ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

ΠΑΤΩΝΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

ΠΑΤΩΝΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΧΑΝΙΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2005

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : Καθ. Ν. Καλογεράκης
Καθ. Ε. Διαμαντόπουλος
Αναπλ. Καθ. Ε. Κατσίβελα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της συγγραφής αυτής της εργασίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τον τίτλο «Έλεγχος Ποιότητας και Διαχείριση Περιβάλλοντος» του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης που βρίσκεται στα Χανιά Κρήτης, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου σε όσους συνέβαλλαν στην μέχρι τώρα πορεία μου και μου έδειξαν εμπιστοσύνη και συμπαράσταση ακόμη και σε δύσκολες συνθήκες.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω των Καθηγητή Καλογεράκη Ν., ο οποίος είναι διευθυντής του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Βιοτεχνολογίας, πρόεδρος του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος το έτος 2005 και επιστημονικός υπεύθυνος πολλών ευρωπαϊκών προγραμμάτων, για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτό το θέμα και υποστηρίζοντας την πρόοδό μου στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας με την συμμετοχή μου στο ερευνητικό πρόγραμμα με τον τομέα Βιοαποικοδόμησης του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογίας GBF, στο Braunsweig της Γερμανίας.

Στα πλαίσια της συνεργασίας με το εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του GBF θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Dietmar Pieper, τον επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου για την αποδοχή και τον συμβουλευτικό ρόλο στην πραγματοποίηση της εργασίας, της εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο καθώς και για την διαμονή μου εκεί. Θα ήθελα επίσης να συγχαρώ τον ίδιο και τους συνεργάτες του για το εξαίρετο κλίμα συνεργασίας και σταθερότητας που επικρατεί ώστε να έχει καταφέρει να συντονίσει τόσους επιστήμονες απ΄ όλο τον κόσμο με τον πιο φυσιολογικό τρόπο.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Howard Junca, μεταδιδακτορικό επιστημονικό συνεργάτη στο τμήμα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του GBF. Στον κ. Junca οφείλεται η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας καθώς ο ίδιος ανέλαβε την μύησή μου στις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας και στη γενικότερη λειτουργία στο χώρο του εργαστηρίου. Με πολλή υπομονή και διακριτικότητα καθοδήγησε την πρόοδό μου βήμα προς βήμα, δημιουργώντας το ιδανικό κλίμα συνεργασίας και θέτοντας τις βάσεις και για μελλοντική συνεργασία.

