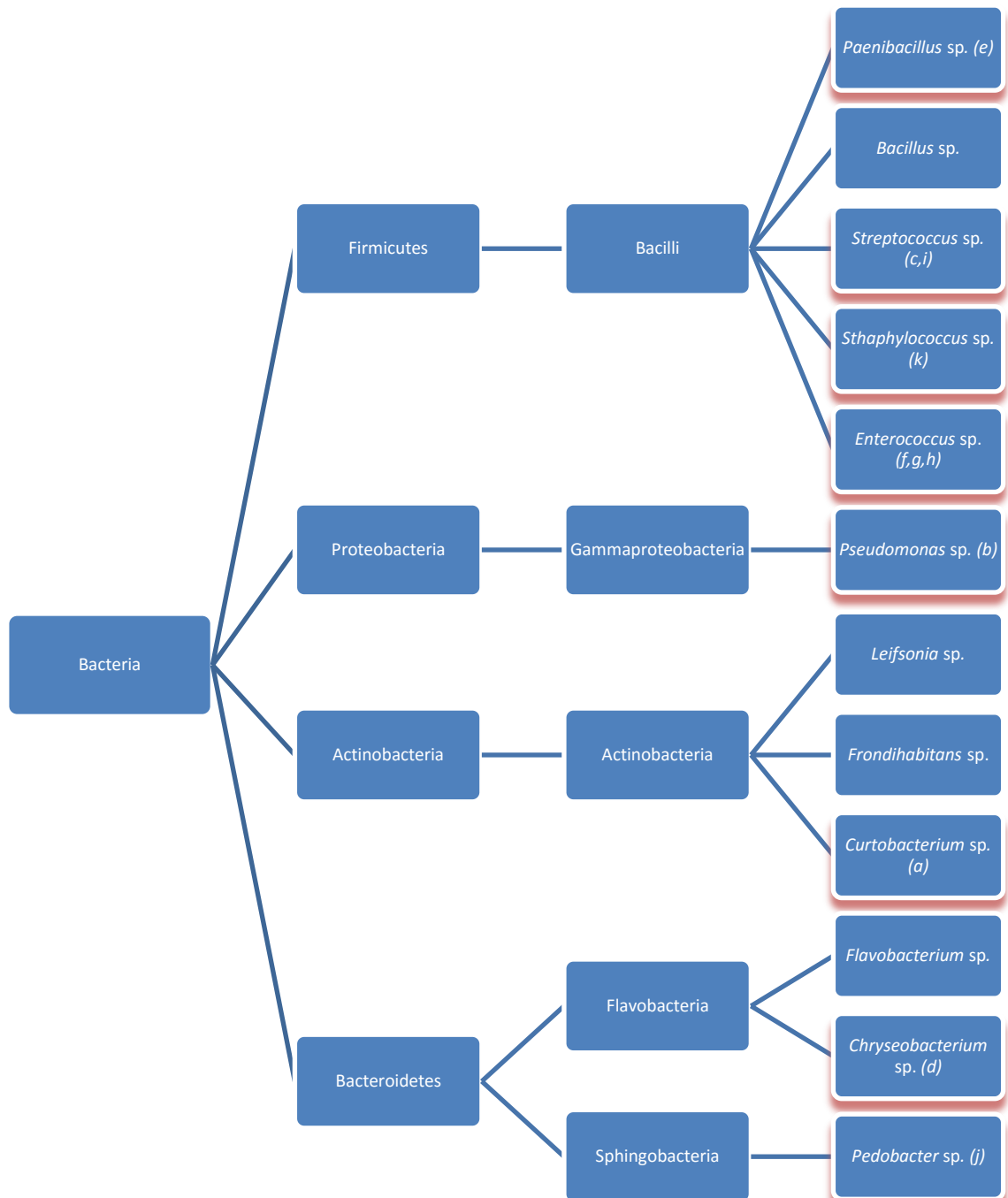
Πίνακας8. Ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών από τα δείγματα εδάφους

Βακτήριο	Ταυτοποίηση βάσει NCBI-BLAST	% Ομοιότητα
a	<i>Curtobacterium</i> sp. [AB740347]	99%
	<i>Frondihabitans</i> sp. [KR181798]	99%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [KJ626424]	99%
	<i>Curtobacterium herbarum</i> [KR476458]	99%
	<i>Flavobacterium</i> sp. [KJ152100]	99%
	<i>Leifsonia</i> sp. [KR265652]	99%
b	<i>Pseudomonas</i> sp. [KJ004480]	100%
	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> [CP012680]	100%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> [KR706375]	100%
	<i>Pseudomonas moraviensis</i> [KU229982]	100%
c	<i>Streptococcus</i> sp. [LN907757]	100%
	<i>Streptococcus salivarius</i> [CP013216]	100%
d	<i>Chryseobacterium</i> sp. [KF263564]	80%
	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i> [KC355260]	80%
	<i>Chryseobacterium indologenes</i> [HQ259684]	80%
e	<i>Paenibacillus</i> sp. [KT318609]	99%
	<i>Paenibacillus pabuli</i> [KP670185]	99%
	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> [JF439624]	99%
	<i>Bacillus</i> sp. [AB045103]	98%
f	<i>Enterococcus</i> sp. [KR153958]	91%
	<i>Enterococcus durans</i> [KR107069]	91%
	<i>Enterococcus faecalis</i> [GU369800]	91%
	<i>Enterococcus faecium</i> [GU584228]	92%
g	<i>Enterococcus</i> sp. [KR153958]	93%
	<i>Enterococcus durans</i> [JN815028]	93%
	<i>Enterococcus faecium</i> [GU584228]	94%
	<i>Enterococcus lactis</i> [KT262980]	93%
h	<i>Enterococcus</i> sp. [KJ175075]	95%
	<i>Enterococcus durans</i> [JF896435]	95%
	<i>Enterococcus faecium</i> [HQ259241]	95%
	<i>Enterococcus faecalis</i> [FJ481129]	95%
	<i>Bacillus</i> sp. [KF870418]	95%
i	<i>Streptococcus sanguinis</i> [KJ023417]	87%
j	<i>Pedobacter</i> sp. [KM114941]	99%
	<i>Flavobacterium</i> sp. [JQ977626]	99%
	<i>Pedobacterterrae</i> [JQ236820]	99%
	<i>Sphingobacteriaceae bacterium</i> [EU057831]	99%
k	<i>Staphylococcus</i> sp. [KP240938]	98%
	<i>Staphylococcus pasterium</i> [KJ917334]	98%
	<i>Staphylococcus kloosii</i> [KT261093]	98%
	<i>Staphylococcus cohnii</i> [KT260356]	98%



Εικόνα 5. Ομαδοποίηση των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών [Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες – μέθοδος UPGMA (unweighted-pairgroupmethodwitharithmeticmeanclusteringmethod)].

Όπως προκύπτει, τα 11 στελέχη που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας τους στο Cd και τον Pb, ανήκουν σε 4 γνωστές βασικές διαιρέσεις των βακτηρίων, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria και Bacteroidetes και σε 5 διαφορετικές κλάσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 6 .



Εικόνα 6. Ταξινόμηση των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών

ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

- *Curtobacterium* sp.: Γένος που ανήκει στην τάξη *Actinomycetales* και στην κλάση των ακτινοβακτηρίων. Περιλαμβάνει Gram θετικά βακτήρια που συναντώνται στο έδαφος. Πρόκειται για ποικιλόμορφα βακτήρια και περιέχουν ποικιλία υποδιαϊρέσεων.
- *Paenibacillus* sp.: Πρόκειται για αναερόβιο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια των βακίλων και στην κλάση *Bacilli*. Απαντάται στο χώμα, στο νερό, σε κτηνοτροφικά είδη, σε φυτικές ύλες και στις προνύμφες εντόμων. Το πρόθεμα “*paene*” στην ονομασία του προέρχεται από τα λατινικά και σημαίνει σχεδόν, σχεδόν βάκιλος δηλαδή. Είναι βακτήρια που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία, σε τομείς καλλυντικών και στην παραγωγή βιοκαυσίμων.
- *Pseudomonas* sp.: Ανήκει στα πρωτεοβακτήρια. Πρόκειται για γένος που περιλαμβάνει υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, γνωστά για τη μεταβολική τους ποικιλομορφία. Τα συναντάμε στο χώμα, στο νερό και στο ζωικό και φυτικό ιστό. Πολλά διαφορετικά είδη από αυτό το βακτήριο είναι παθογόνα και επηρεάζουν τον άνθρωπο, τα ζώα και τα φυτά.
- *Streptococcus* sp.: Πρόκειται για ένα γένος Gram θετικών βακτηρίων που ανήκουν στην τάξη των λακτοβάκιλων (βακτήρια γαλακτικού οξέος) και στην κλάση *Bacilli*. Είναι κυρίως προαιρετικά αναερόβια και μπορούν να προκαλέσουν παθήσεις όπως μηνιγγίτιδα και πνευμονία. Πολλά είδη βέβαια δεν είναι παθογόνα και αποτελούν μέρος της ανθρώπινης μικροχλωρίδας του στόματος, του δέρματος, του εντέρου και του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος.
- *Chryseobacterium* sp.: Gram αρνητικά, προαιρετικά αναερόβια, νηματοειδή βακτήρια που ανήκουν στην τάξη των *Flavobacteria*. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα τρόφιμα και σε πηγές νερού.
- *Enterococcus* sp.: Gram θετικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση *Bacilli* και στην τάξη *Lactobacillales*. Είναι αναερόβια βακτήρια που συνήθως προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και μηνιγγίτιδα.
- *Pedobacter* sp.: Γένος Gram αρνητικών βακτηρίων. Ανήκουν στην κλάση των *Sphingobacteria* και στην τάξη των *Sphingobacteriales*.
- *Staphylococcus* sp.: Πρόκειται για Gram θετικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση των *Bacilli* και στην τάξη των *Bacillales*. Χαρακτηριστικό αυτού του

βακτηρίου είναι ότι σχηματίζει συμπλέγματα που μοιάζουν με σταφύλια. Περιλαμβάνει ακίνδυνα στελέχη, που τα συναντάμε στο δέρμα και στη βλεννογόνο του ανθρώπου και άλλων οργανισμών. Επίσης πρόκειται και για συστατικό της μικροβιακής χλωρίδας του εδάφους.

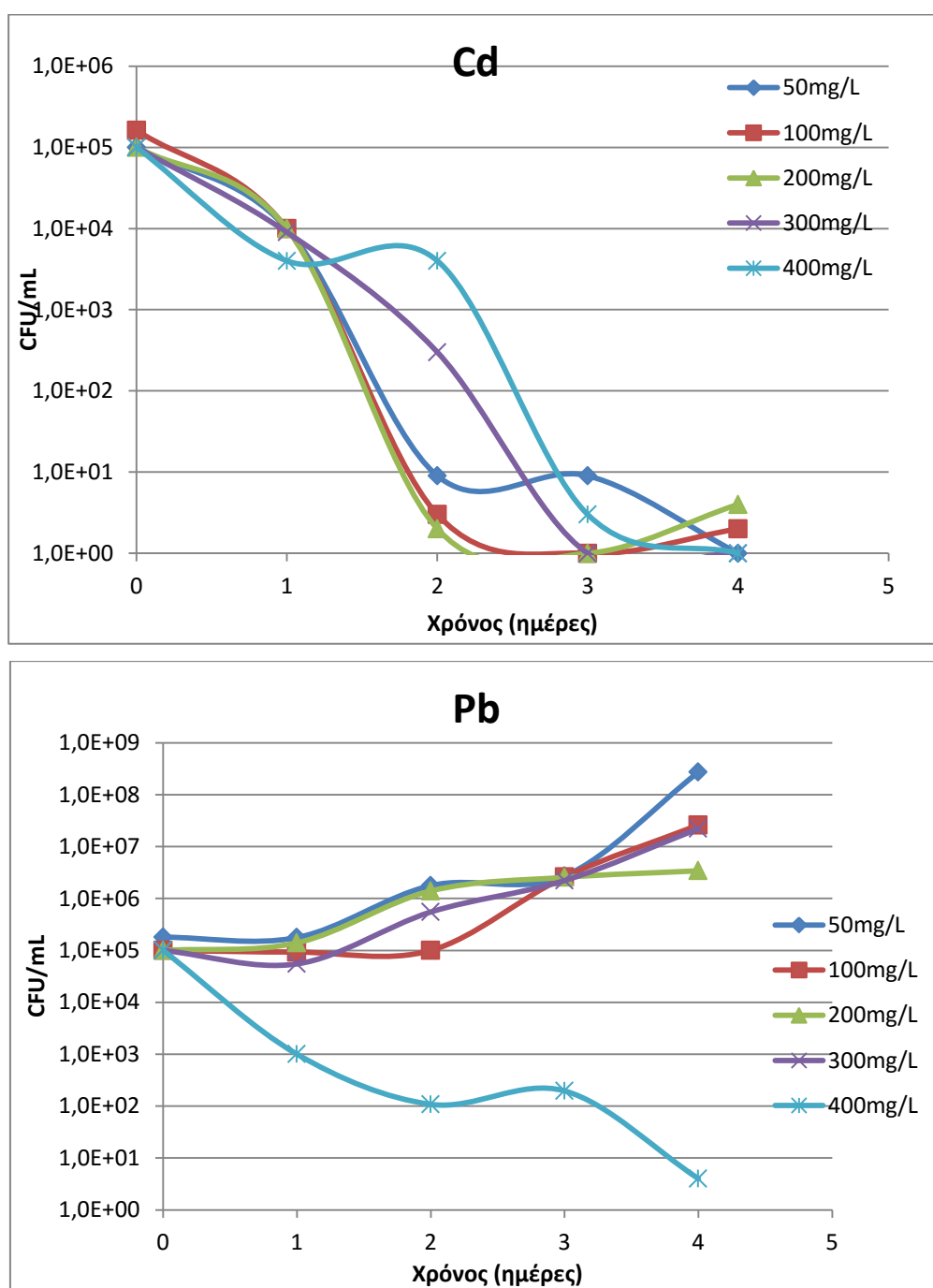
- *Flavobacterium* sp.: Πρόκειται για Gram αρνητικά βακτήρια που τα συναντάμε στο χώμα και στα γλυκά νερά. Σε αυτά οφείλονται ασθένειες ψαριών του γλυκού νερού.
- *Frondihabitans* sp.: Ανήκουν στην κλάση των ακτινοβακτηρίων με πιο γνωστό στέλεχος το *Frondihabitans australicus*.
- *Leifsonia* sp.: Γένος Gram θετικών βακτηρίων, ανήκουν στα ακτινοβακτήρια και μπορούν να προκαλέσουν νανισμό.
- *Bacillus* sp.: Γένος Gram θετικών βακτηρίων, υποχρεωτικά αερόβιων ή προαιρετικά αναερόβιων. Συνήθως τα συναντάμε στο έδαφος.
- *Pseudomonas fluorescens*: Εξαιρετικά ανθεκτικό στα αντιβιοτικά στέλεχος και συνήθη αιτία πνευμονίας, λοίμωξης του δέρματος, των οστών και του ουροποιητικού.
- *Sphingobacteriaceae bacterium*: Ανήκει στην κλάση των *Sphingobacteria* και στην τάξη των *Sphingobacteriales*.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ Cd&Pb

Η αναζήτηση των ανθεκτικών επιλεγμένων στελεχών μέσω της καλλιέργειας/επώασης παρουσία καδμίου και μολύβδου είχε ως σκοπό αφενός τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των βακτηριακών πληθυσμών με βάση το γένος τους και αφετέρου την εύρεση των ικανότερων βακτηριακών στελεχών ως προς την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από τα υγρά εναιωρήματα.

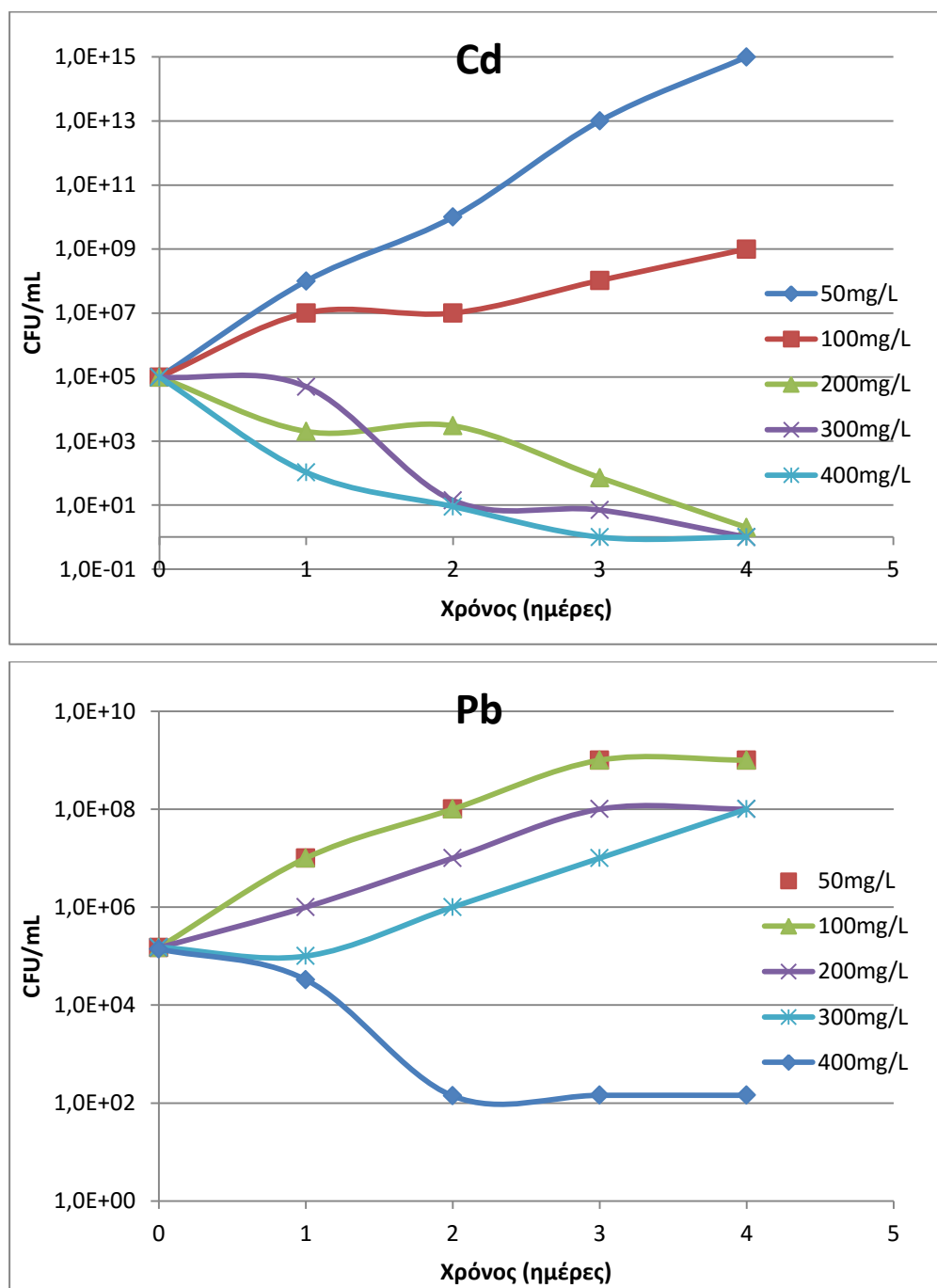
Σύμφωνα με την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία του κάθε δείγματος σε διάρκεια 4 ημερών, για κάθε βακτήριο, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των αποικιών σε CFU/mL. Με βάση λοιπόν αυτές τις συγκεντρώσεις, προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα, στα οποία παρουσιάζεται η διακύμανση του πληθυσμού καθενός βακτηριακού στελέχους στη διάρκεια των 4 ημερών και κατά την καλλιέργειά του παρουσία του εκάστοτε μετάλλου.

➤ Στέλεχος a (*Curtobacterium* sp. [AB740347])



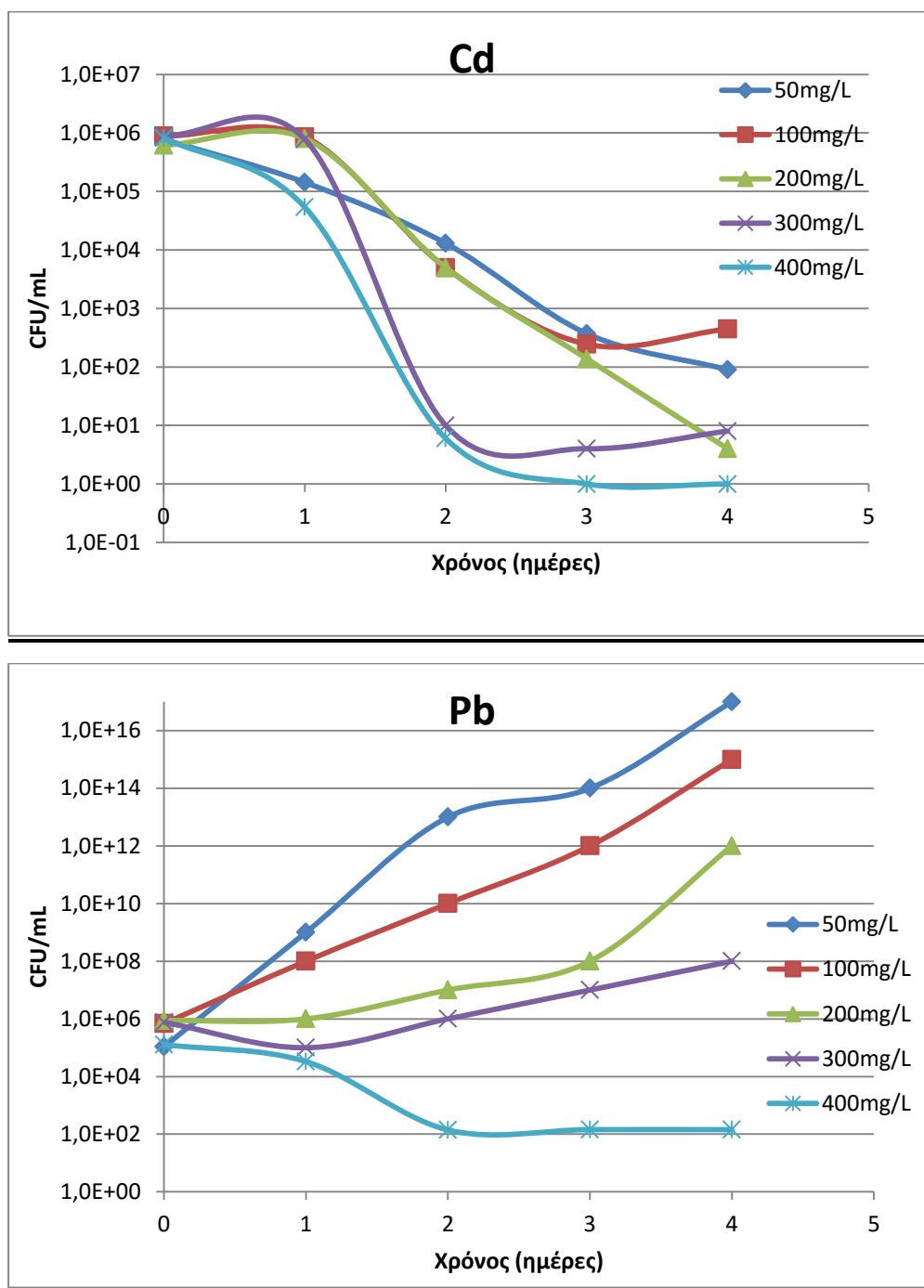
Εικόνα 7. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους a (*Curtobacterium* sp. [AB740347]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd & Pb.