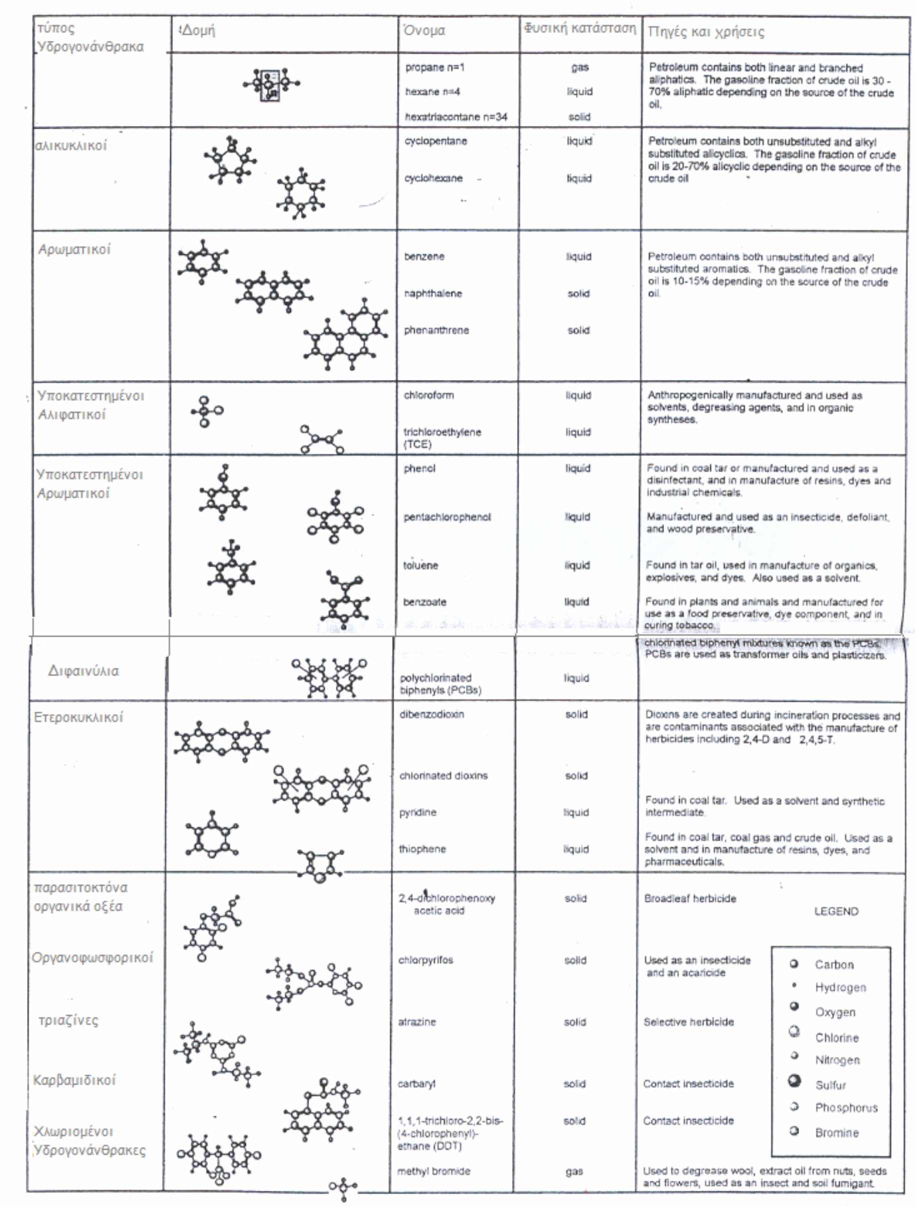
Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Δρ Κατσίβελα Ελευθερία, αναπλ. Καθ. Του ΤΕΙ Κρήτης για την αποδοχή και υποστήριξη που δέχθηκα από μέρους της καθώς και τις συμβουλές και τις απαραίτητες πληροφορίες για την συγγραφή της παρούσας εργασίας, εφόσον αυτή η εργασία είναι η συνέχεια προηγούμενων αποτελεσμάτων.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του GBF Γερμανίας στα πλαίσια της διακρατικής συμφωνίας Ελλάδας – Γερμανίας 2003-2004 (9513514). Το τμήμα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας χρηματοδότησε στο σύνολο της αυτή την εργασία και γι' αυτό ευχαριστώ ιδιαίτερα. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές και τους εργαζόμενους στο τμήμα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του GBF Γερμανίας τόσο για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον και την φιλοξενία στο εργαστήριο όσο και για την συμπαράσταση σε δύσκολες στιγμές ατυχίας κατά την παραμονή μου στη Γερμανία, δημιουργώντας τις καλύτερες εντυπώσεις και αναμνήσεις.

Με την συγγραφή της εργασίας αυτής ολοκληρώνεται το μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Έλεγχος Ποιότητας και Διαχείριση Περιβάλλοντος» και οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις συμφοιτήτριες και φίλες Βελεγράκη Θ., Γιαννιού Α., Πατσιούρα Α. και Σκαπέτη Ε. για την συμπαράσταση και την εμψύχωση.

Για επίλογο θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με πολλή αγάπη, υπομονή και συμπαράσταση στέκεται και στηρίζει με αξιοπρέπεια τις επιλογές μου όλα αυτά τα χρόνια, και ιδιαίτερα την μητέρα μου που μου έχει εμφυσήσει το δραστήριο και ανήσυχο πνεύμα της και τον πατέρα μου, υπόδειγμα μεθοδικότητας, για την παροχή ψυχικής ισορροπίας αλλά και υλικών αγαθών που είναι τόσο ουσιώδη για οποιαδήποτε πρόοδο…