➤ Στελέχος b (*Pseudomonas* sp. [KJ004480])



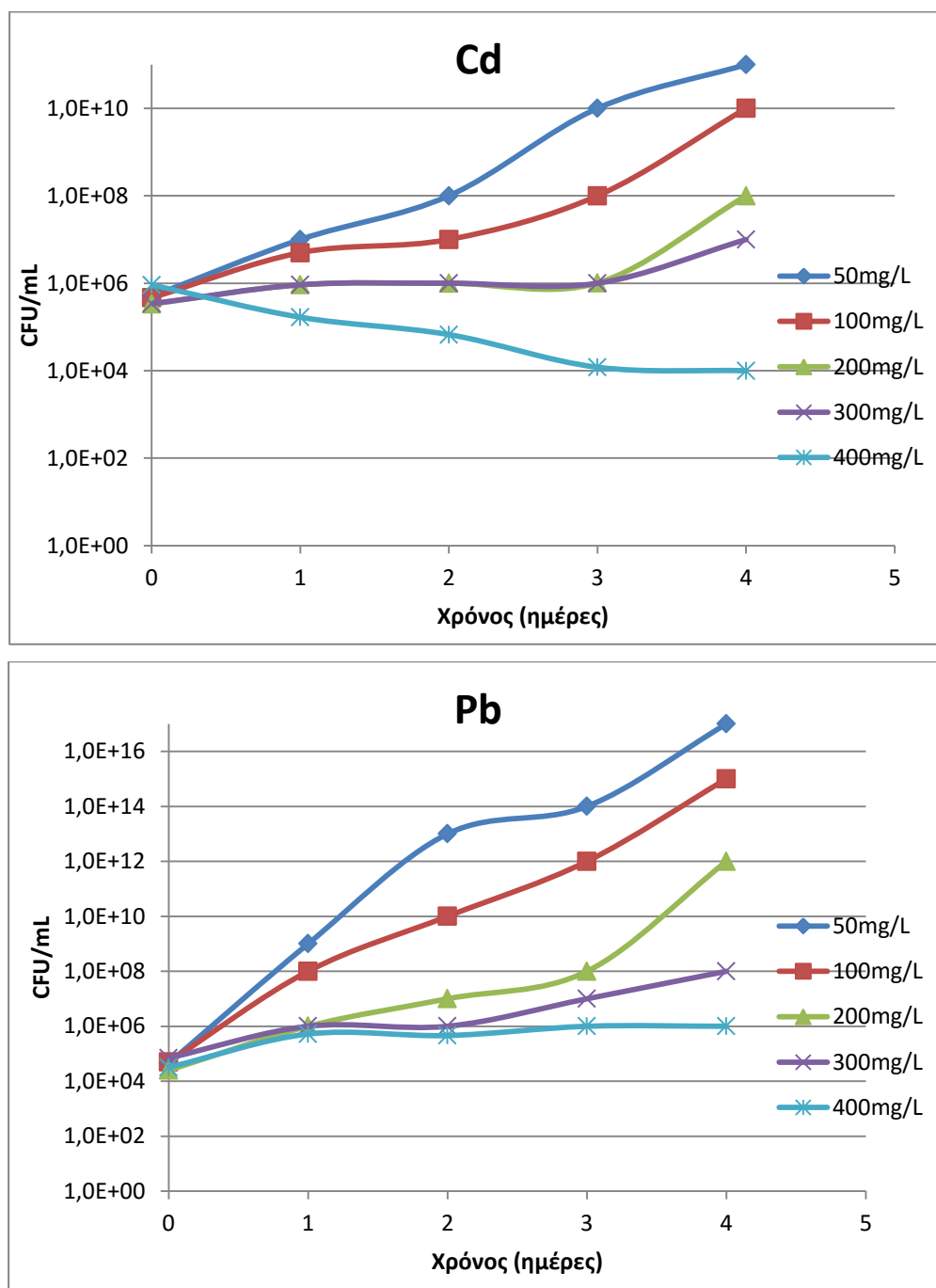
Εικόνα 8. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους b (*Pseudomonas* sp. [KJ004480]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd & Pb.

➤ Στελέχος c (*Streptococcus* sp. [LN907757])



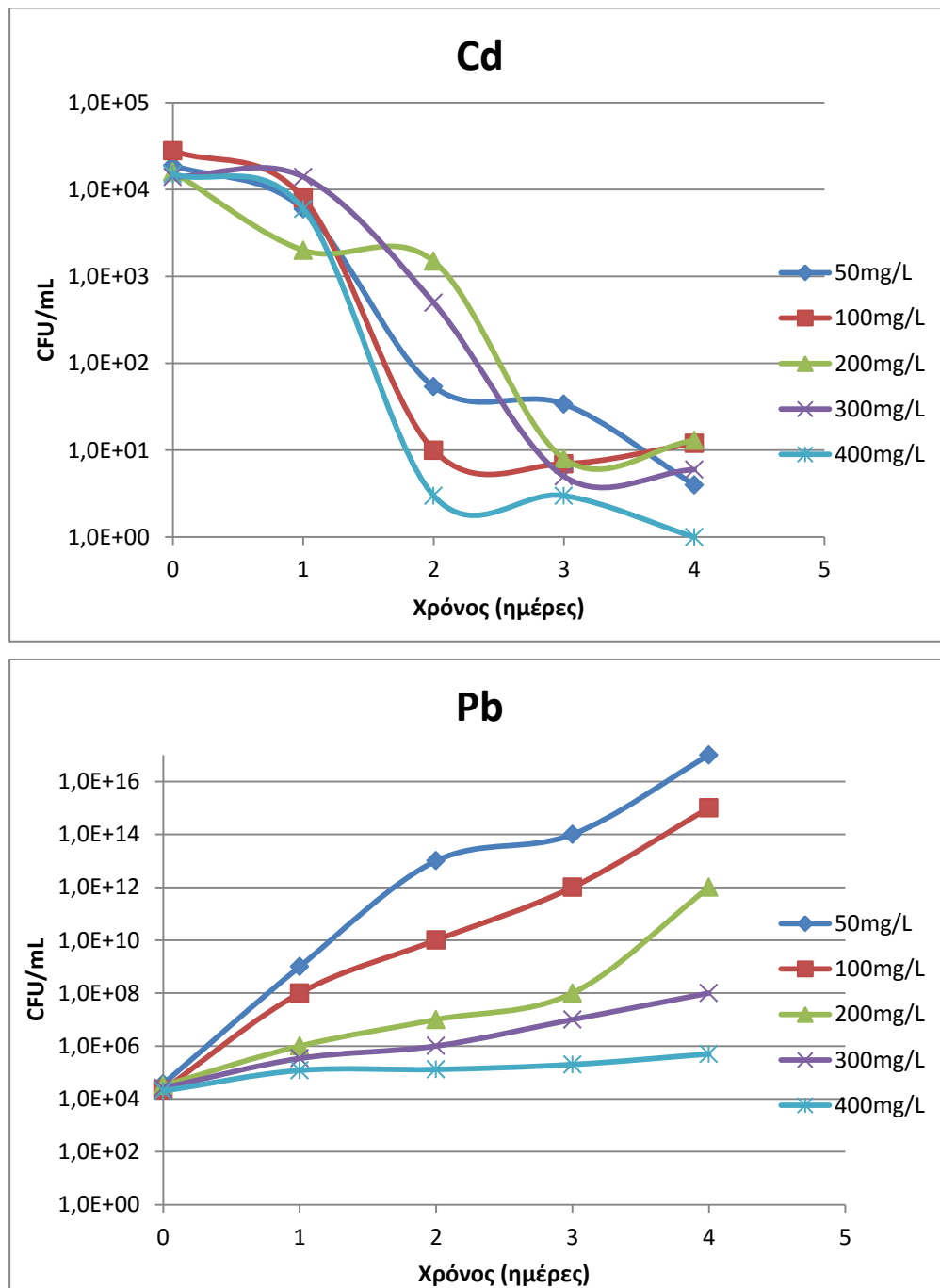
Εικόνα 9. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους c (*Streptococcus* sp. [LN907757]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στέλεχος d (*Chryseobacterium* sp. [KF263564])



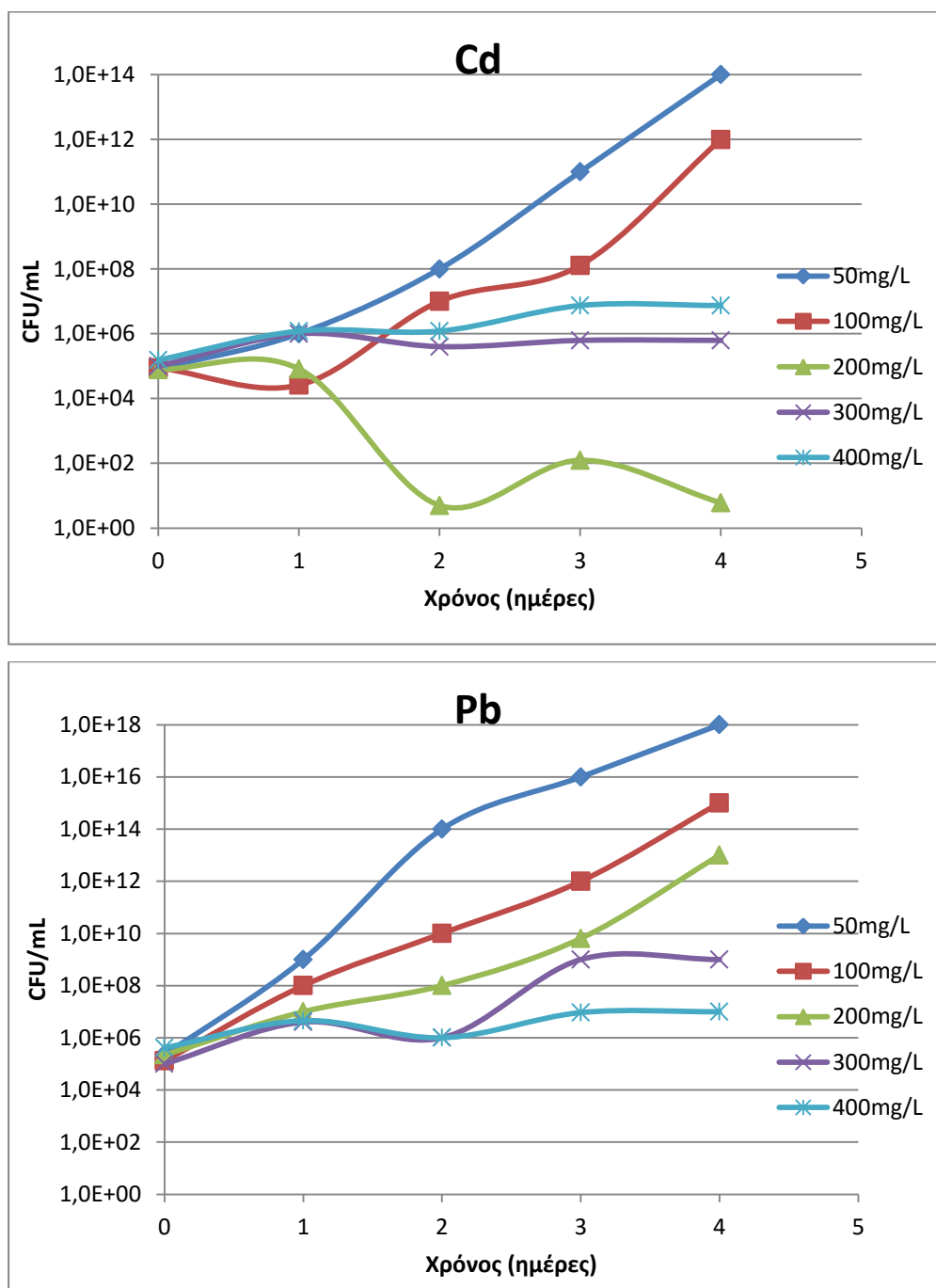
Εικόνα 10. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους d (*Chryseobacterium* sp.[KF263564]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στελέχος e (*Paenibacillus* sp. [KT318609])



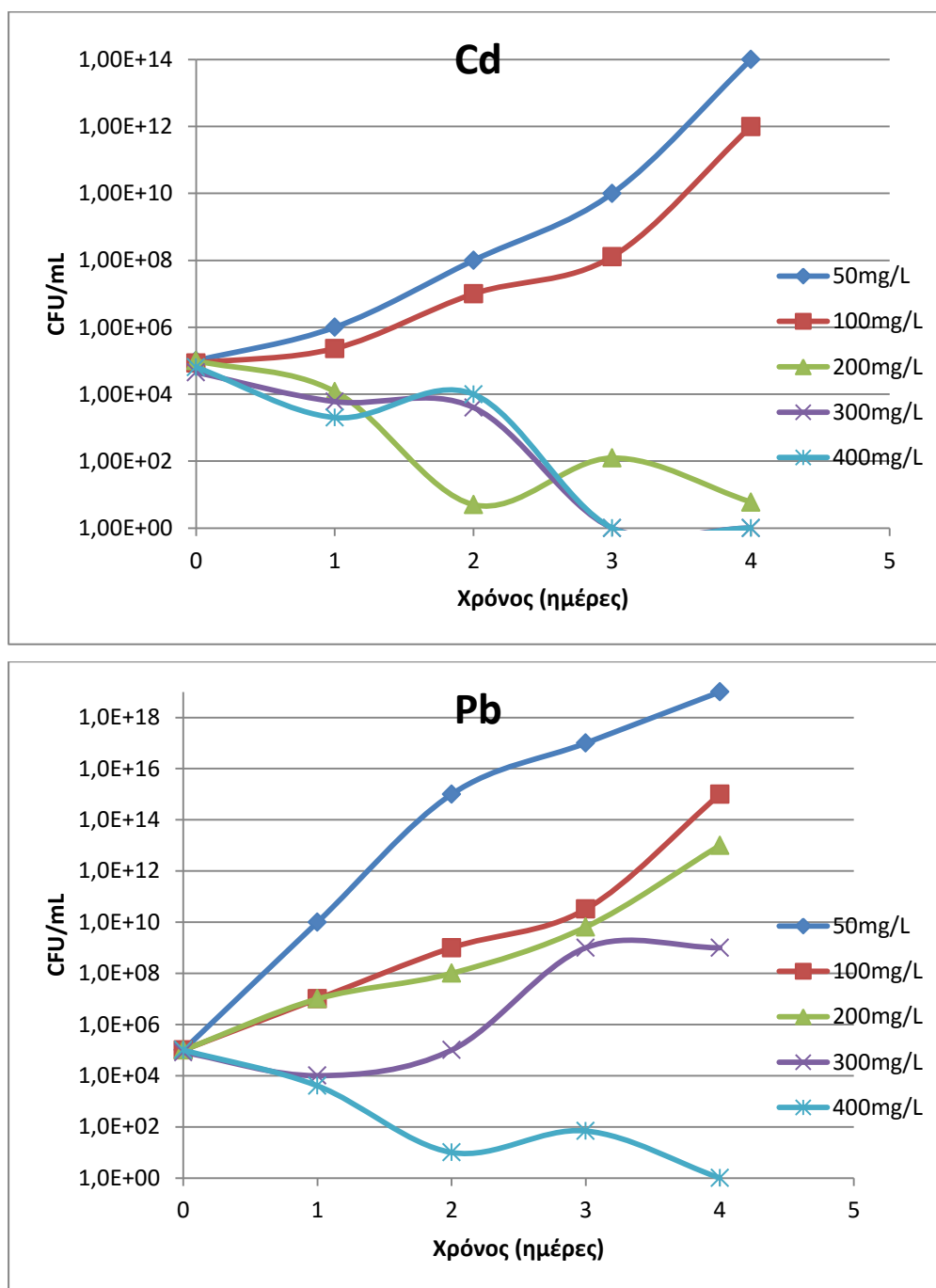
Εικόνα 11. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους e (*Paenibacillus* sp. [KT318609]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στέλεχος f (*Enterococcus* sp. [KR153958])



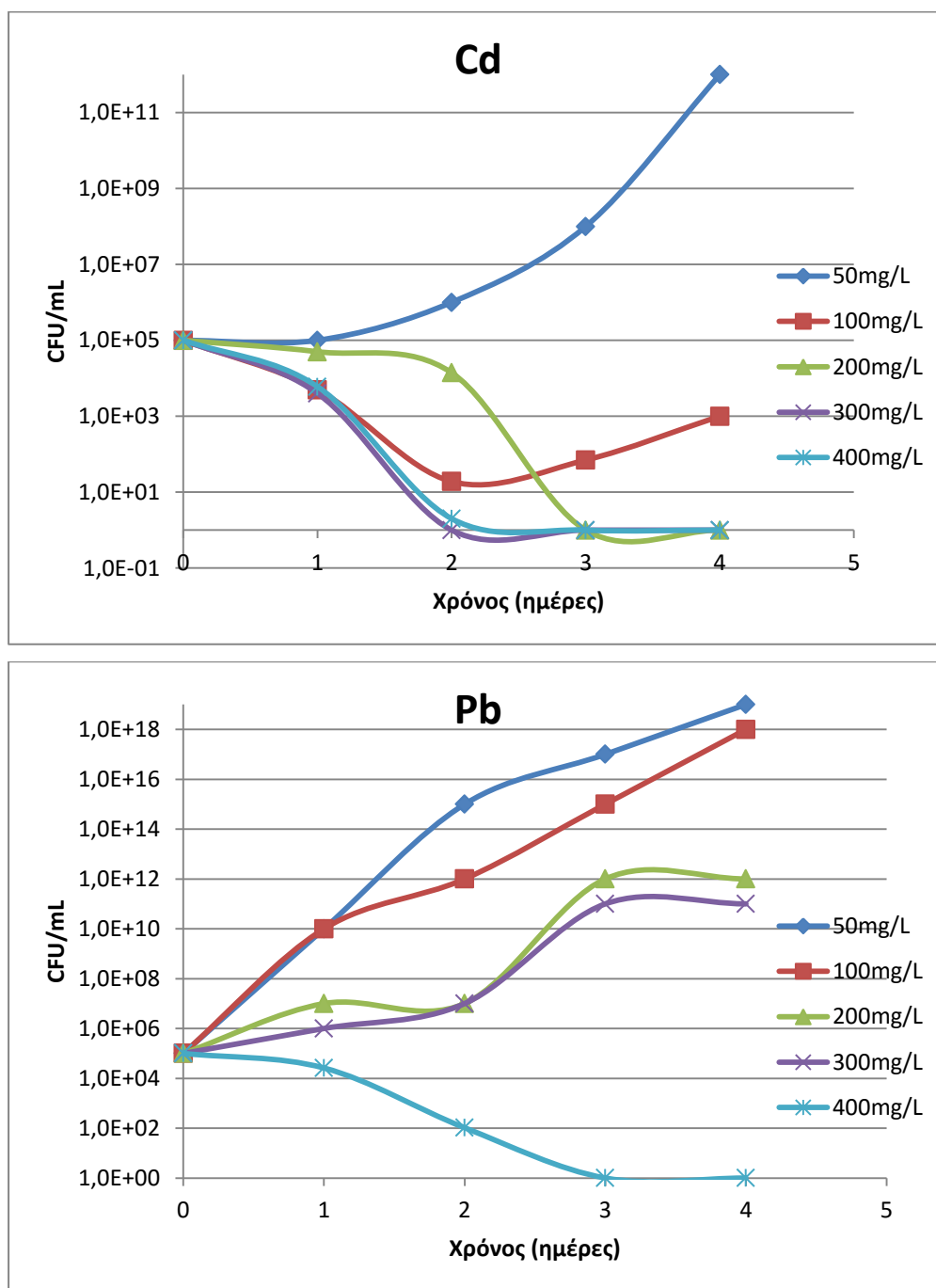
Εικόνα 12. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους f (*Enterococcus* sp. [KR153958]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στέλεχος g (*Enterococcus* sp. [KR153958])