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ



τύπος Υδρογονάνθρακα	Δομή	Όνομα	Φυσική κατάσταση	Πηγές και χρήσεις
		propane n=1 hexane n=4 hexatriacontane n=34	gas liquid solid	Petroleum contains both linear and branched aliphatics. The gasoline fraction of crude oil is 30 - 70% aliphatic depending on the source of the crude oil.
αλικυκλικοί		cyclopentane cyclohexane	liquid liquid	Petroleum contains both unsubstituted and alkyl substituted alicyclics. The gasoline fraction of crude oil is 20-70% alicyclic depending on the source of the crude oil
Αρωματικοί		benzene naphthalene phenanthrene	liquid solid solid	Petroleum contains both unsubstituted and alkyl substituted aromatics. The gasoline fraction of crude oil is 10-15% depending on the source of the crude oil.
Υποκατεστημένοι Αλιφατικοί		chloroform trichloroethylene (TCE)	liquid liquid	Anthropogenically manufactured and used as solvents, degreasing agents, and in organic syntheses.
Υποκατεστημένοι Αρωματικοί		phenol	liquid	Found in coal tar or manufactured and used as a disinfectant, and in manufacture of resins, dyes and industrial chemicals.
		pentachlorophenol	liquid	Manufactured and used as an insecticide, defoliant, and wood preservative.
		toluene	liquid	Found in tar oil, used in manufacture of organics, explosives, and dyes. Also used as a solvent.
		benzoate	liquid	Found in plants and animals and manufactured for use as a food preservative, dye component, and in curing tobacco.
Διφαινύλια		polychlorinated biphenyls (PCBs)	liquid	chlorinated biphenyl mixtures known as the PCBs. PCBs are used as transformer oils and plasticizers.
Ετεροκυκλικοί		dibenzodioxin	solid	Dioxins are created during incineration processes and are contaminants associated with the manufacture of herbicides including 2,4-D and 2,4,5-T.
		chlorinated dioxins	solid	
		pyridine	liquid	Found in coal tar. Used as a solvent and synthetic intermediate.
		thiophene	liquid	Found in coal tar, coal gas and crude oil. Used as a solvent and in manufacture of resins, dyes, and pharmaceuticals.
παρασιτοκτόνα οργανικά οξέα		2,4-dichlorophenoxy acetic acid	solid	Broadleaf herbicide
Οργανοφωσφορικοί		chlorpyrifos	solid	Used as an insecticide and an acaricide
τριαζίνες		atrazine	solid	Selective herbicide
Καρβαμιδικοί		carbaryl	solid	Contact insecticide
Χλωριομένοι Υδρογονάνθρακες		1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)-ethane (DDT)	solid	Contact insecticide
		methyl bromide	gas	Used to degrease wool, extract oil from nuts, seeds and flowers, used as an insect and soil fumigant.

Περίληψη

Η χρήση των τεχνικών της μοριακής βιολογίας για την μελέτη και την διαλεύκανση των μηχανισμών αποικοδόμησης προϊόντων επεξεργασίας πετρελαίου από μικροοργανισμούς του εδάφους, βρίσκει εφαρμογή στο καινούριο σχετικά χώρο της βιοεξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών. Τεχνικές όπως η εκχύλιση ολικού γονιδιώματος από ρυπασμένα με υδρογονάνθρακες δείγματα εδάφους, ο πολλαπλασιασμός με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) καταβολικών γονιδίων και ο προσδιορισμός των αποικοδομούντων μικροοργανισμών εξυπηρετούν τους σκοπούς της παρούσας μελέτης. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά τον χαρακτηρισμό πληθυσμών μικροβίων που υπάρχουν σε πετρελαϊκά απόβλητα τα οποία εναποτίθενται σε οριοθετημένες εδαφικές περιοχές. Η διεργασία που επιτελείται, καλείται Landfarming και σύμφωνα με την οποία συμβαίνει βιοαποικοδόμηση των ρύπων που οφείλεται τόσο στην δράση των μικροοργανισμών όσο και σε αβιοτικά φαινόμενα εξάτμισης, φωτοοξύδωσης και προσρόφησης στο έδαφος χωρίς καμία άλλη ανθρωπογενή επέμβαση.

Τα μικροβιακά καταβολικά γονίδια είναι ιδιαίτερα ευκίνητα, πράγμα που συνεισφέρει στην γρήγορη προσαρμογή των μικροβίων σ' ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Στο γεγονός αυτό βασίζεται η βιοαποκατάσταση (bioremediation) ρυπασμένων εδαφών με τη χρήση χρήση μικροοργανισμών. Η μελέτη της εξέλιξης των καταβολικών γονιδίων θεωρείται βιολογικό εργαλείο στην κατανόηση της λειτουργίας της βιοαποικοδόμησης.

Η παρούσα εργασία είχε σκοπό την αναγνώριση των κυριότερων βακτηρίων που επιβιώνουν στη πετρελαϊκή λάσπη, καθώς και την απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις αποικοδόμησης και γι' αυτό τον λόγο συμβάλλει στην κατανόηση των συστημάτων αυτών.

Στα εξεταστέντα δείγματα ταυτοποιήθηκε το γονίδιο της μονοξυγενάσης των αλκανίων, ή αλλιώς ονομαζόμενης υδροξυλάσης των αλκανίων, δημιουργήθηκαν νέοι εκκινητές του γονίδιου αυτού, και τελικά προσδιορίστηκε το βακτήριο που κυριαρχεί στους μικροβιακούς πληθυσμούς επιβίωσης στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την landfarm περιοχή των διυλιστηρίων της Motor Oil στην Κόρινθο. Το κυρίαρχο ποσοστό 44% επί του συνόλου της

μικροβιακής κοινότητας στην πετρελαϊκή λάσπη είναι ένα πολύ συγγενικό είδος με το θαλάσσιο βακτήριο *Dietzia maris* που αποικοδομεί γραμμικά αλκάνια.

Abstract

The use of molecular biology techniques for the study and clarification of degradation mechanisms of petroleum refinery products by soil microorganisms, is established in the relatively new area of bioremediation of polluted soils. Extraction of genomic DNA hydrocarbon polluted soil samples, PCR amplification of catabolic genes for the purpose of isolation and characterization of responsible microorganisms, serves the goals of the present study. The present study is a thesis which concerns microbial populations existing in petroleum waste sludge which are dispersed in limited soil areas. According to the procedure that takes place, known as Landfarming, biodegradation of pollutants is atributed to the action of bacteria as well as abiotic phenomena such as evaporation, photo-oxidation processes and sorption into the soil particles with no further anthropological treatment.

Microbial catabolic genes are highly mobile, which contributes to their rapid adaptation to the changing environment. Bioremediation of polluted soils through the use of microbes is based on this fact for our responses to environmental pollution for the use of .The study of catabolic genes' evolution is considered a biological tool towards our understanding of how biodegradation functions.

This present study's goal is the recognition of the most abundant surviving microorganisms in tthe petroleum waste sludge, and the isolation of genes that code for enzymes catalyzing degradation reactions, and thus it contributes to the understanding of these systems.

In the samples under study the gene of alkane monoxygenase, or otherwise known as alkane hydroxylation, was recognized, new primers for this gene were designed, and finally the bacterium that dominates the surviving populations was identified in these samples that where collected from the landfarms of the petroleum refinery of Motor Oil in Korinthos. The bacterium that dominated the microbial community in the waste sludge by 44% is very closely related to the marine bacterium *Dietzia maris* which degrades linear alkanes.

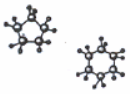
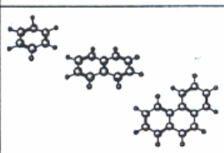
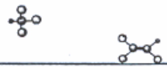
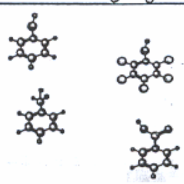
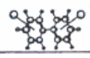
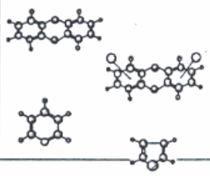
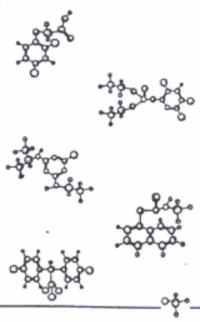
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πάνω από 1600 οργανικές ενώσεις έχουν διαπιστωθεί ότι βρίσκονται σε φυσικά οικοσυστήματα ή ρυπασμένες περιοχές. Γενικά οι ρύποι προέρχονται κυρίως από προϊόντα πετρελαίου, προϊόντα καύσης ενεργειακών πόρων, χλωριωμένους ή μη οργανικούς διαλύτες, και από την επεξεργασία πρώτων υλών σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες.