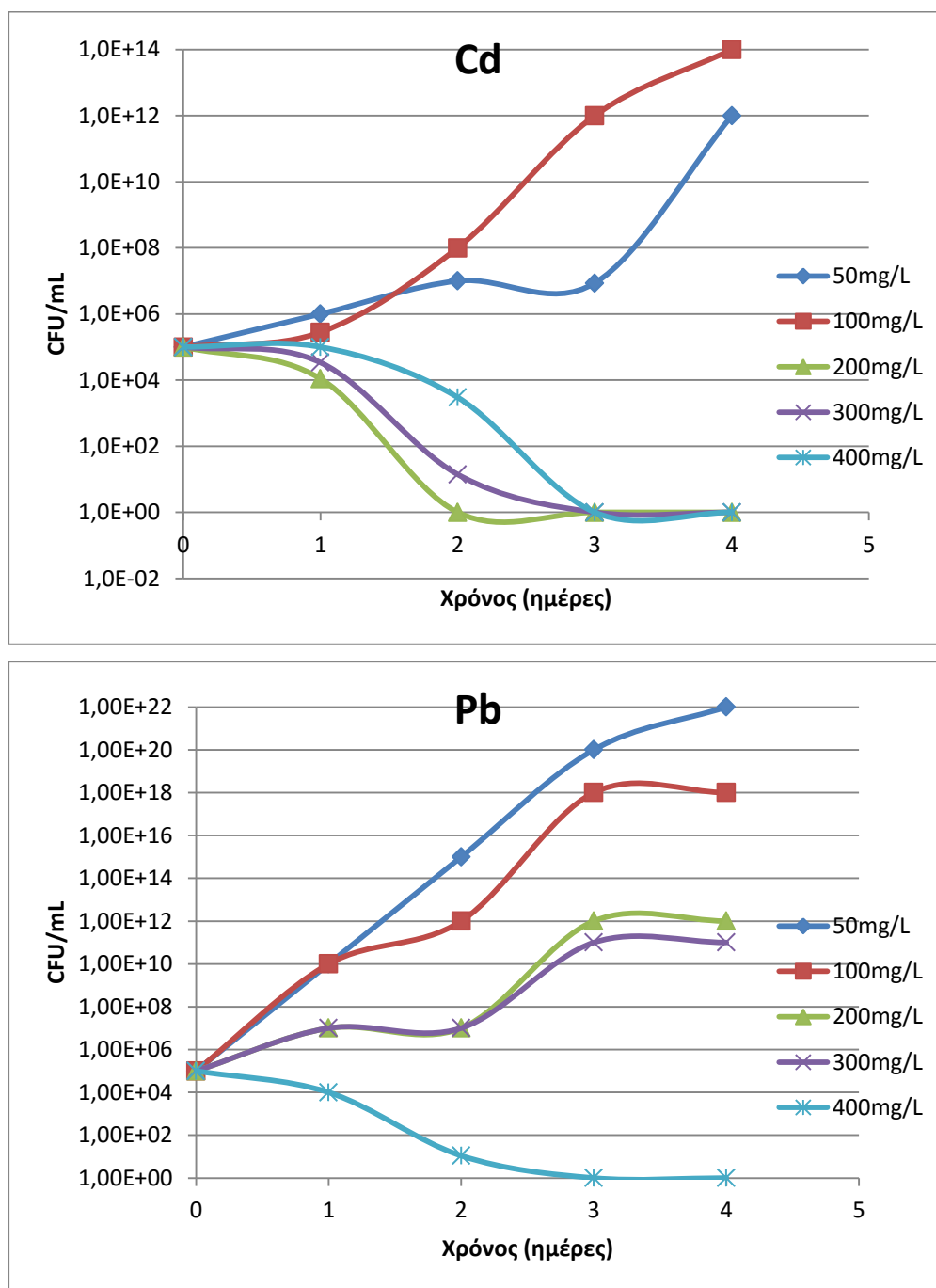
Εικόνα 13. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους g (*Enterococcus* ssp. [KR153958]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στέλεχος h (*Enterococcus* sp. [KJ175075])



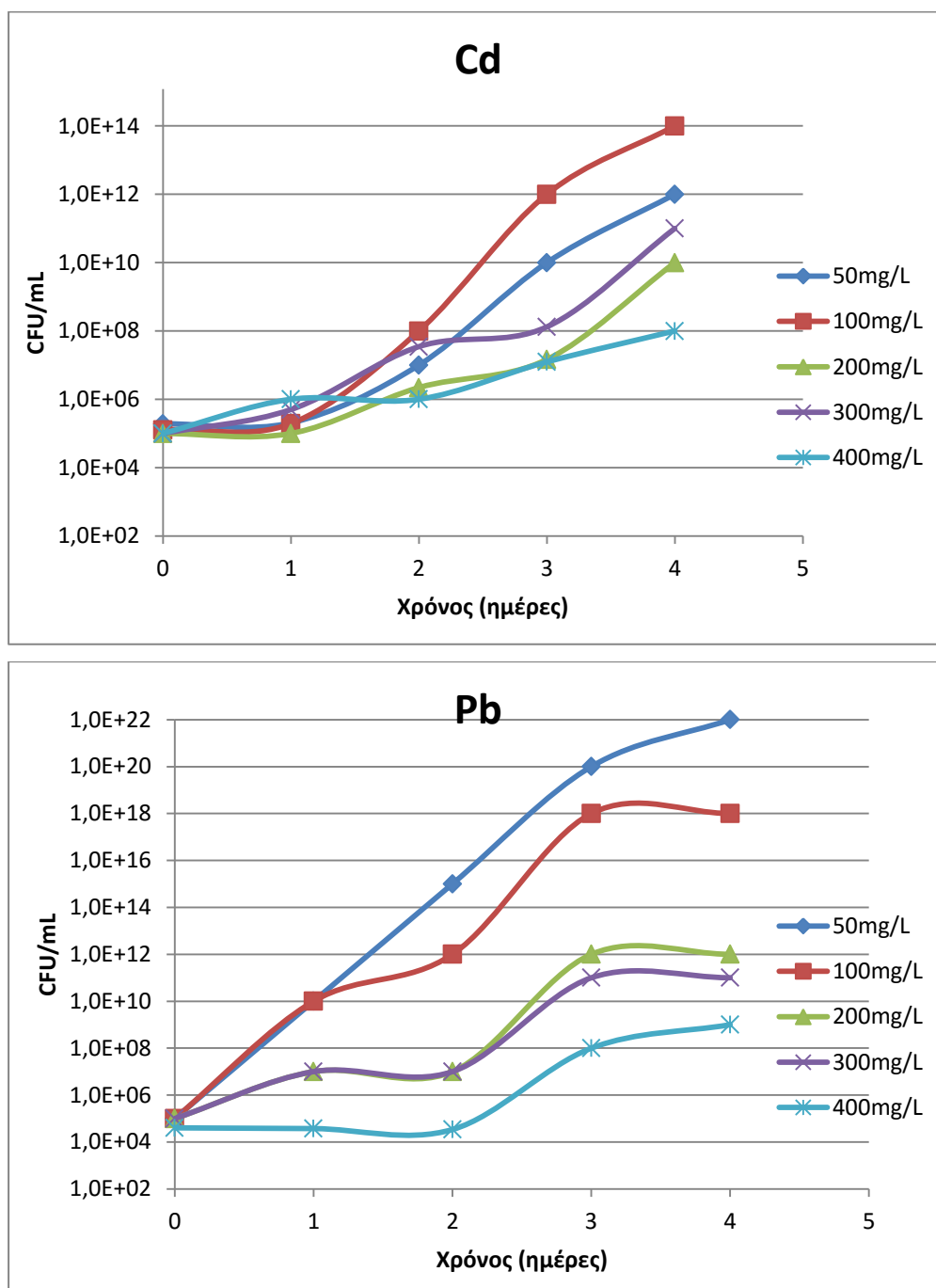
Εικόνα 14. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους h (*Enterococcus* sp. [KJ175075]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στελέχος i (*Streptococcus sanguinis* [KJ023417])



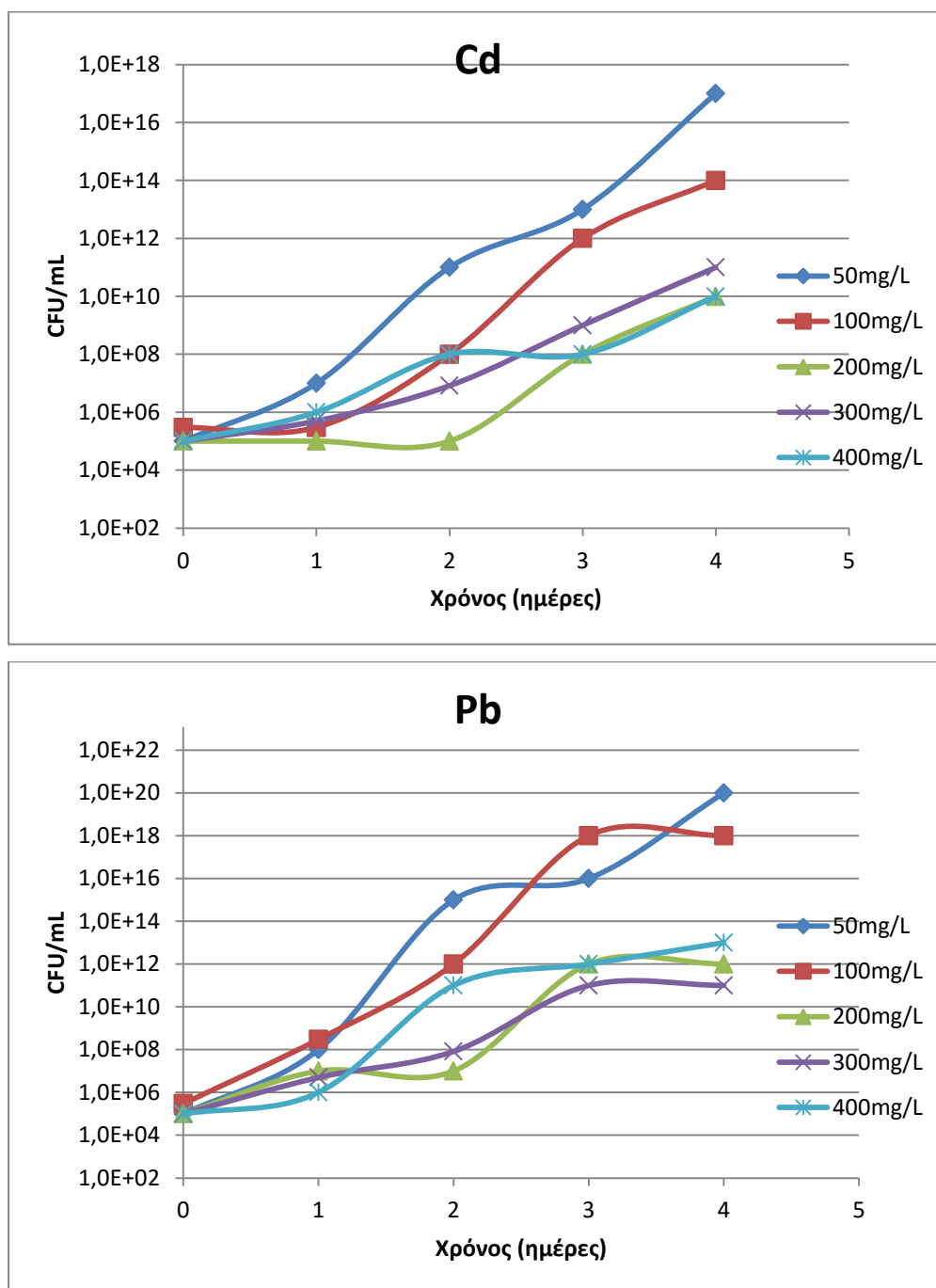
Εικόνα 15. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους i (*Streptococcus sanguinis* [KJ023417]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στελέχος j (*Pedobacter* sp. [KM114941])



Εικόνα 16. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους j (*Pedobacter* sp. [KM114941]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

➤ Στέλεχος k (*Staphylococcus* sp. [KP240938])



Εικόνα 17. Διακύμανση πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους k(*Staphylococcus* sp. [KP240938]) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd&Pb.

Συνολικά παρατηρείται ότι τα στελέχη δείχνουν πιο ανθεκτικά στο μόλυβδο απ' ότι στο κάδμιο. Το κάδμιο φαίνεται να επηρεάζει την ανθεκτικότητα των βακτηριακών πληθυσμών καθώς η πλειοψηφία των στελεχών παρουσιάζει μεγάλη μείωση πληθυσμού

Πιο συγκεκριμένα:

Όσον αφορά στο κάδμιο

- Τα στελέχη
b (*Pseudomonas sp.*[KJ004480]),
g (*Enterococcus sp.* [KR153958]),
h (*Enterococcus sp.* [KJ175075]),
f(*Enterococcus sp.*[KR153958]),
και **i** (*Streptococcus sanguinis*[KJ023417])

δείχνουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, 50 και 100mg/L, με τον πληθυσμό τους να αυξάνεται, ενώ στις συγκεντρώσεις από 200-400mg/L ο πληθυσμός τους μειώνεται. Η μείωση είναι τέτοια που μπορεί να θεωρηθεί ότι το βακτήριο σταματά να αναπτύσσεται μετά το πέρασμα των 4^{ov} ημερών.

- Τα στελέχη
a (*Curtobacterium sp.*[AB740347]),
c (*Streptococcus sp.* [LN907757])
και **e** (*Paenibacillus sp.*[KT318609])

δεν έχουν καμία ανθεκτικότητα απέναντι στο κάδμιο καθώς ο πληθυσμός τους μειώνεται από την πρώτη κιόλας μέρα ενώ σε κάποιες περιπτώσεις σταματούν τελείως να αναπτύσσονται.

- Το στέλεχος **d** (*Chryseobacterium sp.*[KF263564])

αποδεικνύεται ανθεκτικό σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση 400mg/L στην οποία παρατηρείται μείωση του πληθυσμού μετά την τρίτη μέρα.

Τελικά τα πιο ανθεκτικά βακτήρια στο κάδμιο είναι τα εξής: **j**(*Pedobacter sp.*[KM114941] και **k** (*Staphylococcus sp.*[KP240938]). Και τα δύο παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα με τον πληθυσμό τους να αυξάνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Όσον αφορά στο μόλυβδο

Κατά πλειοψηφία τα στελέχη είναι πολύ ανθεκτικά με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να αυξάνεται κατά πολύ

- **d** (*Chryseobacterium* sp.[KF263564]),
- **e** (*Paenibacillus* sp. [KT318609]),
- **f** (*Enterococcus* sp. [KR153958]),
- **j** (*Pedobacter* sp. [KM114941],
- **k** (*Staphylococcus* sp. [KP240938])

Στα μισά στελέχη όμως δεν παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού τους στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου (400mg/L) και τελικά θανατώνονται

- **a** (*Curtobacterium* sp.[AB740347]),
- **b** (*Pseudomonas* sp. [KJ004480]),
- **c** (*Streptococcus* sp. [LN907757]),
- **g** (*Enterococcus* sp. [KR153958]),
- **h** (*Enterococcus* sp. [KJ175075])
- και **i** (*Streptococcus sanguinis*[KJ023417])).

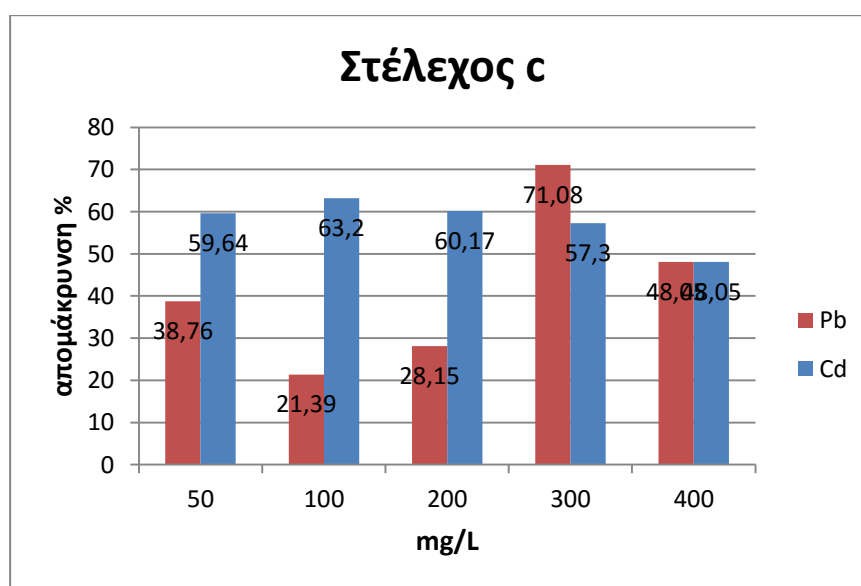
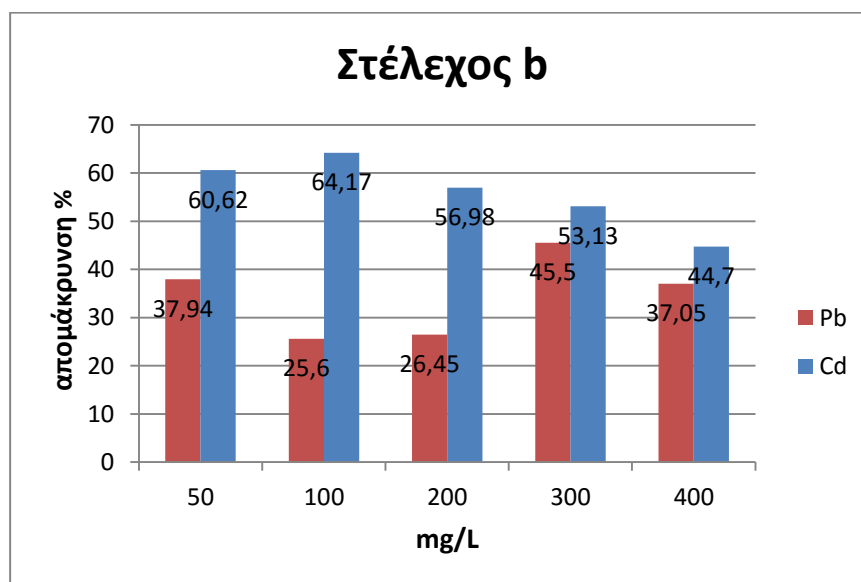
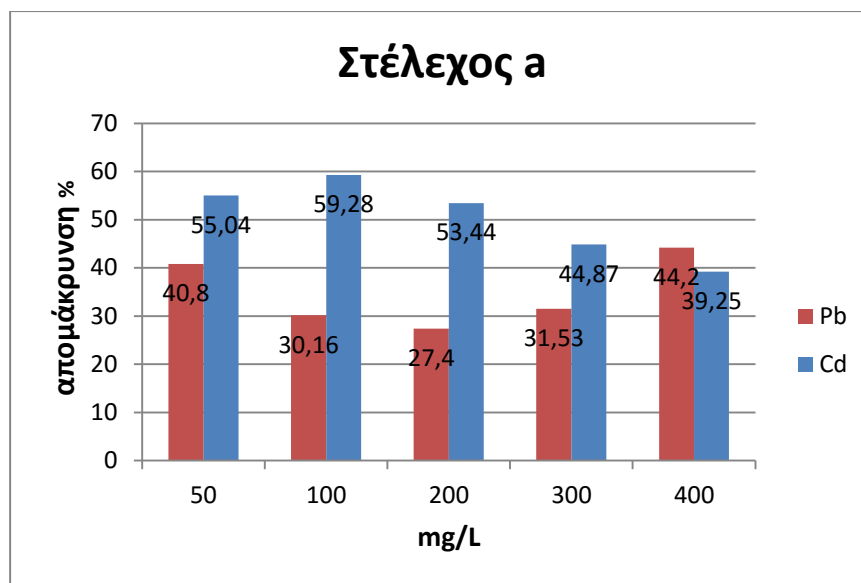
Τα στελέχη

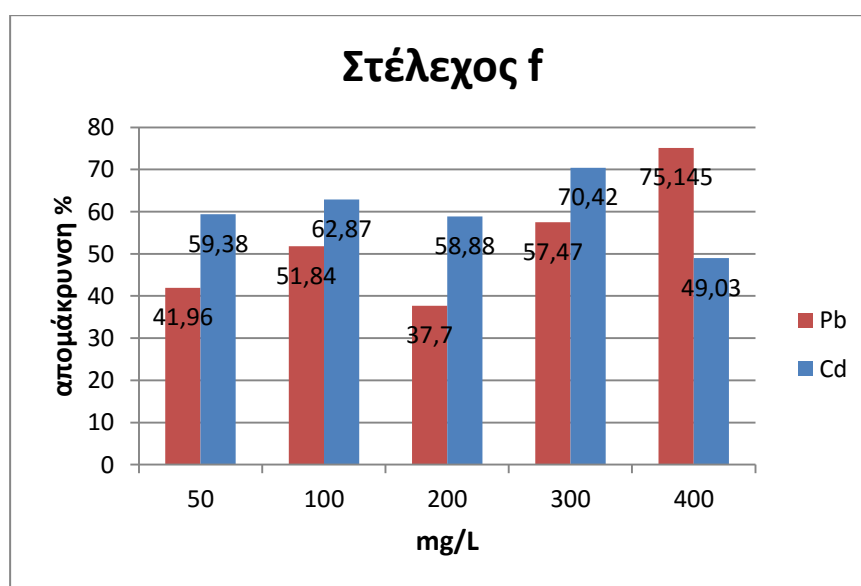
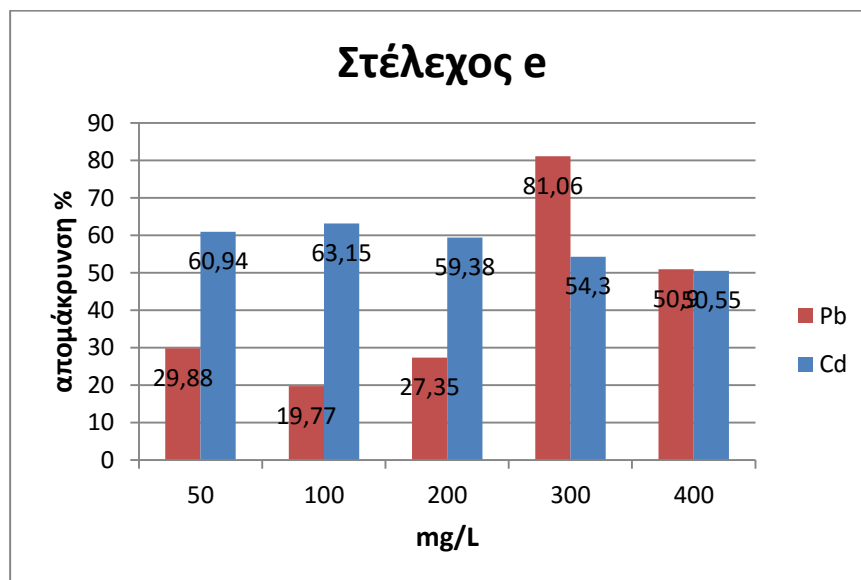
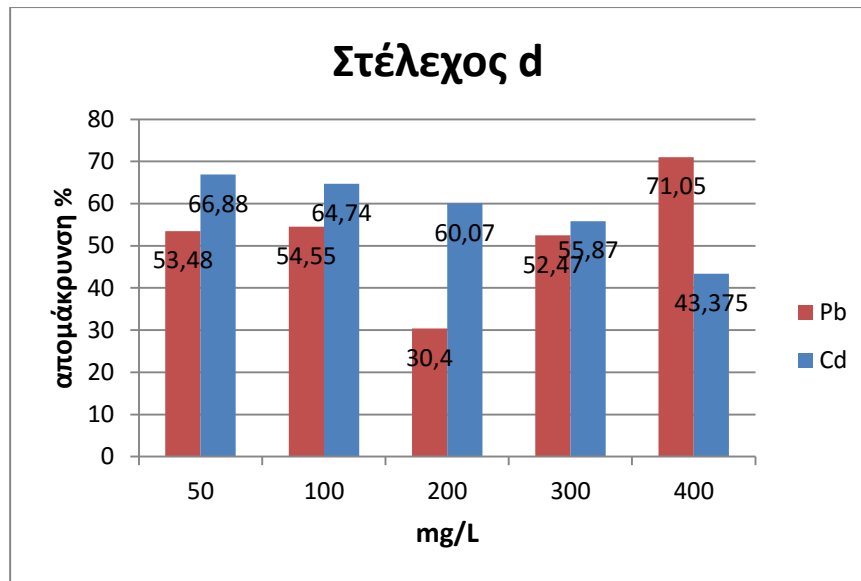
- **f** (*Enterococcus* sp. [KR153958]),
- **j** (*Pedobacter* sp. [KM114941]
- και **k** (*Staphylococcus* sp.[KP240938])

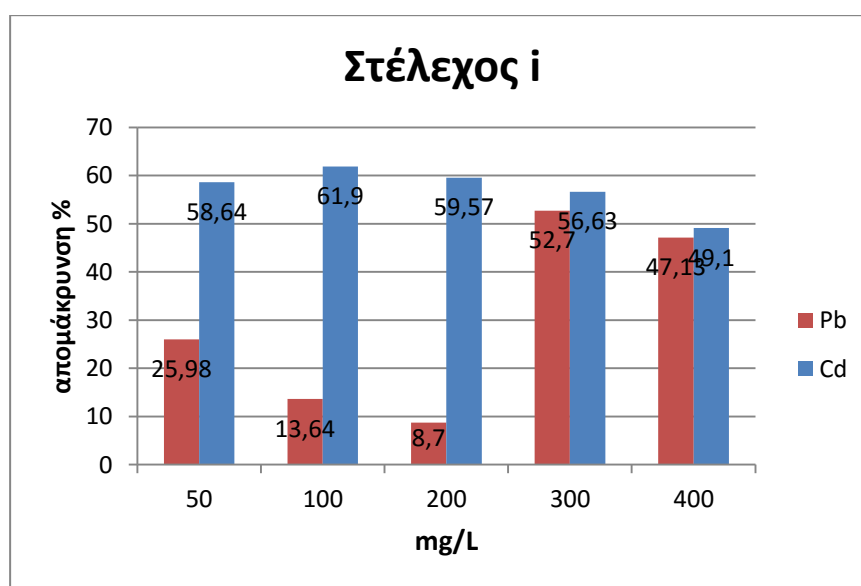
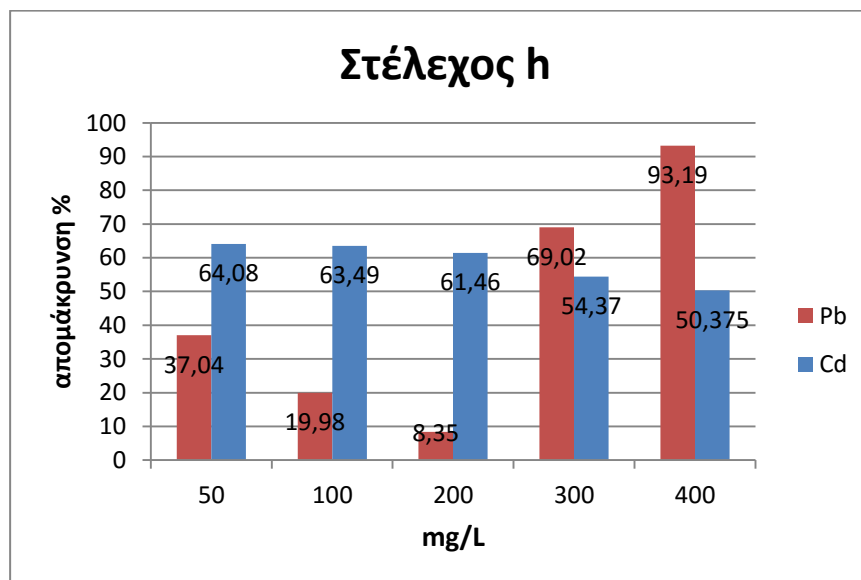
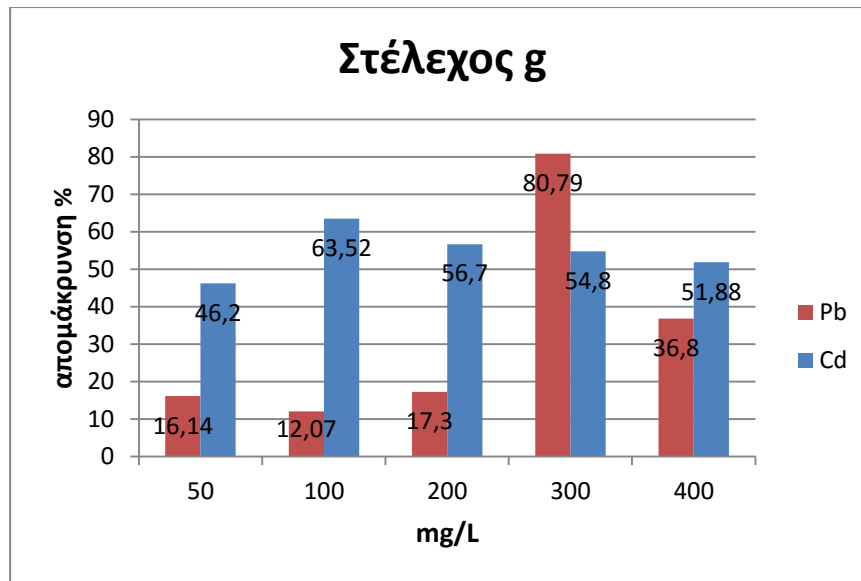
παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και στα δύο βαρέα μέταλλα.

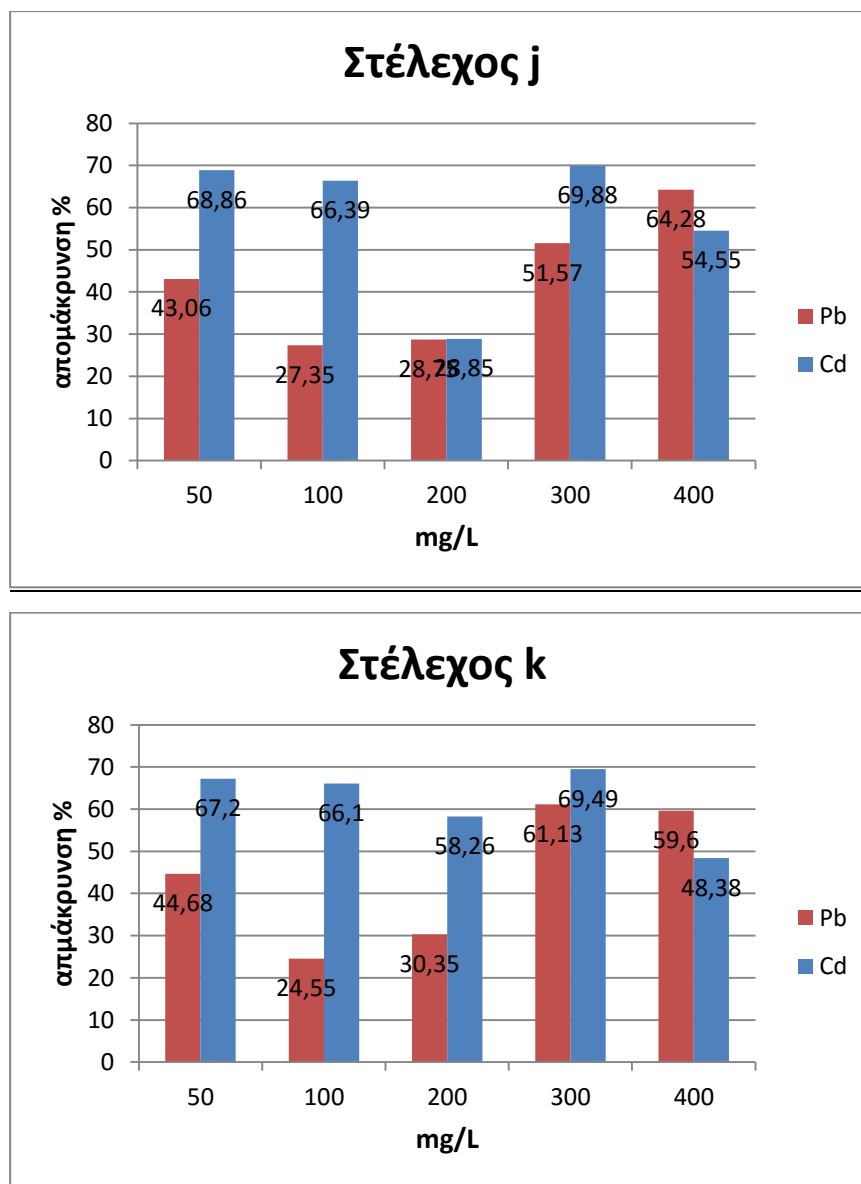
Για την εύρεση των ικανότερων βακτηριακών στελεχών ως προς την απομάκρυνση των δυο βαρέων μετάλλων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο τέλος των τεσσάρων ημερών που διήρκησε ο έλεγχος ανθεκτικότητάς τους στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις καδμίου και μολύβδου, έγινε έλεγχος των υγρών δειγμάτων ως προς την συγκέντρωση των δύο αυτών μετάλλων, ώστε να καταγραφεί η αύξηση, μείωση ή παραμονή στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα απομάκρυνσης (%) καδμίου και μολύβδου από τα δείγματα διαλυμάτων, για κάθε στέλεχος.









Εικόνα 18. Απομάκρυνση των μετάλλων Cd&Pb από υδατικά διαλύματα ως αποτέλεσμα δράσης των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών.

Συνολικά παρατηρούνται χαμηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης μολύβδου στο σύνολο των στελεχών. Μάλιστα παρατηρούνται συχνά πολύ χαμηλά ποσοστά απομάκρυνσης από ~8,5% - ~30%. Ενώ για το κάδμιο τα περισσότερα ποσοστά κυμαίνονται από ~50% - ~70%. Είναι σημαντικό όμως να σημειωθεί ότι όσον αφορά στο μόλυβδο υπάρχουν ποσοστά απομάκρυνσής του και πάνω από 80%.

Όσον αφορά στο κάδμιο, η απομάκρυνσή του στις περισσότερες περιπτώσεις στελεχών επιτυγχάνεται καλύτερα όταν η αρχική του συγκέντρωση είναι χαμηλή (50-200 mg/L).

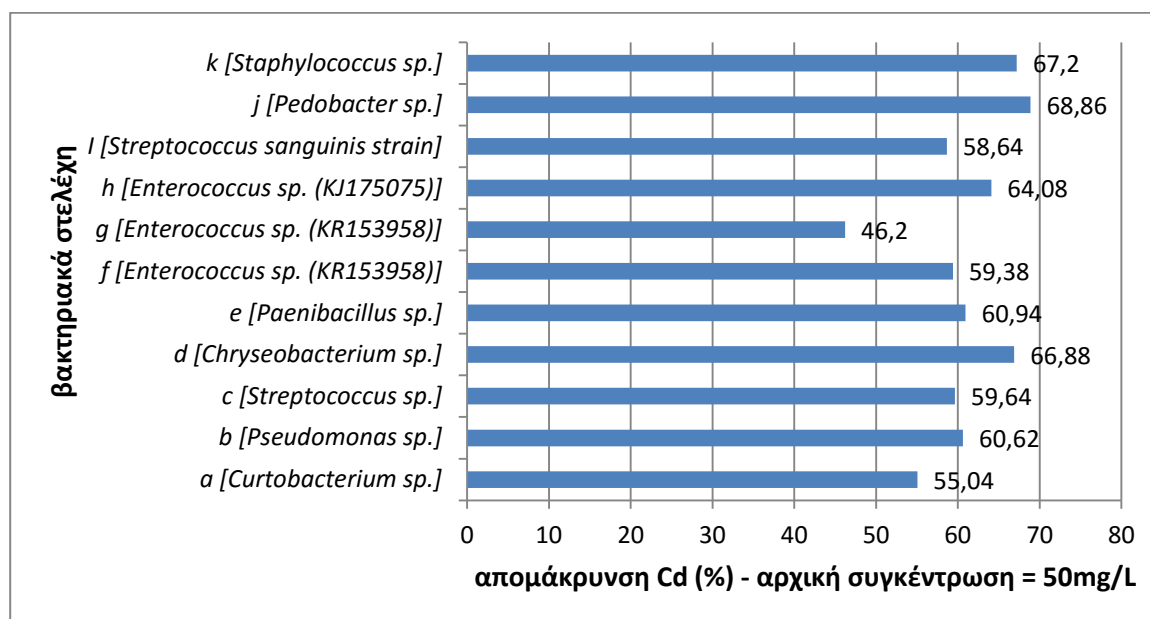
Στο σύνολο παρατηρείται συνάφεια των αποτελεσμάτων αυτών με τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάπτυξης των στελεχών που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα

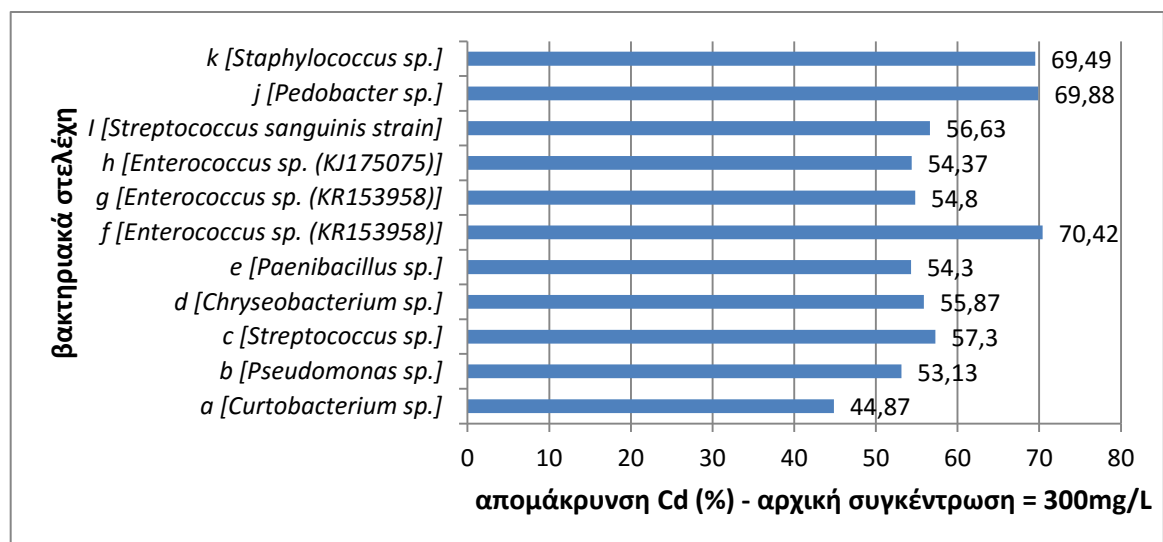
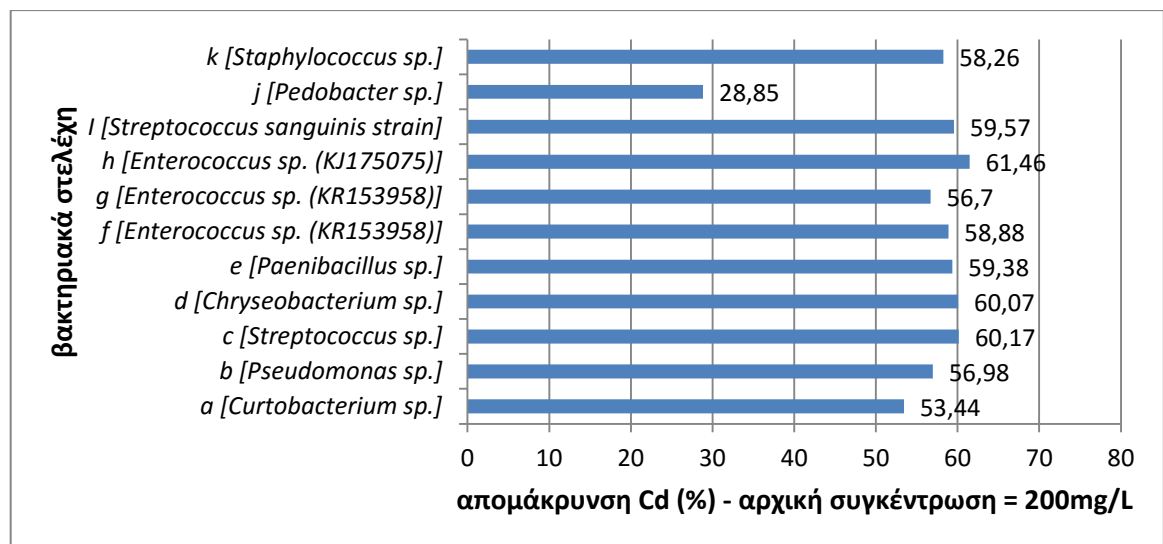
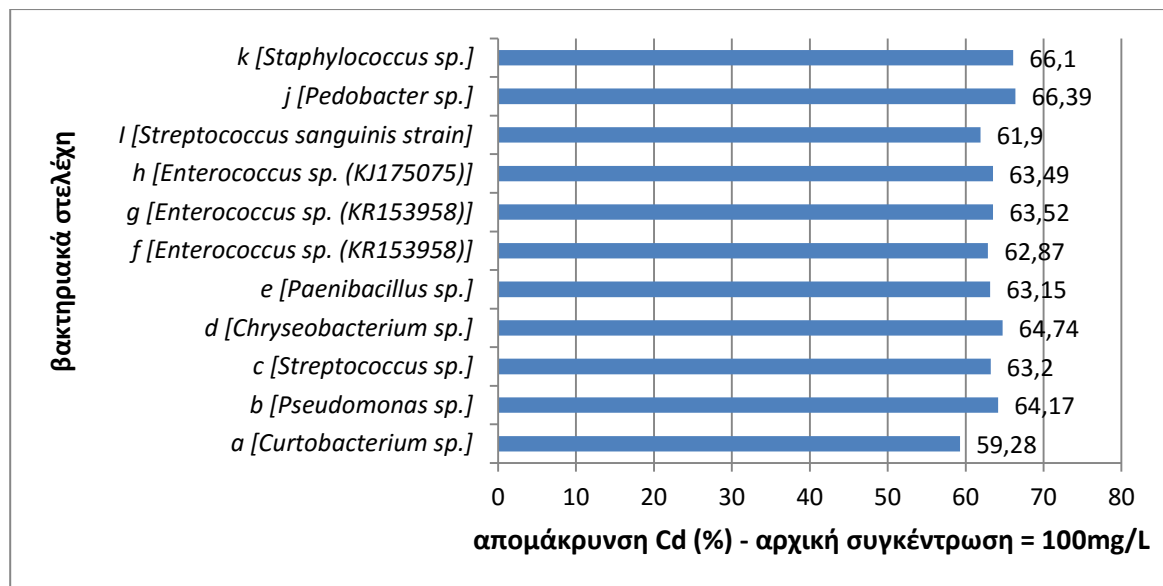
στα στελέχη g,h και η απομάκρυνση του καδμίου μειώνεται στις συγκεντρώσεις 200,300 και 400 mg/L , όπως επίσης μειώνεται και ο πληθυσμός των στελεχών στις ίδιες συγκεντρώσεις. Άρα διαφαίνεται μια σχετικά ανάλογη σχέση αυξομείωσης πληθυσμού και ποσοστού απομάκρυνσης των μετάλλων.

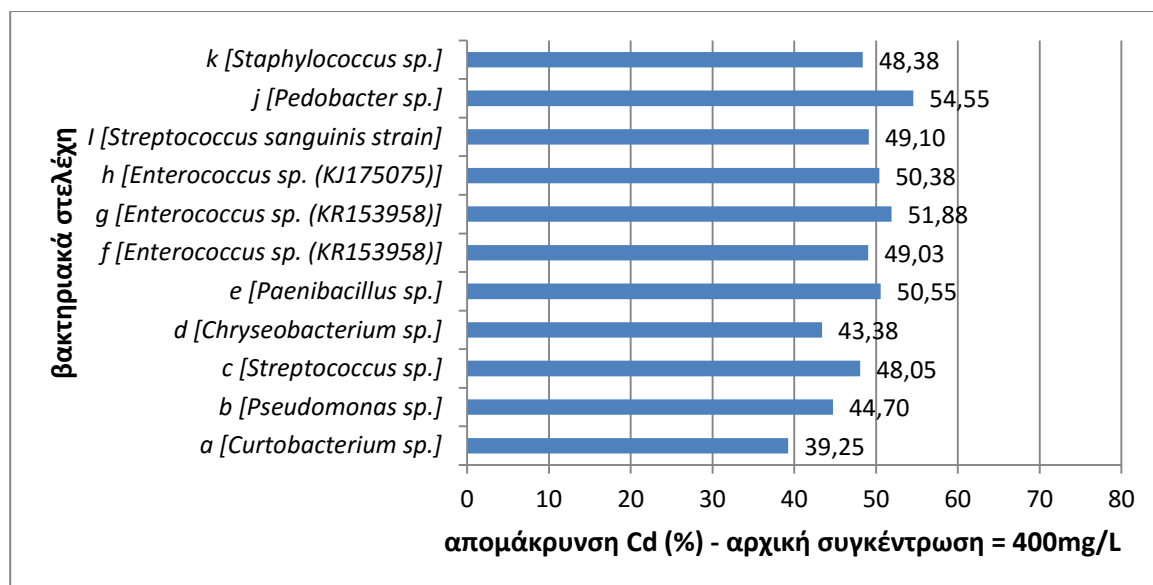
Παρατηρείται ότι στην συγκέντρωση 200 mg/L η απομάκρυνση του μολύβδου σχεδόν σε όλα τα στελέχη μειώνεται σχετικά με την απομάκρυνσή του στα 50 mg/L, ενώ στις επόμενες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 300 και 400 mg/L, το ποσοστό απομάκρυνσης αυξάνεται και πάλι.

Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στο στέλεχος a, φαίνεται ότι παρ' όλο που ο πληθυσμός του βακτηρίου μειώνεται κατά τη διάρκεια των ημερών σε όλες τις συγκεντρώσεις, το ποσοστό απομάκρυνσης του καδμίου αυξάνεται ειδικά στις μικρές συγκεντρώσεις και γενικά παραμένει υψηλή στις υπόλοιπες.

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται πιο ξεκάθαρα αυτό που αναφέρθηκε και παραπάνω, ότι δηλαδή το ποσοστό απομάκρυνσης του καδμίου είναι μεγαλύτερο όσο η συγκέντρωση του μετάλλου είναι μικρότερη.