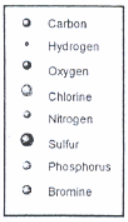
Το πετρέλαιο και οι υδρογονάνθρακες είναι ζωτικής σημασίας πηγή ενέργειας την οποία χρησιμοποιούμε στην εποχή μας τόσο στην βιομηχανία όσο και στην καθημερινή μας ζωή. Ταυτόχρονα το πετρέλαιο είναι σημαντικός ρύπος του περιβάλλοντος τόσο του χερσαίου αλλά και του θαλάσσιου. Πολλά ατυχήματα έχουν αναφερθεί να απελευθερώνουν στο περιβάλλον τεράστιες ποσότητες πετρελαίου στο περιβάλλον διαταράσσοντας την χλωρίδα και την πανίδα της περιοχής προκαλώντας σοβαρό οικολογικό πρόβλημα το οποίο απαιτεί άμεση επέμβαση για την αποκατάσταση όσο είναι αυτό δυνατόν του περιβάλλοντος. (8)

Η παγκόσμια παραγωγή αργού πετρελαίου είναι μεγαλύτερη από 2 $X10^9$ m^3/year. Συχνά έχουμε ρύπανση υδατικών και χερσαίων οικοσυστημάτων από πετρελαιοειδή. Η διάθεση μικρών ποσοτήτων στην καθημερινή ζωή στο περιβάλλον καλύπτει περίπου το 90 % του συνολικού ποσού που διατίθεται στο περιβάλλον, όπως λιπαντικά λάδια των μηχανών των αυτοκινήτων (πίνακας 0.Ι Α παράρτημα) (43), υπολείμματα επεξεργασίας πετρελαίου από βιομηχανίες διύλισης πετρελαίου ή και άλλες. Το άλλο 10% προέρχεται από ατυχήματα.(4)

Πίνακας1.Ι Κύριοι Οργανικοί Υδρογονάνθρακες, Δομή, Όνομα, Φυσική Κατάσταση, Πηγές και Χρήσεις

τύπος Υδρογονάνθρακα	Δομή	Όνομα	Φυσική κατάσταση	Πηγές και χρήσεις
		propane n=1	gas	Petroleum contains both linear and branched aliphatics. The gasoline fraction of crude oil is 30 - 70% aliphatic depending on the source of the crude oil.
		hexane n=4	liquid	
		hexatriacontane n=34	solid	
αλικυκλικοί		cyclopentane	liquid	Petroleum contains both unsubstituted and alkyl substituted alicyclics. The gasoline fraction of crude oil is 20-70% alicyclic depending on the source of the crude oil
		cyclohexane	liquid	
Αρωματικοί		benzene	liquid	Petroleum contains both unsubstituted and alkyl substituted aromatics. The gasoline fraction of crude oil is 10-15% depending on the source of the crude oil.
		naphthalene	solid	
		phenanthrene	solid	
Υποκατεστημένοι Αλιφατικοί		chloroform	liquid	Anthropogenically manufactured and used as solvents, degreasing agents, and in organic syntheses.
		trichloroethylene (TCE)	liquid	
Υποκατεστημένοι Αρωματικοί		phenol	liquid	Found in coal tar or manufactured and used as a disinfectant, and in manufacture of resins, dyes and industrial chemicals.
		pentachlorophenol	liquid	Manufactured and used as an insecticide, defoliant, and wood preservative.
		toluene	liquid	Found in tar oil, used in manufacture of organics, explosives, and dyes. Also used as a solvent.
		benzoate	liquid	Found in plants and animals and manufactured for use as a food preservative, dye component, and in curing tobacco.
Διφαινύλια		polychlorinated biphenyls (PCBs)	liquid	chlorinated biphenyl mixtures known as the PCBs. PCBs are used as transformer oils and plasticizers.
Ετεροκυκλικοί		dibenzodioxin	solid	Dioxins are created during incineration processes and are contaminants associated with the manufacture of herbicides including 2,4-D and 2,4,5-T.
		chlorinated dioxins	solid	
		pyridine	liquid	Found in coal tar. Used as a solvent and synthetic intermediate.
		thiophene	liquid	Found in coal tar, coal gas and crude oil. Used as a solvent and in manufacture of resins, dyes, and pharmaceuticals.
παρασιτοκτόνα οργανικά οξέα		2,4-dichlorophenoxy acetic acid	solid	Broadleaf herbicide
Οργανοφωσφορικοί		chlorpyrifos	solid	Used as an insecticide and an acaricide
τριαζίνες		atrazine	solid	Selective herbicide
Καρβαμιδικοί		carbaryl	solid	Contact insecticide
Χλωριομένοι Υδρογονάνθρακες		1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)-ethane (DDT)	solid	Contact insecticide
		methyl bromide	gas	Used to degrease wool, extract oil from nuts, seeds and flowers, used as an insect and soil fumigant.