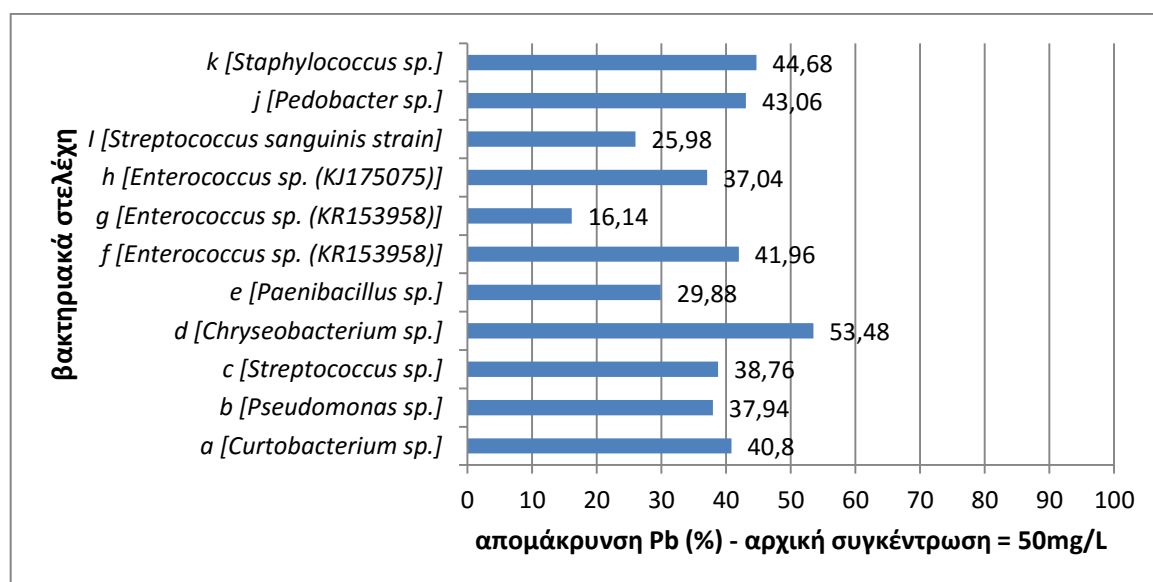


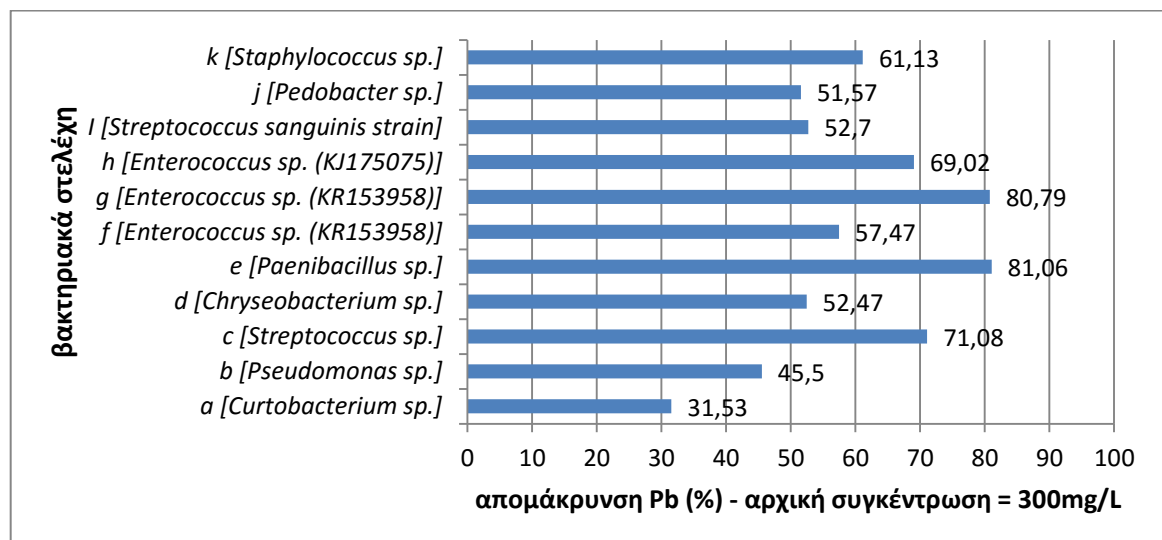
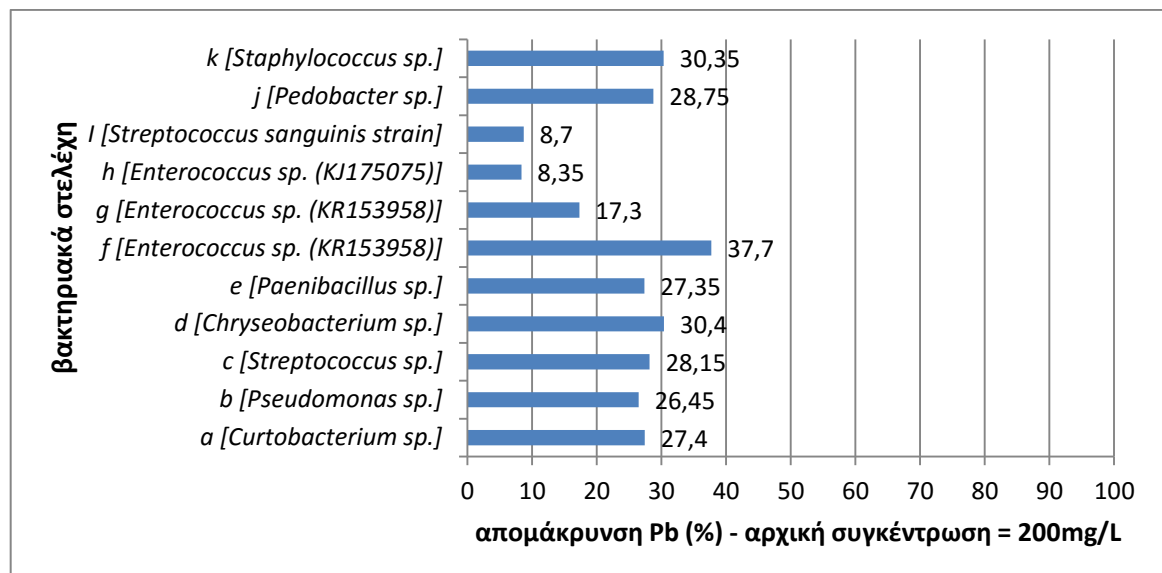
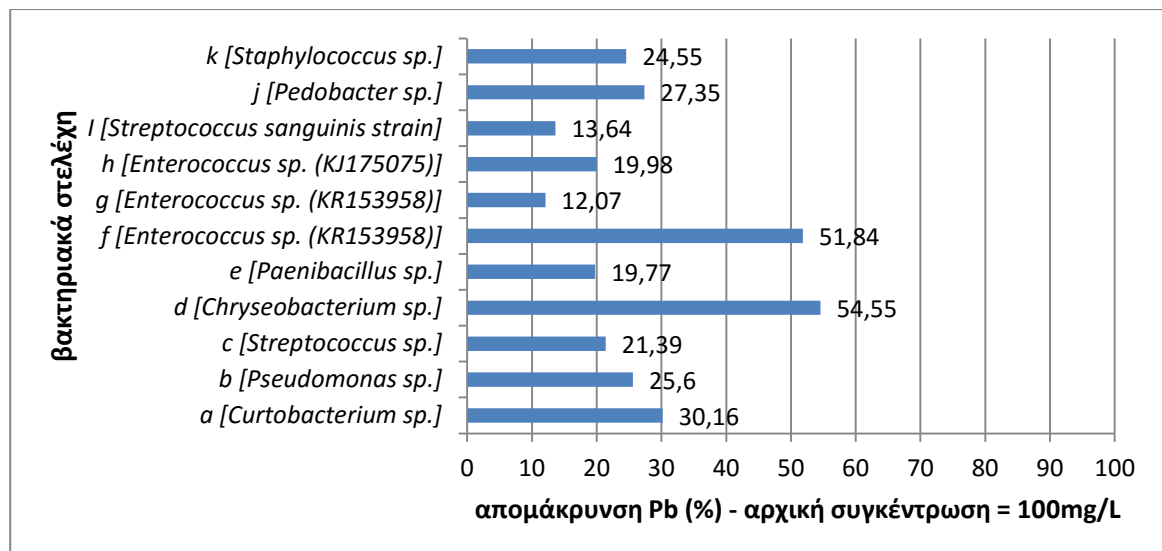


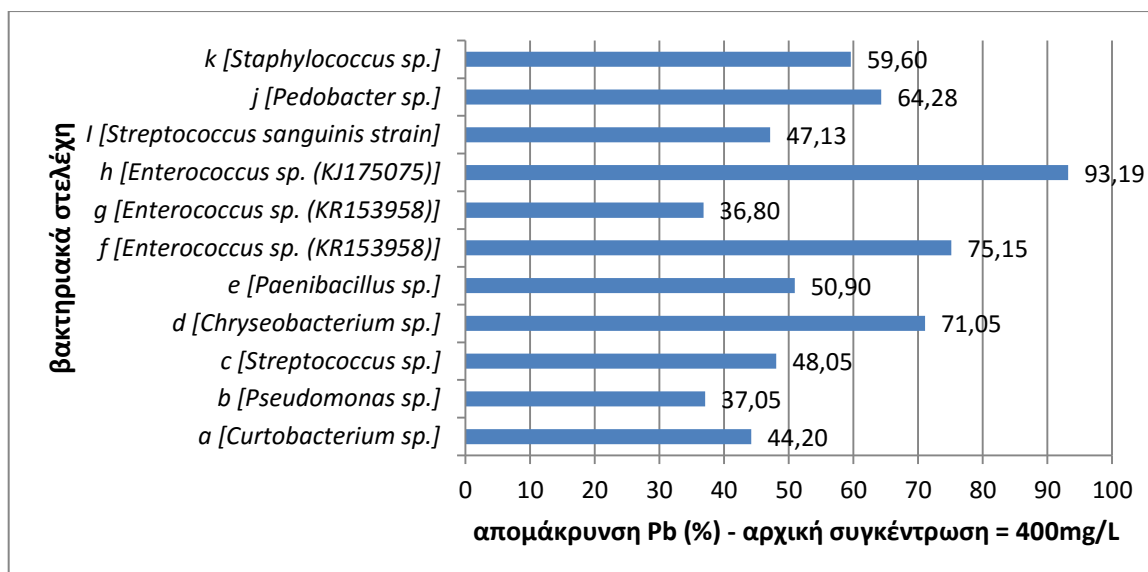


Εικόνα 19. Απομάκρυνση Cd από υδατικά διαλύματα από τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη – επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μετάλλου.

Αντίθετα, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης του μολύβδου όσο η συγκέντρωση του στα διαλύματα αυξάνεται, παρ' όλο που σε αρκετές περιπτώσεις στην συγκέντρωση 400mg/Lο πληθυσμός των στελεχών μειώνεται.







Εικόνα 20. Απομάκρυνση Pb από υδατικά διαλύματα από τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη – επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μετάλλου.

Τέλος δημιουργήθηκε ο πίνακας 9 ο οποίος συγκεντρώνει τα ποσοστά απομάκρυνσης καδμίου και μολύβδου σε σχέση με τις 4 βασικές διαιρέσεις στις οποίες κατατάσσονται όλα τα στελέχη. Ο πίνακας δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το μέσο όρο των απομακρύνσεων (%) των δύο μετάλλων για κάθε αρχική συγκέντρωση όλων των στελεχών που ανήκουν στην ίδια διαίρεση.

Αρχικά, φαίνεται ότι συνολικά σε όλες τις διαιρέσεις, τα ποσοστά απομάκρυνσης του καδμίου είναι πολύ μεγαλύτερα απ’ ότι αυτά του μολύβδου. Οι τιμές κυμαίνονται από 44% έως 67% για το κάδμιο, ενώ για το μολύβδο 22% έως 67%, αλλά με τις περισσότερες τιμές να κυμαίνονται από 22% έως 45%.

Πιο συγκεκριμένα για όλες τις διαιρέσεις ισχύουν τα εξής:

- Όσον αφορά στο κάδμιο, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωσή του, μέχρι περίπου τα 200mg/L, όπου και ξεκινάει η μείωση του, καταλήγοντας έτσι στα 400 mg/L σε ποσοστό απομάκρυνσης μικρότερο από αυτό στα 50mg/L.
- Όσον αφορά στο μολύβδο, παρατηρείται ότι υπάρχει μια ιδιαίτερη συμπεριφορά. Το ποσοστό απομάκρυνσης μειώνεται όταν η αρχική συγκέντρωση κυμαίνεται από 50 mg/L μέχρι 200 mg/L και στη συνέχεια αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του, καταλήγοντας στα 400 mg/L και σε ποσοστό απομάκρυνσης

μεγαλύτερο από αυτό που παρατηρείται όταν η αρχική συγκέντρωση είναι 50mg/L.

Πίνακας 9 . Ποσοστά απομάκρυνσης των μετάλλων Cd&Pb από τα στελέχη των διαιρέσεων Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria και Bacteroidetes.

Απομάκρυνση μετάλλων (%)								
	Firmicutes		Actinobacteria		Proteobacteria		Bacteroidetes	
C ₀ (mg/L)	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb
50	59,44	33,49	55,04	40,80	60,62	37,94	67,87	48,27
100	63,46	23,32	59,28	30,16	64,17	25,60	65,57	40,95
200	59,20	22,56	53,44	27,40	56,98	26,45	44,46	29,58
300	59,62	67,61	44,87	31,53	53,13	45,50	62,88	52,02
400	49,62	58,69	39,25	44,20	44,70	37,05	48,96	67,66

Συμπερασματικά, τα στελέχη όλων των διαιρέσεων κατά μέσο όρο λειτουργούν καλύτερα ως προς την απομάκρυνση του καδμίου στις χαμηλές συγκεντρώσεις του, ενώ για τον μόλυβδο ισχύει το αντίθετο, όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωσή του, τόσο καλύτερη και η απομάκρυνσή του.

Από τον πίνακα 6 μπορούν επίσης να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα σχετικά με τα μέγιστα ποσοστά απομάκρυνσης που παρατηρούνται σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση του κάθε μετάλλου και την ομάδα των βακτηριακών στελεχών:

Για το κάδμιο

- Στα 50 mg/L υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.
- Στα 100 mg/L υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.

- Στα 200 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Firmicutes.
- Στα 300 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.
- Στα 400 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Firmicutes.

Για τον μόλυβδο

- Στα 50 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.
- Στα 100 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.
- Στα 200 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.
- Στα 300 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν που ανήκουν στην διαίρεση Firmicutes.
- Στα 400 mg/Λυψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτήρια που ανήκουν στην διαίρεση Bacteroidetes.

Συνολικά, τα υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης του μολύβδου επιτυγχάνονται από τα βακτηριακά στελέχη της διαίρεσης Bacteroidetes. Για το κάδμιο στις χαμηλές συγκεντρώσεις υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης επιτυγχάνουν τα βακτηριακά στελέχη της διαίρεσης Bacteroidetes, ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις του, τα αντίστοιχα ποσοστά επιτυγχάνουν τα βακτηριακά στελέχη της διαίρεσης Firmicutes.

Επισημαίνεται σε αυτό το σημείο ότι στη διαίρεση Bacteroidetes ανήκουν τα στελέχη:

- d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)]
- j [*Pedobacter* sp. (KM114941)]

ενώ στην διαίρεση Firmicutes ανήκουν τα στελέχη:

- e [*Paenibacillus* sp. (KT318609)]
- c [*Streptococcus* sp. (LN907757)]
- i [*Streptococcus sanguinis* (KJ023417)]
- k [*Staphylococcus* sp. (KP240938)]
- f [*Enterococcus* sp. (KR153958)]

- g [*Enterococcus* sp. (KR153958)]
- h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)]

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ & ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Κατά τον έλεγχο ανθεκτικότητας των βακτηριακών πληθυσμών των στελεχών στο δείγμα χώματος απ' όπου συλλέχθηκαν, έγινε επιλογή ανάμεσα στα παραπάνω 11 στελέχη.

Όσον αφορά στην επιλογή, σκοπός ήταν:

- Να επιλεγούν στελέχη από διαφορετικά δείγματα χώματος.
- Να επιλεγούν στελέχη από διαφορετικές διαιρέσεις.
- Να υπάρχουν σίγουρα στελέχη από τις δύο πιο “αποτελεσματικές” διαιρέσεις, όσον αφορά στην απομάκρυνση και των δύο μετάλλων (*Bacteroidetes* και *Firmicutes*).
- Για κάθε στέλεχος που επιλέγεται να υπάρχουν συνολικά υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης των μετάλλων.

Επιλέχθηκαν έτσι τα εξής τρία στελέχη:

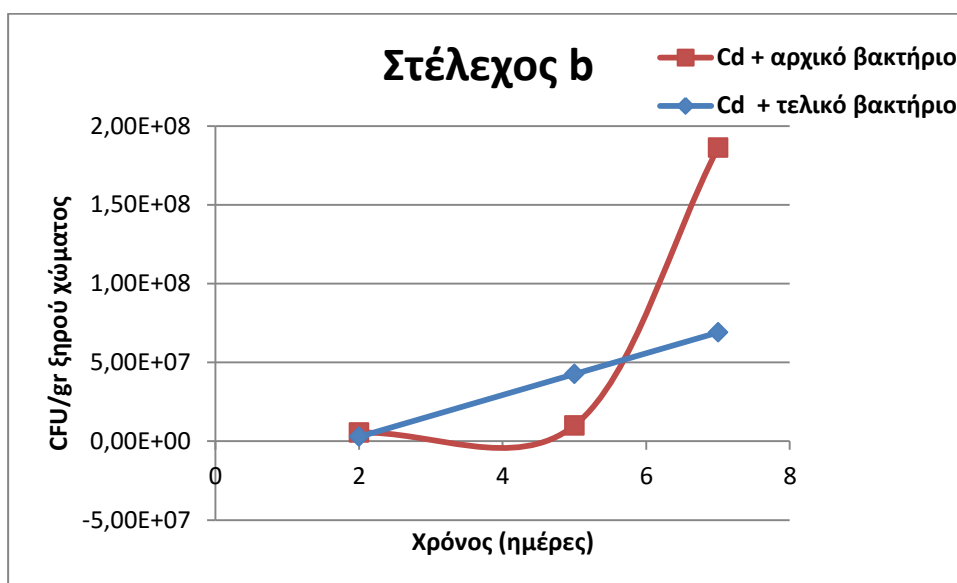
- b [*Pseudomonas* sp.(KJ004480)].
 - Ανήκει στην Διαίρεση *Proteobacteria*.
 - Συλλέχθηκε από το δείγμα χώματος 1 (περιοχή Κουφού Χανίων).
- d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)].
 - Ανήκει στην διαίρεση *Bacteroidetes*.
 - Συλλέχθηκε από το δείγμα χώματος 2 (Αρώνι, Ακρωτήρι Χανίων).
- h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)].
 - Ανήκει στην διαίρεση *Firmicutes*.
 - Συλλέχθηκε από το δείγμα χώματος 4 (Παραλία Αγίου Ονουφρίου).

Και τα τρία στελέχη αποδείχθηκαν αποτελεσματικά κατά την απομάκρυνση των δύο μετάλλων και μάλιστα είχαν υψηλά ποσοστά.

Όπως αναφέρθηκε και στη μεθοδολογία, για κάθε ένα από τα τρία στελέχη ετοιμάστηκαν έξι (6) δείγματα χώματος, τα οποία περιείχαν το μέταλλο (Cd ή Pb ή και τα δύο μαζί) σε συγκέντρωση 300 mg/L. Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με το στέλεχος

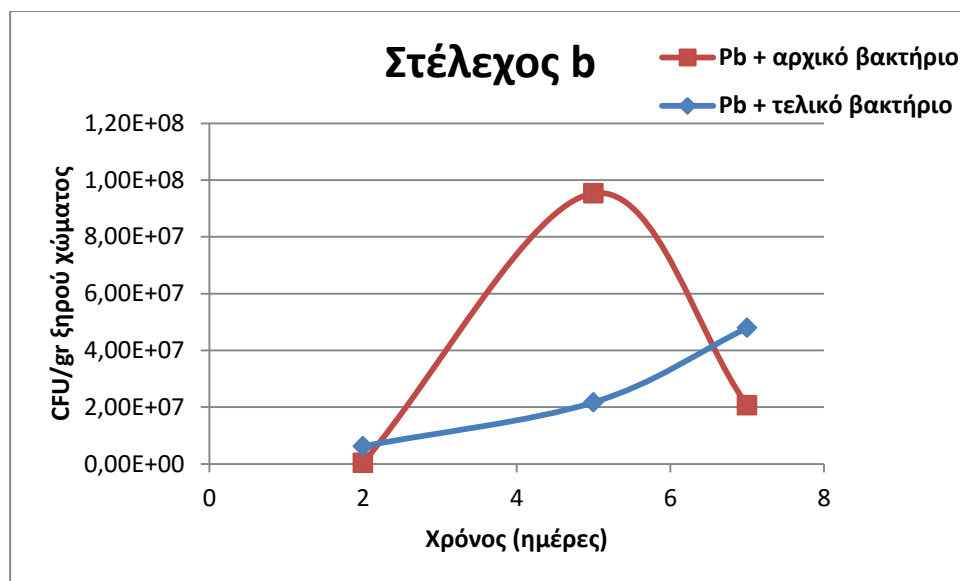
υπό εξέταση [στέλεχος προ εγκλιματισμού (αρχικό) και στέλεχος κατόπιν εγκλιματισμού (τελικό) που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο πειραμάτων]σε συγκέντρωση 10^5 CFU/mL. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία εβδομάδα και κατά την 2^η, 5^η και 7^η μέρα μια ποσότητα από αυτά αναλυόταν ως προς το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού και ως προς τη συγκέντρωση του μετάλλου. Τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάπτυξης φαίνονται παρακάτω διαγράμματα ομαδοποιημένα.

➤ Στέλεχος b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)]



Εικόνα 21. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd.