LEGEND



1.1 ΠΗΓΕΣ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.1.1. Πετρέλαιο

Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο ή μαζούτ, είναι ένα κολλώδες, σκούρο πρασινοκαφέ μείγμα πολλών χημικών ενώσεων. Οι περισσότερες από αυτές τις χημικές ενώσεις είναι υδρογονάνθρακες, με μακριά αλυσίδα άνθρακα και υδρογόνου. Αποτελεί ένα πολύτιμο προϊόν αλλά και έναν από τους πιο πλατιά διαδεδομένους θαλάσσιους ρύπους.

Τα περισσότερα από τα συστατικά του πετρελαίου είναι αδιάλυτα στο νερό και επιπλέουν στην επιφάνειά του. Μερικά από τα ελαφρότερα συστατικά του πετρελαίου εξατμίζονται και τα υπόλοιπα τελικά αποικοδομούνται από τα βακτήρια. Το πετρέλαιο λέγεται ότι είναι τελείως βιοδιασπώμενο, επειδή, αν και με πολύ αργό ρυθμό, αποικοδομείται τελείως από τα βακτήρια. Μερικά από τα συστατικά του πετρελαίου βυθίζονται και συσσωρεύονται στα ιζήματα, ιδιαίτερα μετά την εξάτμιση των πιο ελαφριών συστατικών. Τα επιπλέοντα συστατικά του πετρελαίου ή μπάλες πίσσας εμφανίζονται πολύ στην υδάτινη επιφάνεια, κατά μήκος των οδών ναυσιπλοΐας που διασχίζουν τις θάλασσες. Μπορεί να μείνουν για χρόνια στο νερό και έχουν παρατηρηθεί και σε περιοχές μακριά από τις οδούς κυκλοφορίας των πλοίων. Επάνω σε μπάλες από πίσσα έχουν βρεθεί να κατοικούν βαλανοειδή. (10)

Τα αλκάνια αποτελούν το 20 – 25% του αργού πετρελαίου. Παράγονται με γεωχημικές διεργασίες από την αποδόμηση φυτών και αλγών, και καταλήγουν στο περιβάλλον από φυσικές πετρελαϊκές διαρροές και ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως διαρροές και απορροές εξαιτίας της διασποράς των πηγών.

Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές όπου με πειράματα αποικοδόμησης μιγμάτων με συστατικά του πετρελαίου φαίνεται ότι τα ν – αλκάνια είναι αυτά που βιοαποικοδομούνται πιο εύκολα, από 9 ως 22 άτομα άνθρακα, έπειτα ακολουθούν τα διακλαδισμένα τα οποία είναι πιο δύσκολα να διασπαστούν καθώς επίσης και τα αλκάνια με περισσότερα από 23 άτομα άνθρακα.(25)

Η βιομηχανία πετρελαίου άρχισε με την επιτυχή διάτρηση της πρώτης εμπορικής πετρελαιοπηγής το 1859, και το άνοιγμα των πρώτων εγκαταστάσεων καθαρισμού δύο έτη αργότερα για την επεξεργασία του ακατέργαστου πετρελαίου σε κηροζίνη (πίνακας 0-ΙΒ παράρτημα).