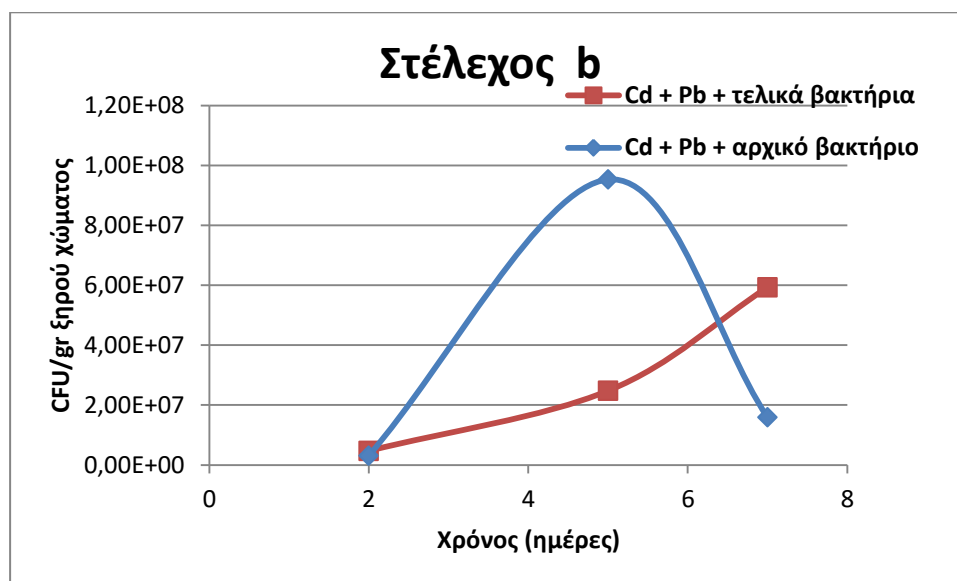
Στην εικόνα 21 φαίνεται ότι το στέλεχος b, είναι αρκετά ανθεκτικό στο κάδμιο, καθώς παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού του σε σχέση με το χρόνο. Το εγκλιματισμένο στέλεχος όμως φαίνεται να έχει επηρεαστεί καθώς ο πληθυσμός του αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό σχετικά με την αύξηση που έχει ο πληθυσμός του στελέχους που δεν έχει επιβαρυνθεί με το μέταλλο. Το συγκεκριμένο στέλεχος κατά την εκπόνηση του πειράματος ανθεκτικότητας στο κάδμιο σε υγρό διάλυμα, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση (300mg/L), είχε εμφανίσει μείωση πληθυσμού. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το στέλεχος ανταποκρίνεται καλύτερα στο φυσικό του περιβάλλον.



Εικόνα 22. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Pb.

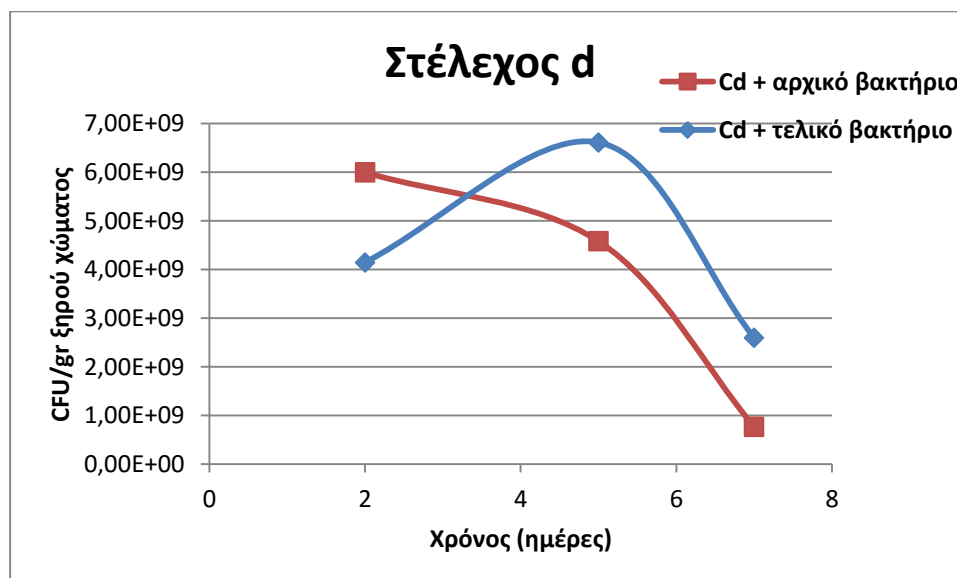
Στην εικόνα 22 φαίνεται ότι ο πληθυσμός του στελέχους, αφότου έχει επιβαρυνθεί ήδη με μόλυβδο, αυξάνεται. Στην αρχική του μορφή παρατηρείται ότι ο πληθυσμός αυξάνεται μέχρι και την 5^η ημέρα και στη συνέχεια μειώνεται αισθητά, γεγονός που συνάδει με την αύξηση του πληθυσμού του στο πείραμα ανθεκτικότητας στο υγρό διάλυμα, με τη μόνη διαφορά πως το πείραμα σε υγρό διάλυμα διήρκεσε 4 ημέρες, ενώ στο χώμα διήρκεσε 7. Έτσι δεν γίνεται γνωστό αν στη συνέχεια των 4 ημερών το στέλεχος όντως μειώθηκε σε πληθυσμό, όπως και στο χώμα. Και εδώ η αύξηση του πληθυσμού του στελέχους αφού επιβαρύνθηκε με το κάδμιο είναι μικρότερη συγκριτικά με αυτήν της αρχικής του μορφής, γεγονός που σημαίνει ότι επηρεάστηκε από το κάδμιο.

Στην εικόνα 23 φαίνεται ότι ο συνδυασμός καδμίου και μολύβδου επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του στελέχους στην αρχική του μορφή. Αντίθετα, ο πληθυσμός του στελέχους, ύστερα από την επίδραση του καδμίου και του μολύβδου μαζί, δεν δείχνει να επηρεάζεται και αυξάνεται. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι το στέλεχος κατά την επιβάρυνση του με τα βαρέα μέταλλα, ανέπτυξε ειδικούς μηχανισμούς άμυνας απέναντι σε αυτά και έτσι δείχνει ανθεκτικότητα.

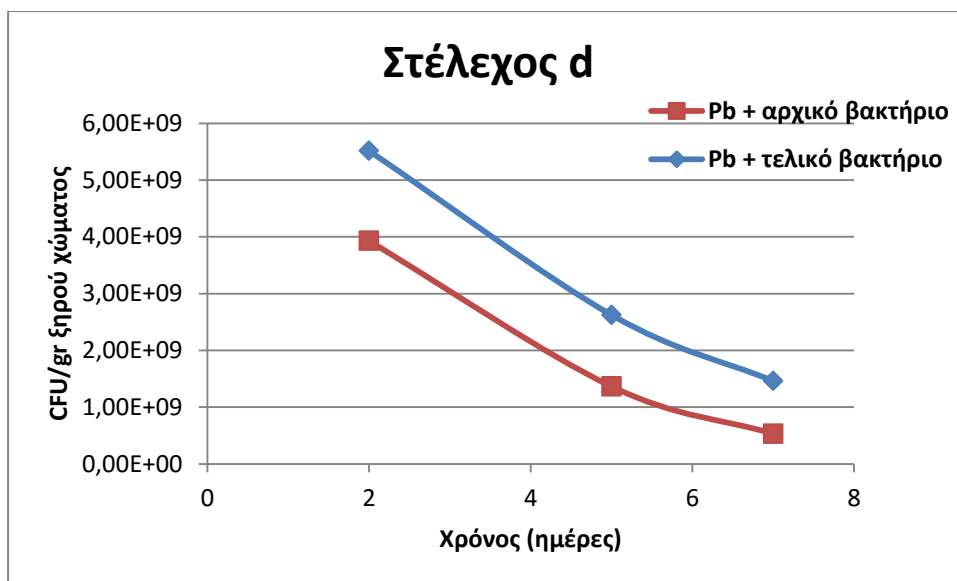


Εικόνα 23. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd & Pb.

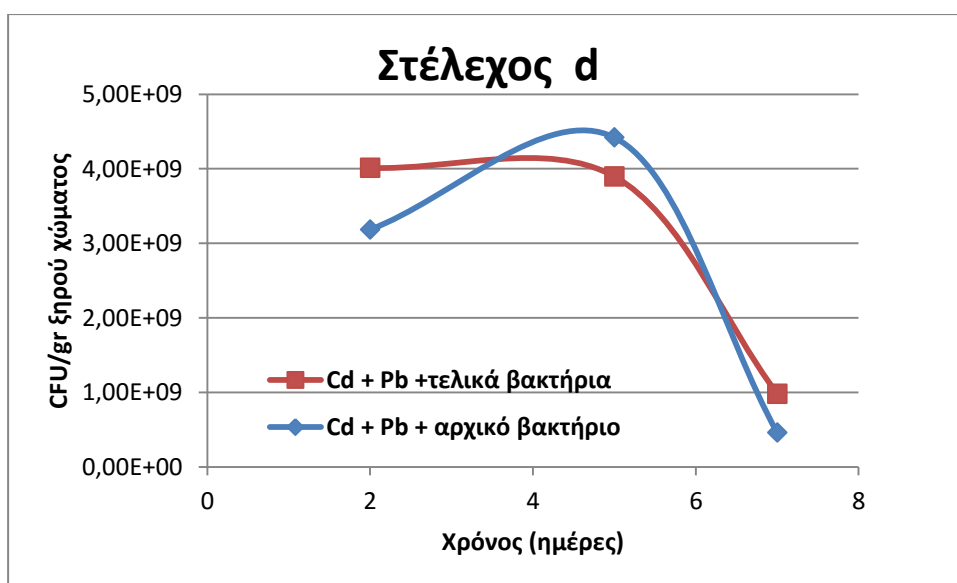
⇒ Στέλεχοςd [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)]



Εικόνα 24. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd.



Εικόνα 25. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Pb.



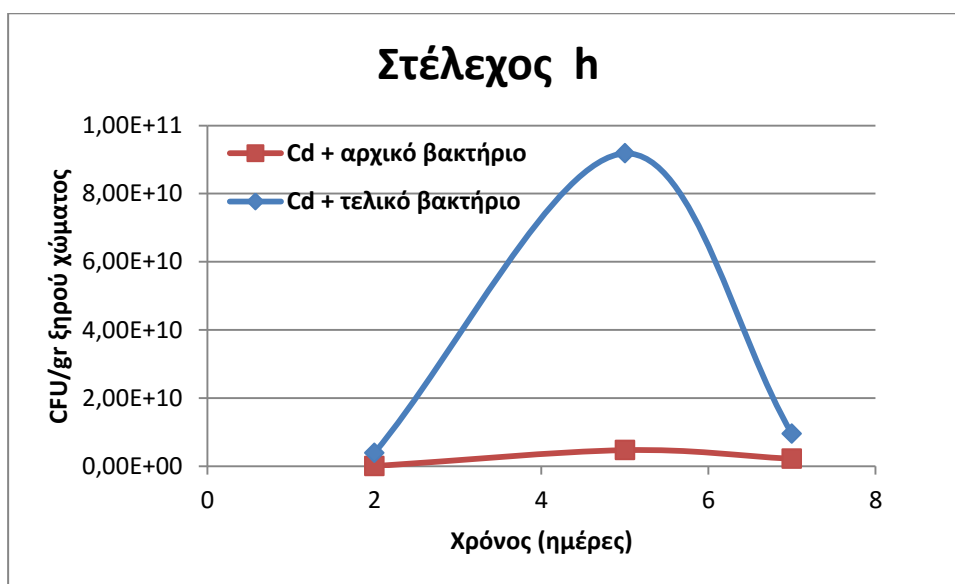
Εικόνα 26. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd&Pb.

Για το συγκεκριμένο στέλεχος τα αποτελέσματα που δείχνουν τα διαγράμματα δεν εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο σύνολο τους, ούτε στο κάδμιο ούτε στο μόλυβδο.

Η ανθεκτικότητα που παρατηρείται είναι στο κάδμιο μέχρι και την 5^η ημέρα, αλλά μόνο για το στέλεχος στην τελική του μορφή που δείχνει πως ίσως επηρεάστηκε από την επιβάρυνση του με κάδμιο και ανέπτυξε κάποιου είδους ανθεκτικότητα. Ο πληθυσμός του στελέχους στο πείραμα ανθεκτικότητας στο υγρό διάλυμα στα 300mg/L παρουσίασε μια μικρή αύξηση αλλά μόνο κατά την 4^η ημέρα ήταν αισθητή.

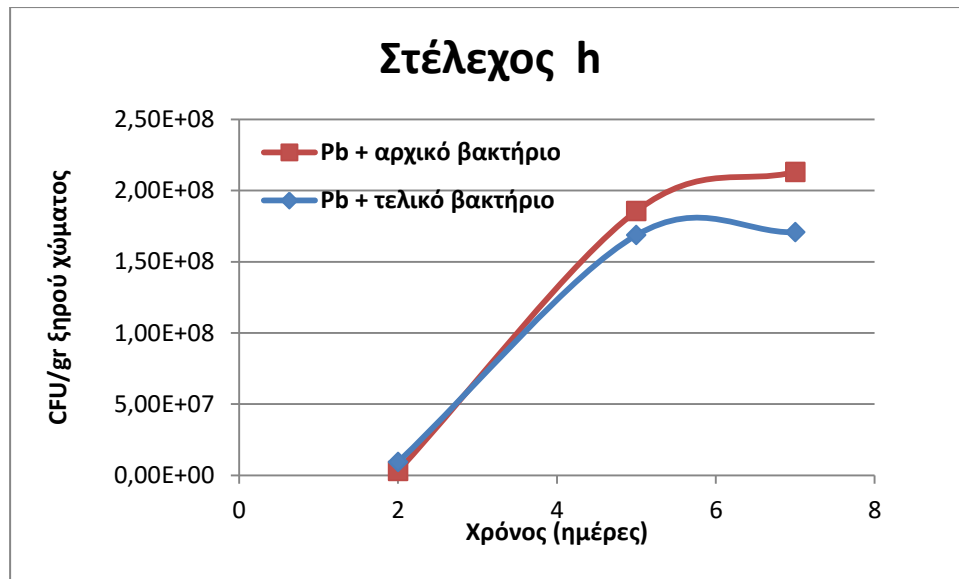
Στον συνδυασμό των δύο μετάλλων φαίνεται ότι το στέλεχος ανταποκρίνεται μέχρι και την 5^η ημέρα και στις δύο μορφές του αλλά στη συνέχεια ο πληθυσμός του μειώνεται κατά πολύ.

➤ **Στέλεχος h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)]**



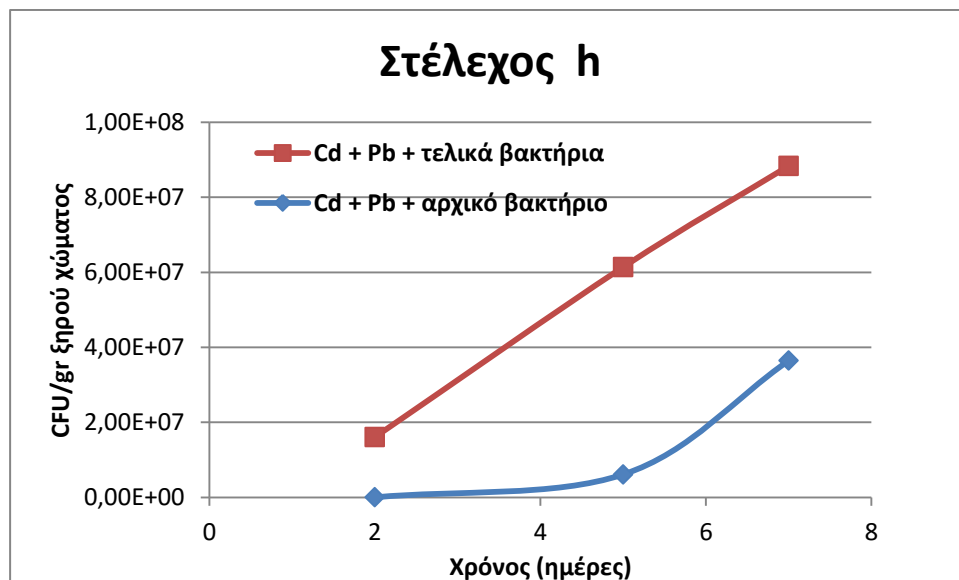
Εικόνα 27. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)] σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd.

Στην εικόνα 27 φαίνεται πως το φυσικό περιβάλλον δεν άλλαξε την ανθεκτικότητα του στελέχους απέναντι στο κάδμιο στην συγκέντρωση των 300mg/L, καθώς και στο πείραμα ανθεκτικότητας στο υδατικό διάλυμα ο πληθυσμός μειωνόταν σταδιακά με το χρόνο. Το στέλεχος που έχει επιβαρυνθεί με το κάδμιο παρουσιάζει ανθεκτικότητα μέχρι και την 5^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια επηρεάζεται από αυτό και μειώνεται πληθυσμιακά.



Εικόνα 28. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)]σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Pb.

Όσον αφορά στην επιβάρυνση με μόλυβδο, το στέλεχος εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα, τουλάχιστον μέχρι και την 7^η ημέρα ελέγχου και στις δύο μορφές του. Μεγάλη ανθεκτικότητα είχε επίσης εμφανίσει και στο υδατικό διάλυμα, στην ίδια συγκέντρωση.



Εικόνα 29. Διακύμανση πληθυσμού στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)]σε δείγμα χώματος κατόπιν ρύπανσης με Cd&Pb.

Στην εικόνα 29 παρατηρείται ανθεκτικότητα στον συνδυασμό των δύο μετάλλων μαζί και στις δύο μορφές του στελέχους. Μεγαλύτερη αύξηση πληθυσμού εμφανίζει όμως το εγκλιματισμένο στέλεχος αφού έχει επιβαρυνθεί πρώτα με τα μέταλλα. Έτσι

συμπεραίνουμε ότι ίσως και αυτό το βακτήριο ανέπτυξε κάποιους μηχανισμούς άμυνας αζώτου είχε επιβαρυνθεί με κάδμιο και μόλυβδο.

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τις τιμές άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου των δειγμάτων χώματος.

Πίνακας 10: Τιμές άνθρακα, φωσφόρου και αζώτου των δειγμάτων χώματος.

Δείγμα χώματος	TOC	TC	TKN	TP	IC
4	3,29	34,96	0,98	1,34	31,67
2	29,81	83,84	2,42	2,24	54,02
1	19,58		2,13	1,85	<0,03

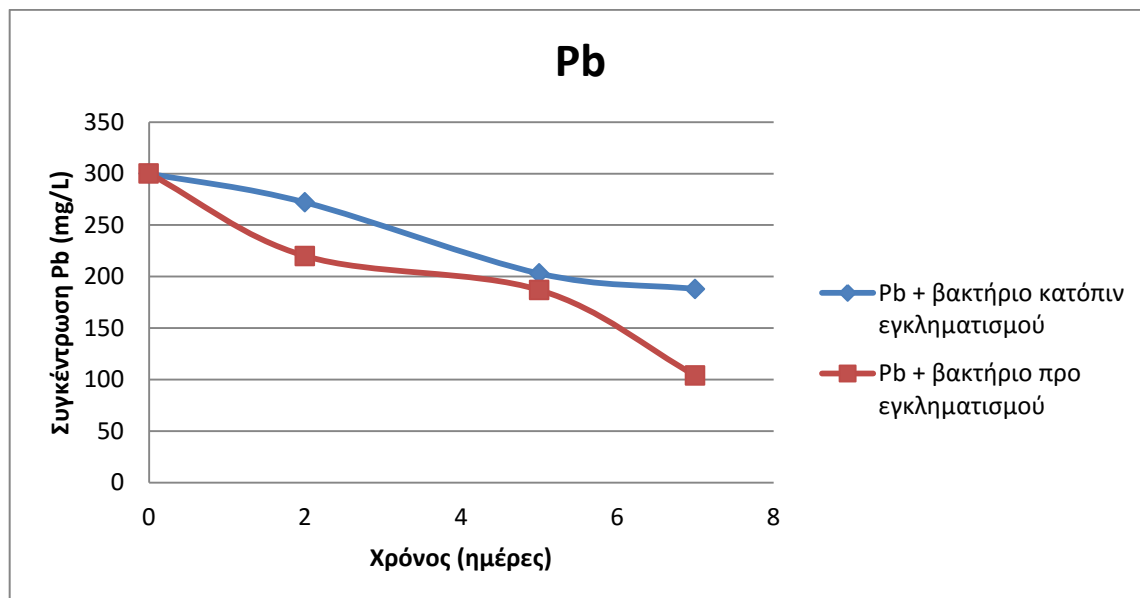
Από τις παραπάνω τιμές υπολογίζεται το πηλίκo C/N για κάθε δείγμα χώματος. Έτσι για το δείγμα 4: C/N=35,67, για το δείγμα 2: C/N=34,65, ενώ για το δείγμα 1, λόγω αστοχίας του οργάνου μέτρησης δεν υπάρχει καταγεγραμμένη τιμή.

Η σχέση C/N είναι πολύ σημαντική και η ιδανική τιμή της πρέπει να είναι γύρω στο 25-35/1. Ο άνθρακας είναι βασικά αυτός που παρέχει ενέργεια στους μικροοργανισμούς, ενώ το άζωτο είναι βασικό συστατικό για τη δημιουργία των πρωτεϊνικών συστατικών τους. Αν η τιμή του C/N είναι μεγαλύτερη, απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την αποσύνθεση, ενώ αν είναι μικρότερη, τότε μέρος του αζώτου χάνεται στην ατμόσφαιρα με τη μορφή αμμωνίας.

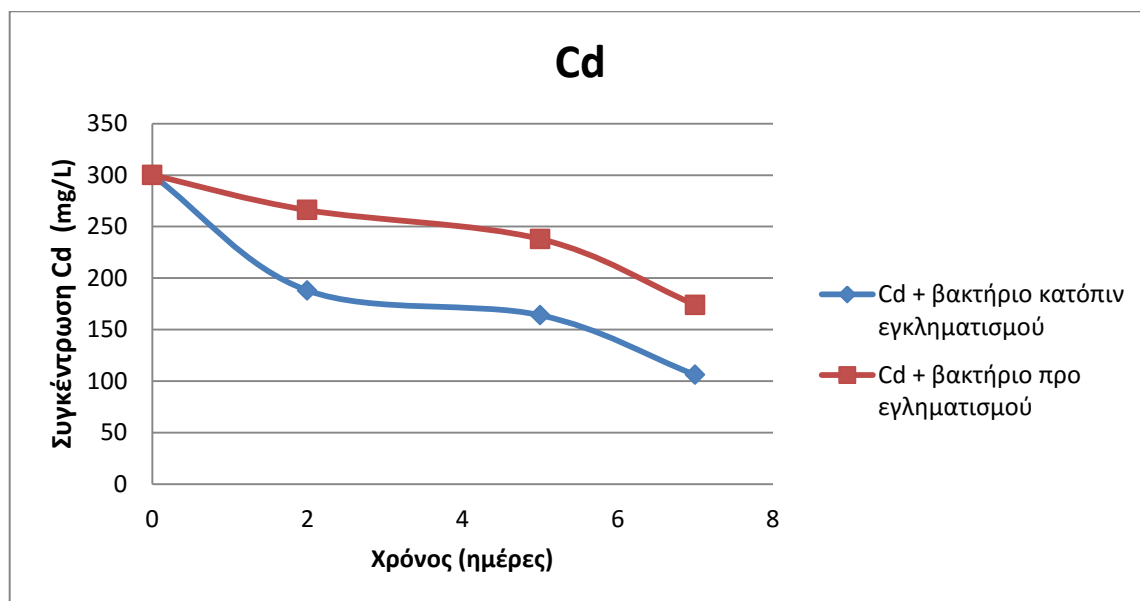
Όταν το πηλίκo C/N είναι μεγάλο, οι μικροοργανισμοί του εδάφους που είναι υπεύθυνοι για τη διάσπαση των οργανικών υπολειμμάτων, έχοντας στη διάθεσή τους αφθονία ενέργειας (πολύ άνθρακα), πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα. Σύμφωνα με τις παραπάνω τιμές φαίνεται πως τα δείγματα έχουν πηλίκo C/N μέσα στις επιθυμητές τιμές, με τον άνθρακα να βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Παρακάτω παρατίθενται για κάθε ένα από τα τρία παραπάνω στελέχη, τα διαγράμματα συγκέντρωσης των μετάλλων ως προς τον χρόνο, για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα.

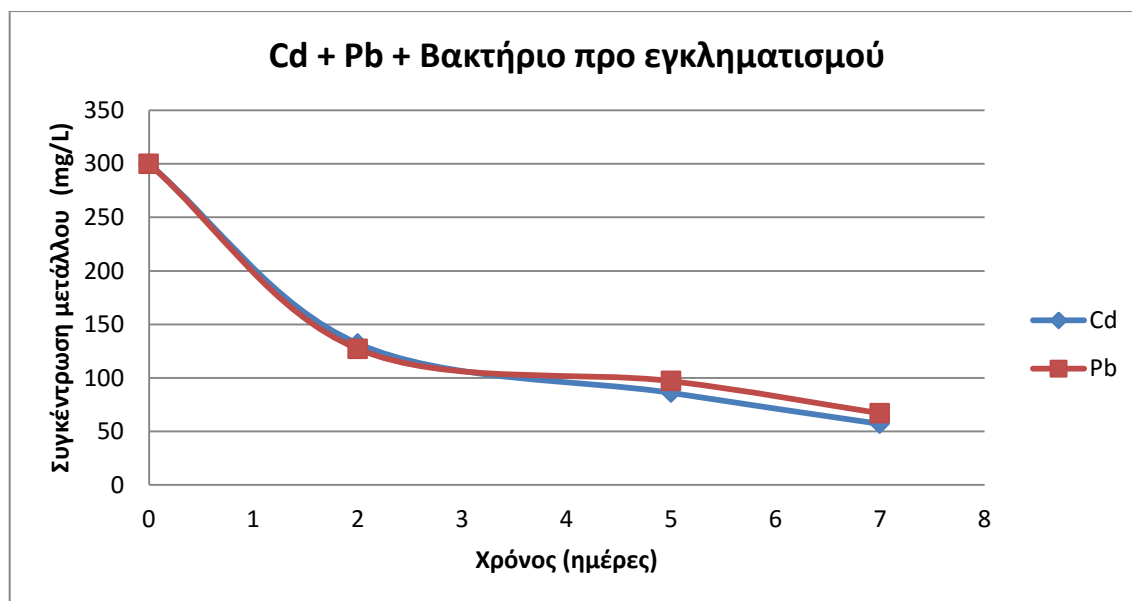
➡ Στέλεχος [*Enterococcus* sp. (KJ175075)]



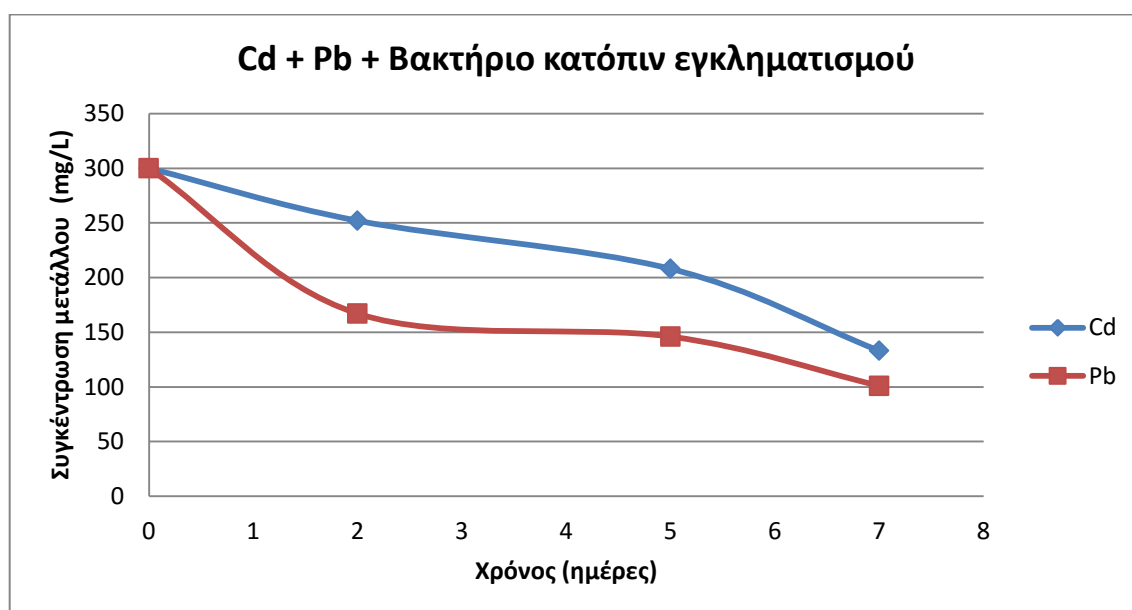
Εικόνα 30. Διακύμανση συγκέντρωσης Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)].



Εικόνα 31. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)].

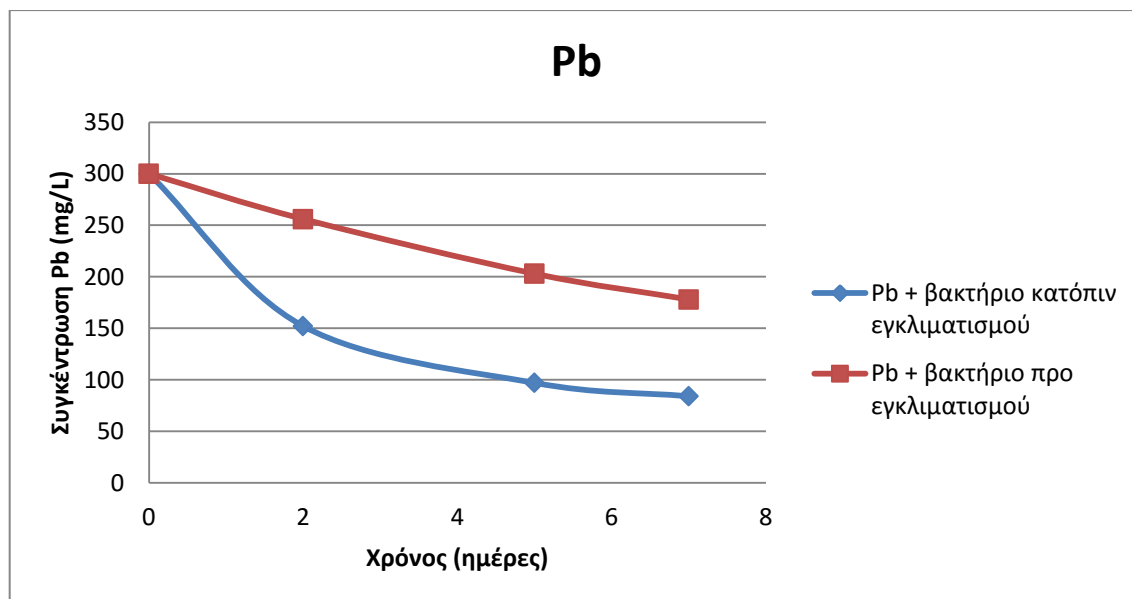


Εικόνα 32. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)] προ εγκληματισμού.

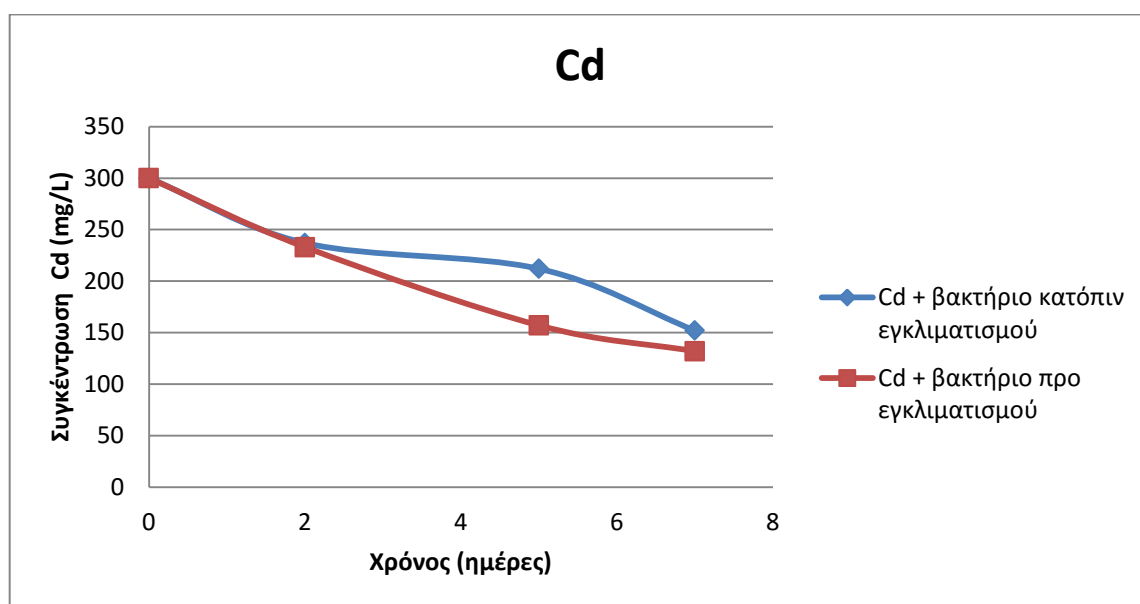


Εικόνα 33. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου h [*Enterococcus* sp. (KJ175075)] κατόπιν εγκληματισμού.

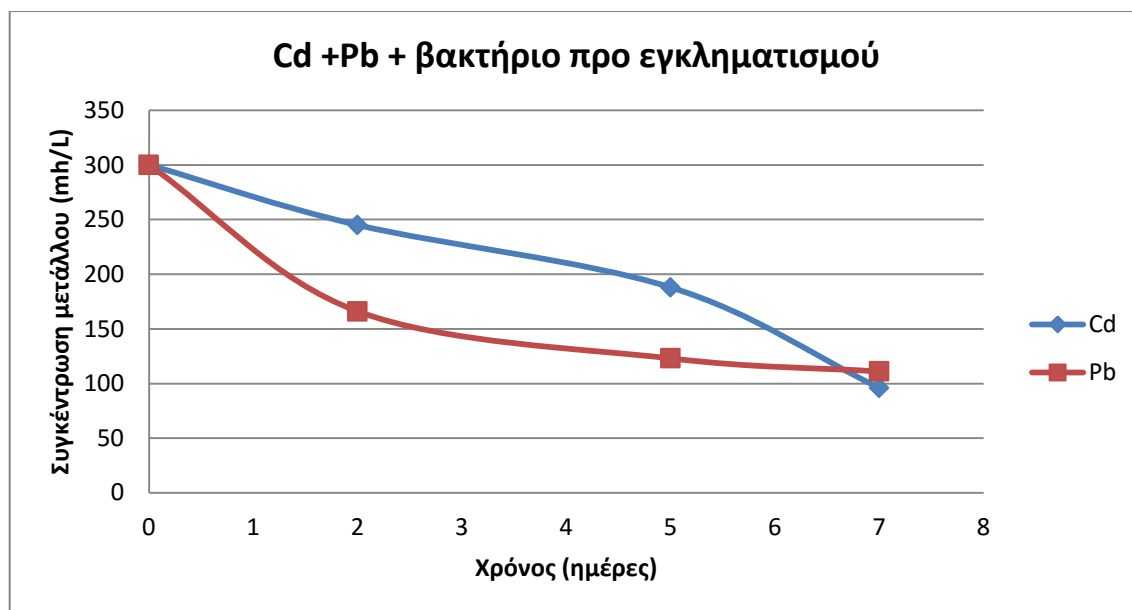
➡ Στέλεχος d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)]



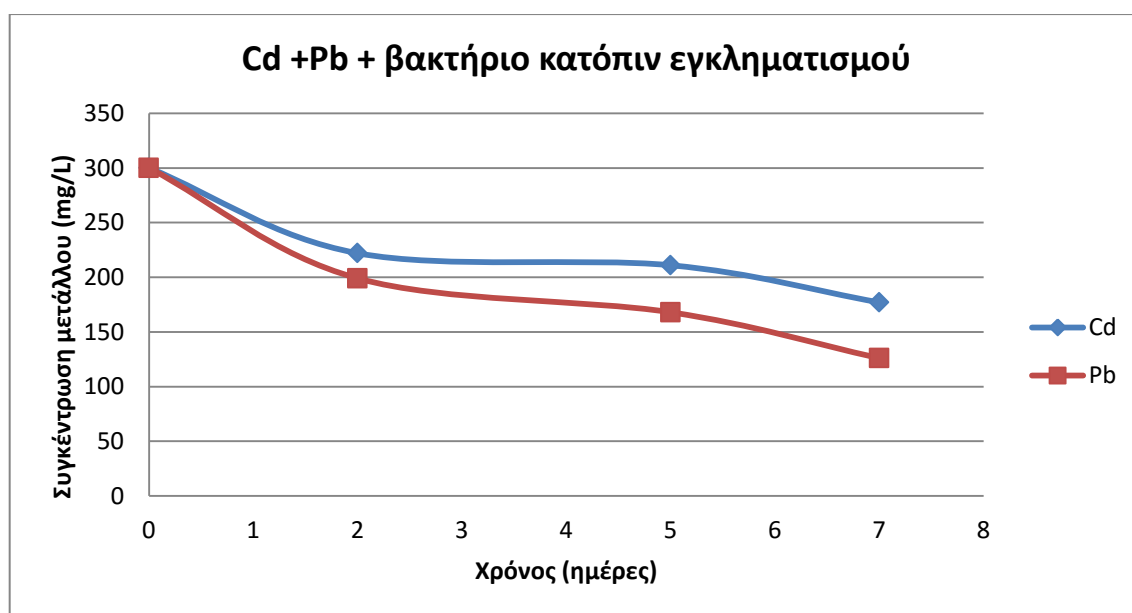
Εικόνα 34. Διακύμανση συγκέντρωσης Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)].



Εικόνα 35. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)].

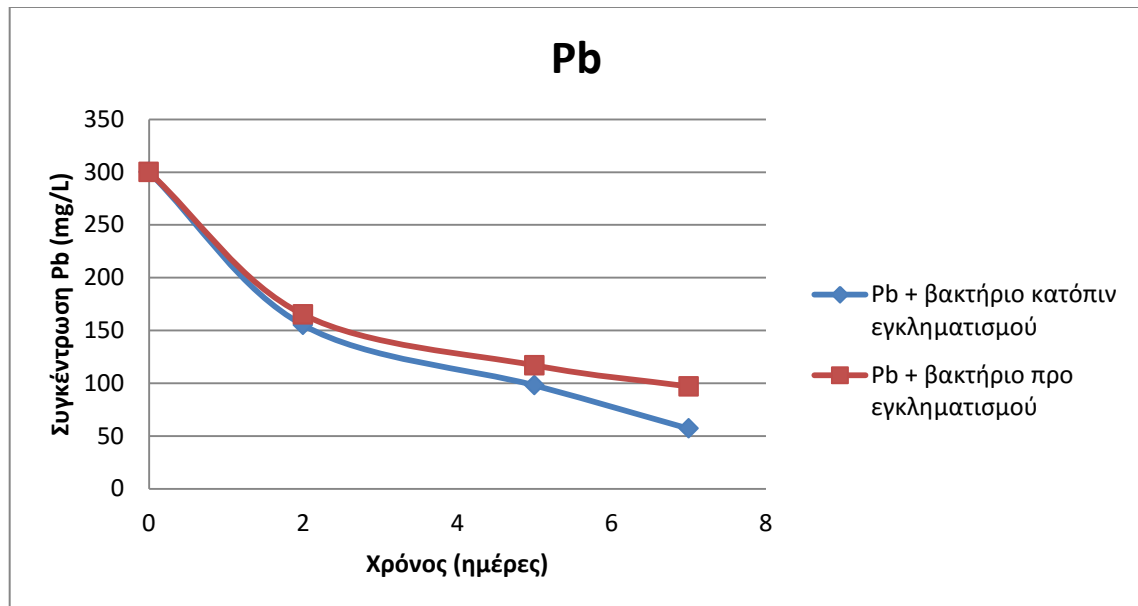


Εικόνα 36. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)] προ εγκληματισμού .

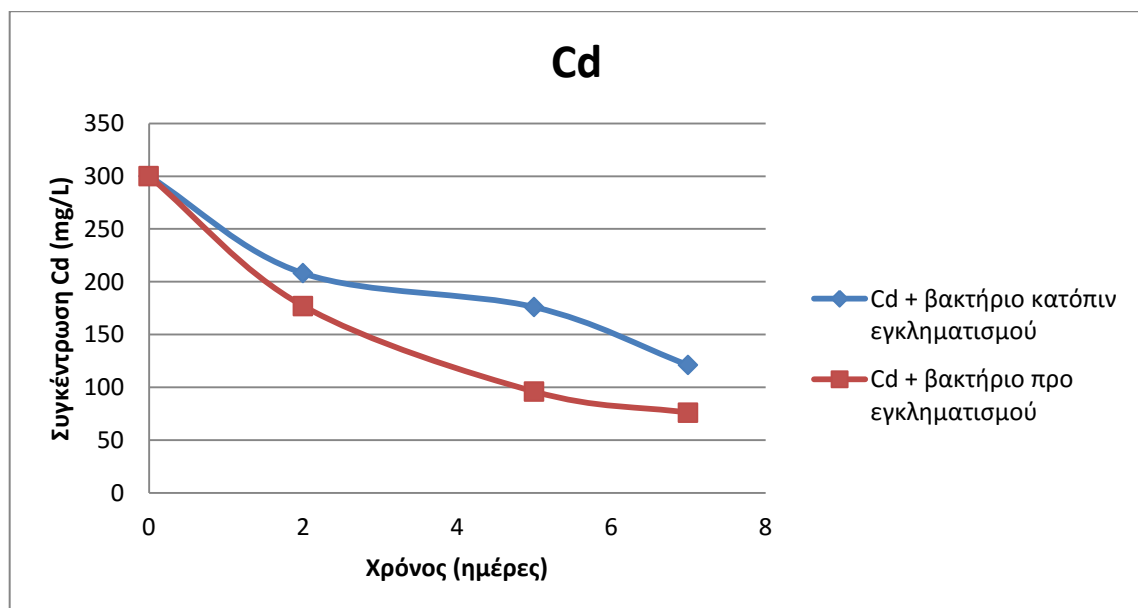


Εικόνα 37. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου d [*Chryseobacterium* sp. (KF263564)] κατόπιν εγκληματισμού .

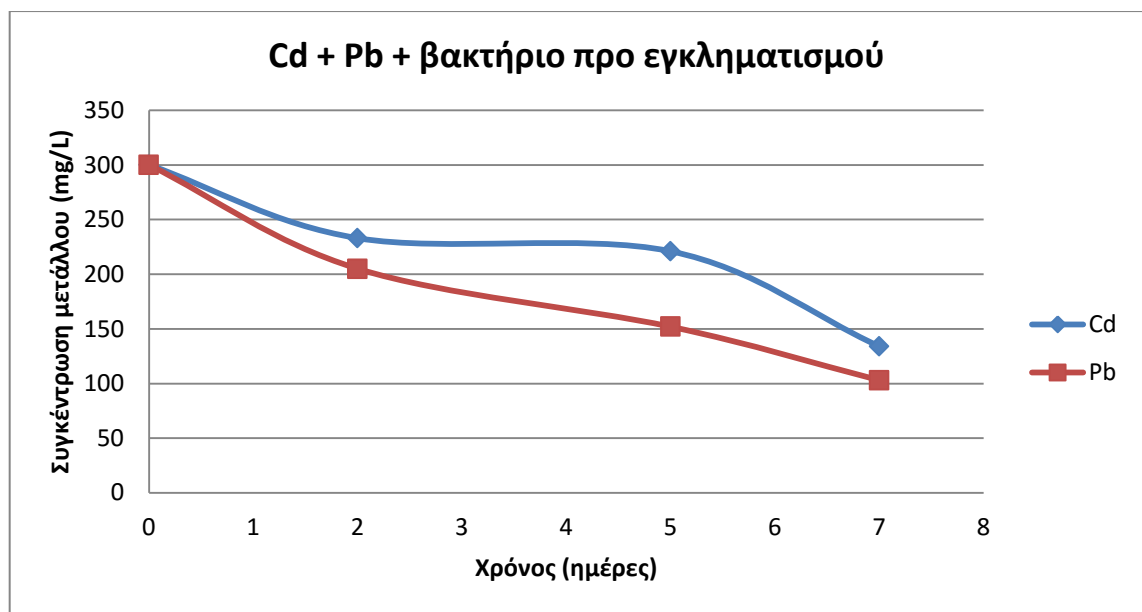
➡ Στέλεχος b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)]



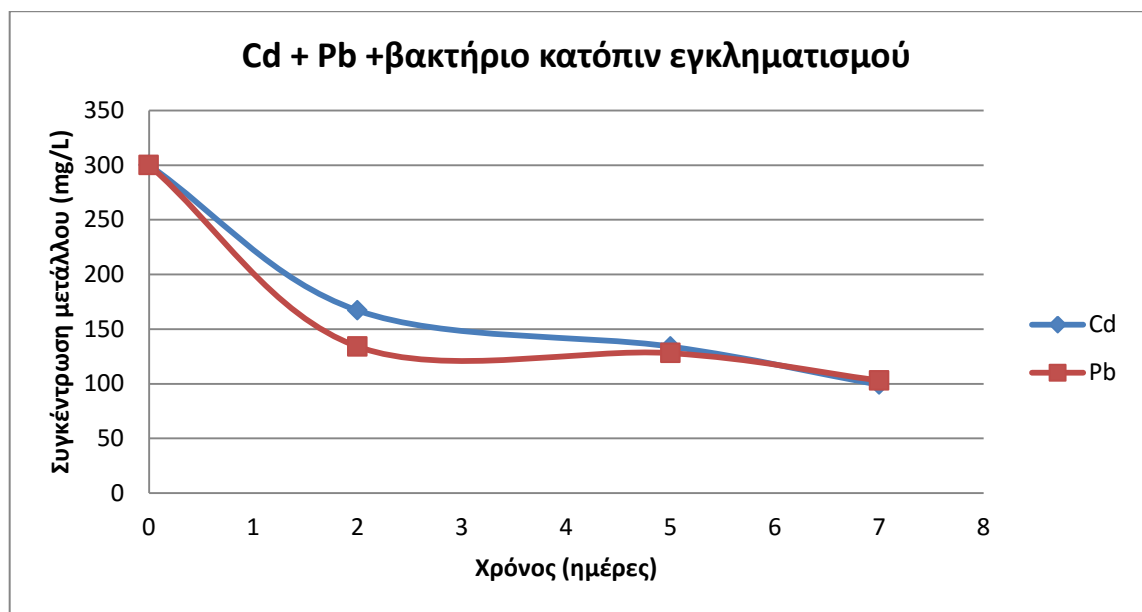
Εικόνα 38. Διακύμανση συγκέντρωσης Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)].