Η εξέλιξη του καθαρισμού πετρελαίου από την απλή απόσταξη στις σημερινές περίπλοκες διαδικασίες έχει δημιουργήσει την ανάγκη για την ύπαρξη μηχανισμών διαχείρισης της ασφάλειας και της υγείας καθώς και την διασφάλιση της ασφαλούς εργατικής πρακτικής. Ο καθαρισμός είναι η επεξεργασία ενός σύνθετου μίγματος υδρογονανθράκων σε διάφορα άλλα σύνθετα μίγματα υδρογονανθράκων (19). Η διαδικασία αυτή έχει υποπροϊόντα μη εμπορεύσιμα, άχρηστα υπολείμματα διύλισης πετρελαίου, τα οποία περιέχουν μίγματα υδρογονανθράκων με 11 – 34 άτομα άνθρακα (3).

Το ακατέργαστο πετρέλαιο είναι ένα μίγμα μορίων υδρογονανθράκων, τα οποία είναι οργανικές ενώσεις των ατόμων άνθρακα και υδρογόνου που μπορούν να περιλάβουν από ένα έως 60 άτομα άνθρακα. Οι ιδιότητες των υδρογονανθράκων εξαρτώνται από τον αριθμό και τη διευθέτηση των ατόμων άνθρακα και υδρογόνου στα μόρια. Το απλούστερο μόριο υδρογονανθράκων είναι το μεθάνιο. Όλες οι άλλες παραλλαγές των υδρογονανθράκων πετρελαίου προέρχονται από αυτό το μόριο.

Οι υδρογονάνθρακες που περιέχουν μέχρι τέσσερα άτομα άνθρακα είναι συνήθως αέρια, εκείνοι με 5 έως 19 άτομα άνθρακα είναι συνήθως υγρά, και εκείνοι με 20 ή περισσότερα είναι στερεά. Η διαδικασία καθαρισμού χρησιμοποιεί χημικές ουσίες, καταλύτες, θερμότητα, και πίεση για να χωριστούν και να συνδυαστούν οι βασικοί τύποι μορίων υδρογονανθράκων που βρίσκονται φυσικά στο ακατέργαστο πετρέλαιο στις ομάδες παρόμοιων μορίων. Η διαδικασία καθαρισμού προκαλεί αλλαγές στις δομές και τους τρόπους σύνδεσης των αρχικών ενώσεων προκύπτοντας με αυτόν τον τρόπο νέα μόρια και ενώσεις υδρογονανθράκων.

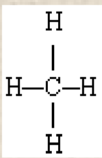
Υπάρχουν τρεις κύριες ομάδες ή σειρές ενώσεων υδρογονανθράκων που εμφανίζονται στο ακατέργαστο πετρέλαιο.

Α. Παραφίνες: Είναι ενώσεις υδρογονανθράκων που βρίσκονται στο ακατέργαστο πετρέλαιο και έχουν το γενικό τύπο C_nH_{2n+2} και μπορούν να είναι είτε ευθείες αλυσίδες (κανονικές) είτε διακλαδισμένες αλυσίδες (ισομερή) των ατόμων άνθρακα (εικόνα 1.I). Τα ελαφρύτερα, straight-chain μόρια παραφίνης βρίσκονται στα αέρια και τα κεριά παραφίνης. Παραδείγματα των straight-chain μορίων είναι μεθάνιο, αιθάνιο, προπάνιο, και βουτάνιο (αέρια που περιέχουν από ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα), και πεντάνιο και εξάνιο (υγρά με πέντε έως έξι άτομα άνθρακα). Οι παραφίνες με διακλαδισμένες αλυσίδες (ισομερών) βρίσκονται συνήθως στα βαρύτερα μέρη του ακατέργαστου πετρελαίου και έχουν τους υψηλότερους αριθμούς οκτανίου από τις κανονικές παραφίνες. Αυτές οι ενώσεις είναι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (Εικόνα 1-I).