Εικόνα 39. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)].



Εικόνα 40. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)] προ εγκληματισμού.



Εικόνα 41. Διακύμανση συγκέντρωσης Cd&Pb σε δείγμα χώματος ως αποτέλεσμα δράσης στελεχών του βακτηρίου b [*Pseudomonas* sp. (KJ004480)] κατόπιν εγκληματισμού.

Συνολικά παρατηρείται μεγάλη μείωση στη συγκέντρωση και των δύο μετάλλων και στα τρία στελέχη. Αυτό ισχύει και στα στελέχη προ εγκληματισμού στο Κάδμιο και τον Μόλυβδο και σε αυτά μετά τον εγκληματισμό τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας επικεντρώνονται στη συμπεριφορά των βακτηριακών στελεχών ως προς την πληθυσμιακή τους ανάπτυξη σε επιβαρυμένα περιβάλλοντα με τα βαρέα μέταλλα κάδμιο και μόλυβδο, καθώς και στη δυνατότητα απομάκρυνσης αυτών των βαρέων μετάλλων από τα εξεταζόμενα δείγματα.

Τα συμπεράσματα χωρίζονται σε δύο βασικούς άξονες, όπως και η πειραματική διαδικασία της εργασίας. Συμπεράσματα με βάση τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς των στελεχών και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων σε επιβαρυμένα υδατικά διαλύματα και στα επιβαρυμένα δείγματα χώματος, απ' όπου συλλέχθηκαν τα στελέχη.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας στα υδατικά διαλύματα βαρέων μετάλλων – βακτηριακών στελεχών, παρατηρήθηκαν τα εξής:

➤ Η πλειοψηφία των εξεταζόμενων στελεχών (8/11 στελέχη) έδειξε μεγάλη ανθεκτικότητα, σύμφωνα με την πορεία της πληθυσμιακής τους ανάπτυξης, ύστερα από την επιβάρυνση τους με χαμηλές συγκεντρώσεις καδμίου, ενώ τα υπόλοιπα (3/11 στελέχη) έδειξαν ανθεκτικότητα και στις υψηλές συγκεντρώσεις αυτού. Αντίστοιχα με αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν και τα ποσοστά απομάκρυνσης του καδμίου, ύστερα από μετρήσεις που έγιναν στα δείγματα μετά το πέρας του πειράματος. Τα ποσοστά είναι υψηλά στο σύνολο των βακτηρίων, με υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται στις χαμηλές συγκεντρώσεις αυτού.

➤ Τα εξεταζόμενα στελέχη ύστερα από επιβάρυνση με μόλυβδο, αποδείχθηκαν πολύ ανθεκτικά στις περισσότερες συγκεντρώσεις του, με εξαίρεση την συγκέντρωση των 400 mg/L, κατά την οποία τα μισά περίπου (6/11 στελέχη) επηρεάστηκαν αρνητικά ως προς την πληθυσμιακή τους ανάπτυξη. Όσον αφορά στην απομάκρυνσή του από τα δείγματα ύστερα από τις 4 ημέρες που διήρκεσε η πειραματική διαδικασία, τα ποσοστά είναι ικανοποιητικά, αλλά συγκριτικά με τα ποσοστά απομάκρυνσης του καδμίου είναι χαμηλότερα. Αποδεικνύεται όμως ότι τα στελέχη μπορούν να διαχειριστούν καλύτερα τις υψηλές συγκεντρώσεις του.

➤ Συγκρίνοντας τα ποσοστά απομάκρυνσης και των δύο μετάλλων με βάση τις διαιρέσεις στις οποίες ανήκουν τα εξεταζόμενα στελέχη, συμπεραίνουμε ότι 2 από τις 4 αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικές. Αυτές ήταν οι διαιρέσεις Bacteroidetes και Firmicutes. Τα εξεταζόμενα στελέχη που ανήκουν στη διαίρεση Bacteroidetes (2/11) έδειξαν να απομακρύνουν καλύτερα τον μόλυβδο, ενώ τα στελέχη που ανήκουν στη διαίρεση Firmicutes (7/11) λειτούργησαν καλύτερα στην απομάκρυνση υψηλών συγκεντρώσεων και των δύο μετάλλων.

➤ Συνολικά φαίνεται ότι το κάδμιο είναι αρκετά τοξικό όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του, ενώ ο μόλυβδος φαίνεται πιο τοξικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό, όπως αναφέρθηκε και στην θεωρία παραπάνω, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει ακραίους μηχανισμούς άμυνας σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων σε σχέση με χαμηλότερες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η μικροβιακή αντοχή τους.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας στα επιβαρυμένα δείγματα χώματος, απ' όπου συλλέχθηκαν τα στελέχη, παρατηρήθηκαν τα εξής:

➤ Το στέλεχος b [*Pseudomonas* sp.], το οποίο ανήκει στη διαίρεση Proteobacteria και συλλέχθηκε από την περιοχή Κουφού Χανίων, σύμφωνα με την παρατήρηση της πληθυσμιακής του ανάπτυξης στη διάρκεια των 7 ημερών, αποδείχθηκε αρκετά ανθεκτικό στο κάδμιο και στο μόλυβδο καθώς και στον συνδυασμό τους, και στις δύο μορφές που εξετάστηκε. Το στέλεχος όμως το οποίο δεν είχε επιβαρυνθεί με βαρέα μέταλλα, έδειξε μείωση πληθυσμού μετά την 5^η ημέρα εκπόνησης του πειράματος, στα δείγματα επιβαρυμένα με μόλυβδο και σε αυτά με τον συνδυασμό των δύο.

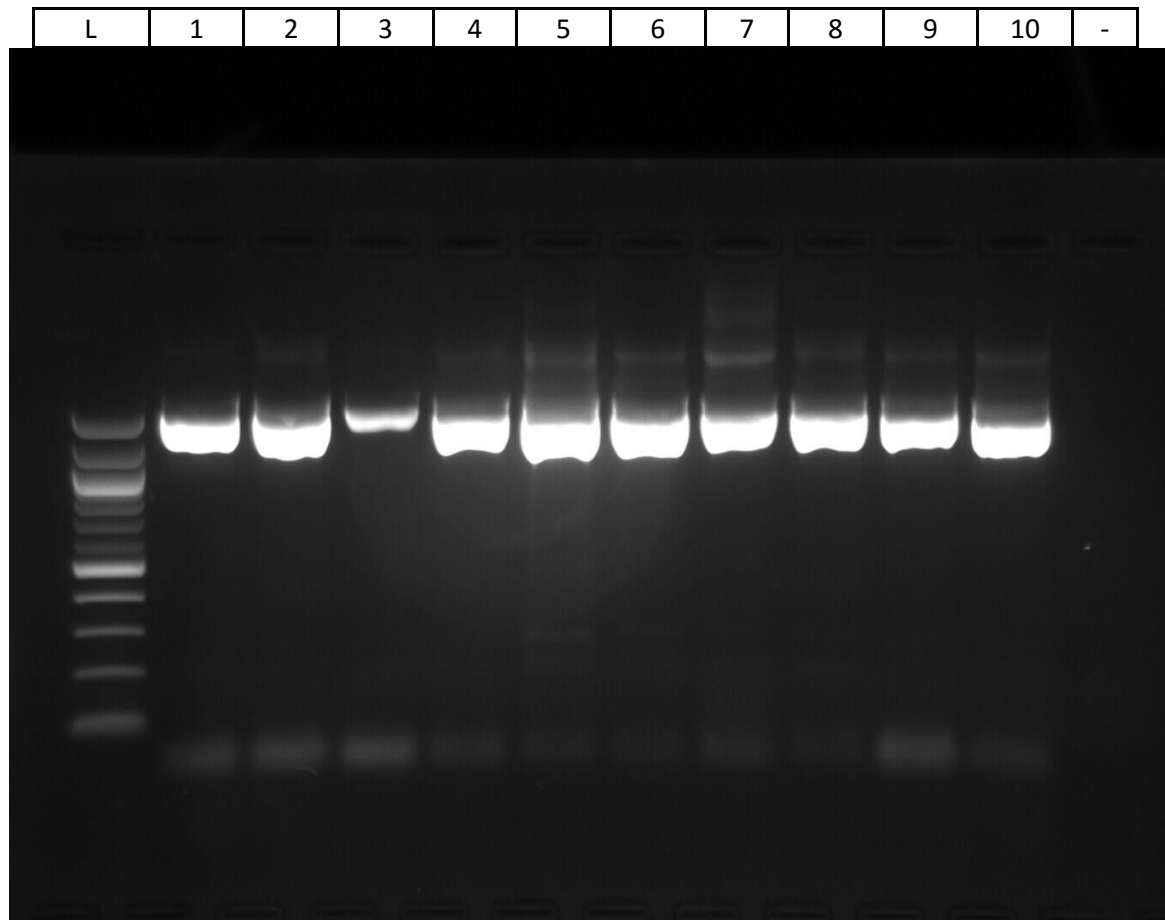
➤ Το στέλεχος d [*Chryseobacterium* sp.], το οποίο ανήκει στη διαίρεση Bacteroidetes και συλλέχθηκε από την περιοχή Αρώνι, Ακρωτήρι Χανίων, σύμφωνα με την παρατήρηση της πληθυσμιακής του ανάπτυξης στη διάρκεια των 7 ημερών, δεν αποδείχθηκε ανθεκτικό, παρά μόνο στο κάδμιο μέχρι και την 5^η ημέρα του πειράματος και μόνο το στέλεχος που είχε ήδη επιβαρυνθεί με κάδμιο. Μια μικρή αύξηση πληθυσμού παρατηρήθηκε και στον συνδυασμό των δύο μετάλλων και

στις δύο μορφές του στελέχους, αλλά και σε αυτήν την περίπτωση μέχρι την 5^η ημέρα.

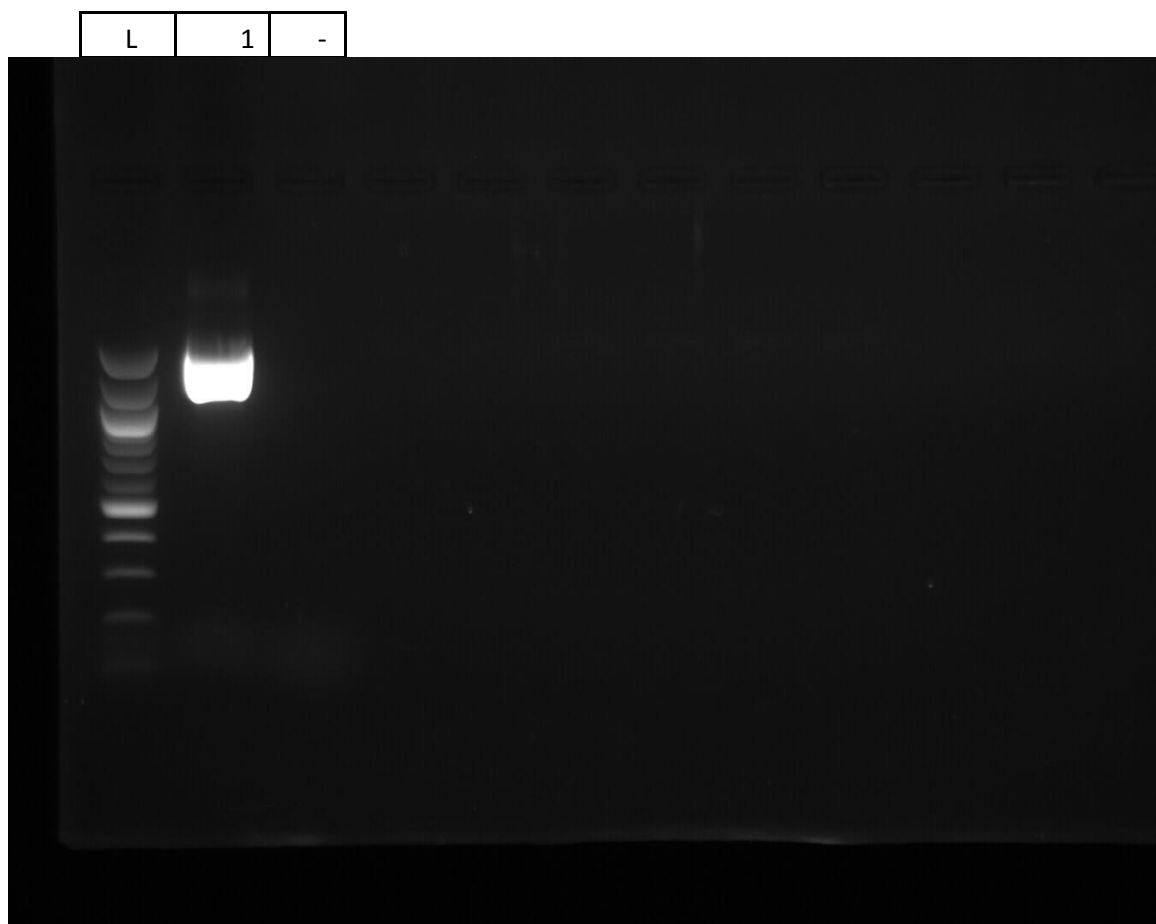
- Το στέλεχος *h* [*Enterococcus* sp. (KJ175075)], το οποίο ανήκει στη διαίρεση Firmicutes και συλλέχθηκε από την παραλία του Αγίου Ονουφρίου στο Ακρωτήριο Χανίων, σύμφωνα με την παρατήρηση της πληθυσμιακής του ανάπτυξης στη διάρκεια των 7 ημερών, αποδείχθηκε αρκετά ανθεκτικό μέχρι και την 5^η ημέρα εκπόνησης του πειράματος στην συγκέντρωση του καδμίου, ενώ στο μόλυβδο και στον συνδυασμό των δύο μετάλλων, το στέλεχος και στις δύο μορφές του, αναπτύχθηκε πολύ. Μεγαλύτερη ανάπτυξη όμως έδειξε το στέλεχος που προηγουμένως είχε επιβαρυνθεί με τα βαρέα μέταλλα.
- Συνολικά, παρατηρείται μια μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των στελεχών που έχουν ήδη επιβαρυνθεί, καθώς σύμφωνα με τον πληθυσμό τους συνεχίζουν να αναπτύσσονται κατά την 7^η ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα βακτηριακά στελέχη αυτά πλέον έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας απέναντι στα βαρέα μέταλλα και έτσι είναι «προετοιμασμένα» σε κάθε νέα επιβάρυνση τους.
- Αποδεικνύεται τελικά ότι τα προς εξέταση βακτήρια καταφέρνουν να απομακρύνουν τα βαρέα μέταλλα από το χώμα με μεγάλη αποτελεσματικότητα.
- Συμπερασματικά, η χρήση βακτηρίων για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από το έδαφος μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική μέθοδο. Τον καλύτερο συνδυασμό αποτελεί η χρήση ήδη εγκλιματισμένων βακτηρίων στα προς απομάκρυνση βαρέα μέταλλα, καθώς αποδεικνύονται και πιο ανθεκτικά στον χρόνο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρακάτω παρατίθενται οι φωτογραφίες των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 42 . Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης, προϊόντα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, Διαδρομές→L:Ladder(100bp.), 1-10, -:αρνητικό δείγμα.



Εικόνα 43. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης, προϊόντα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, Διαδρομές→L:Ladder(100bp.), 11, -:αρνητικό δείγμα.

Πρόκειται για ασπρόμαυρες φωτογραφίες πηκτώματος αγαρόζης. Για την οπτικοποίηση των θραυσμάτων DNA προσθέσαμε τον παράγοντα χρώσης Bromophenolblue στο πήκτωμα και στο ρυθμιστικό διάλυμα. Εκθέσαμε το πήκτωμα σε υπεριώδες φως και είδαμε τις φθορίζουσες ζώνες. Τέλος φωτογραφήθηκε το πήκτωμα με μια φωτογραφική μηχανή εφοδιασμένη με φίλτρο UV. Γενικά περισσότερη ποσότητα DNA σε μια ζώνη δίνει μεγαλύτερη χρώση στη ζώνη.

Στις φωτογραφίες φαίνονται από τα αριστερά προς τα δεξιά, με τη σειρά, τα φθορίζοντα θραύσματα DNA όλων των δειγμάτων, από το αμέχρι και το κτο οποίο βρίσκεται στην 2^η φωτογραφία. Τα μεγαλύτερα θραύσματα φθορίζουν πιο έντονα καθώς, τα μικρότερα θραύσματα περιλαμβάνουν λιγότερη μάζα του DNA, καταλαμβάνουν λιγότερο χρωστική και ως εκ τούτου φθορίζουν λιγότερο έντονα. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στη λωρίδα στο δεξί άκρο, το οποίο δείχνει μια «σκάλα» σεθ θραυσμάτων DNA (ladder) γνωστού

μεγέθους, στην εργασία 100bp = 100 χιλιάδες ζεύγη βάσεων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των μεγεθών των άλλων αγνώστων θραυσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alloway B.J., 1990. Heavy metals in soil. Blackie Academic and Professional.
2. Avery S.V., 1995. Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity. J. Ind. Microbiol. 14, 76-84.
3. Debus K.H., 1990. Mining with microbes. Technol. Rev. 93, 50-57.
4. Dupont S., Carré-Mlouka A., Descarrega F., Ereskovsky A., Longeon A., Mouray E., Florent I., Bourguet-Kondracki M.L., 2014. Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbastencior*. Lett. Appl. Microbiol. 58, 42-52.
5. Duxbury T., 2006. Toxicity of heavy metals to soil bacteria.
6. Duxbury T., Bicknell B., 2006. Metal- Tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils.
7. Fergusson, J.E., 1990. The heavy elements : chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press.
8. Holden J.F. Adams M.W.W., 2003. Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 160–165.
9. Holm, P.E., Anderson, B.B.H., Christensen, T.H., 1996. Cadmium solubility in aerobic soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 775–780.
10. http://esdac.jrc.ec.europa.eu/ESDB_Archive/eusoids_docs/other/EUR26102EN.pdf
11. Khan S., Hesham A., Qiao M., Shafiqur R., He J.Z., 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. Environ. Sci. Pollut. Res. 17, 288–296.
12. Kong, I.C., 1998. Metal toxicity on the dechlorination of monochlorophenols in fresh and acclimated anaerobic sediment slurries. Water Sci. Technol. 38, 143-150.
13. Kudo, A., Fujikawa, Y., Miyahara, S., Zheng, J., Takigami, H., Sugahara, M., et al., 1998. Lessons from Minamata mercury pollution. Japan- after a continuous 22 years of observation. Water Sci. Technol. 38, 187-193.

14. Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P., 2009. Environmental Microbiology, 2nd edition, Academic Press.
15. Maier, R.M., Soberon-Chavez, G., 2000. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 625-633.
16. Pan J., Yu L., 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecol. Eng. 37, 1889–1894.
17. Roane T.M., Kellogg S.T., 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Can. J. Microbiol. 42, 593-603.
18. Schiewer S., Volesky B., 2000. Biosorption by marine algae. In: ValdesJJ (ed) Remediation. Kluwer, Dordrecht.
19. TóthG., Hermann T., Da Silva M.R., Montanarella L., 2016. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. Environ Int. 88, 299-309.
20. Zhang Y., Zhang X., Zhang H., He Q., Zhou Q., Su Z., Zhang C., 2009. Responses of soil bacteria to long-term and short-term cadmium stress as revealed by microbial community analysis. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82, 367–372.
21. Κανελλάκης Σ., 2003. Η επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους στη ρύπανση από βαρέα μέταλλα. Μεταπτυχιακή διατριβή: Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών.
22. Λουκίδου Μ., 2003. Απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από αραιά διαλύματα με την εφαρμογή της βιορρόφησης. Διδακτορική διατριβή: ΤμήμαΧημείας. ΑριστοτέλειοΠανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
23. Μήτσιος Ι., 2004. Γονιμότητα Εδαφών Θρεπτικά στοιχεία φυτών: Μακροθρεπτικά, μικροθρεπτικά και βαρέα μέταλλα. Μέθοδοι και εφαρμογές. Zymel, Αθήνα.
24. ΠερδικάτσηςΒ., 2003. Αναλυτική Περιβαλλοντική Γεωχημεία. Πολυτεχνείο Κρήτης.
25. Kumar A., Bisht B. S., Joshi V. D., and Dhewa T., “Review on Bioremediation of Polluted Environment : A Management Tool,” vol. 1, no. 6, pp. 1079–1093, 2011.
26. Weyens N., Beckers B., Schellingen K., Ceulemans R., Croes S., Janssen J., Haenen S. , Witters N., and Vangronsveld J., “Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a field-related experiment.,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 288–99, May 2013.

27. Naik M. M. and Dubey S. K., "Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring.," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 98, pp. 1–7, Dec. 2013.
28. Vidali M., "Bioremediation. An overview," *Pure Appl. Chem.*, vol. 73, no. 7, pp. 1163–1172, 2001.
29. Agarry S. E., Aremu M. O., and Aworanti O. a., "Biostimulation and Phytoremediation Treatment Strategies of Gasoline-Nickel Co-Contaminated Soil," *Soil Sediment Contam. An Int. J.*, vol. 23, no. 3, pp. 227–244, Jan. 2014.