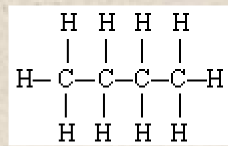
Example of simplest HC molecule (CH_4):

Examples of straight chain paraffin molecule (Butane) and branched paraffin molecule (Isobutane) with same chemical formula (C_4H_{10}):

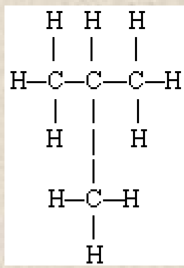
METHANE (CH_4)



BUTANE (C_4H_{10})



ISOBUTANE (C_4H_{10})

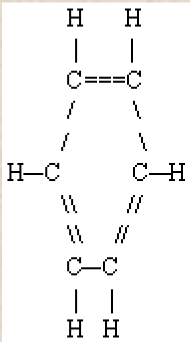


Εικόνα 1- Ι Μεθάνιο, Βουτάνιο, Ισοβουτάνιο

Β. Οι αρωματικές ουσίες είναι ακόρεστες κυκλικές (ενώσεις τύπου- δαχτυλιδιού) που αντιδρούν εύκολα επειδή έχουν τα ακόρεστα άτομα άνθρακα. Όλες οι αρωματικές ουσίες έχουν τουλάχιστον έναν δακτύλιο βενζολίου (εικόνα 1.ΙΙ) ως τμήμα της μοριακής δομής τους. Οι ναφθαλίνες είναι ενωμένες αρωματικές ενώσεις διπλών-δακτυλίων. Οι πιο σύνθετες αρωματικές ουσίες, πολυπυρηνικές (τρεις ή περισσότεροι ενωμένοι αρωματικοί δακτύλιοι), οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) βρίσκονται στα βαρύτερα μέρη του ακατέργαστου πετρελαίου (εικόνα 1.ΙΙ).

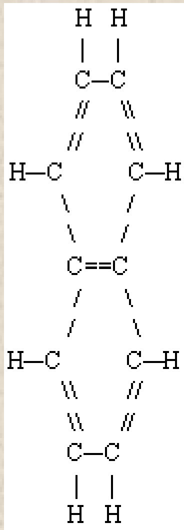
Example of simple aromatic compound:

BENZENE (C_6H_6)



Examples of simple double-ring aromatic compound:

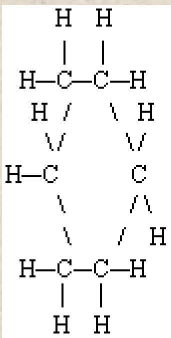
NAPTHALENE ($C_{10}H_8$)



Εικόνα 1- ΙΙ Βενζόλιο, Ναφθαλένιο

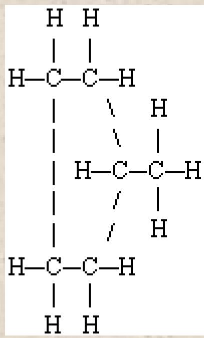
Example of typical single-ring naphthene:

CYCLOHEXANE (C_6H_{12})



Examples of naphthene with same chemical formula (C_6H_{12}) but different molecular structure:

METHYL CYCLOPENTANE (C_6H_{12})



Εικόνα 1- ΙΙΙ Κυκλοεξάνιο, Μέθυλοκυκλοεξάνιο

Γ. (Naphthenes) Τα ναφθένια είναι διαποτισμένοι σχηματισμοί ομάδας υδρογονανθράκων με το γενικό τύπο CnH2n, που διευθετούνται υπό μορφή κλειστών δαχτυλιδιών (κυκλικών) και που βρίσκονται σε όλα τα μέρη του ακατέργαστου πετρελαίου εκτός από πολύ το ελαφρύτερο. Οι μονοκυκλοπαραφίνες (monocycloparaffins) με πέντε και έξι άτομα άνθρακα υπερισχύουν των παραφινών με δυο δακτυλίους (dicycloparaffins) που βρίσκονται στα βαρύτερεα κλάσματα της νάφθας (εικόνα 1-ΙΙΙ). (19)

1.1.2. Ζωντανοί οργανισμοί

Μια πιθανώς μεγαλύτερη ποσότητα υδρογονανθράκων (όπου κυριαρχούν υψηλού μοριακού βάρους γραμμικά συστατικά) έχει αναφερθεί ότι παράγεται σε όλη την έκταση της βιόσφαιρας από ζωντανούς οργανισμούς (φυτά, ζώα ζωοπλαγκτόν και βακτήρια). Οι υδρογονάνθρακες στις παραπάνω περιπτώσεις εξυπηρετούν κάποιο σκοπό στους οργανισμούς που τα παράγουν δρώντας ως δομικά συστατικά, παρεμποδιστικά εξάτμισης, ως χημειοελκυστικά συστατικά, συμμετέχοντας στον μηχανισμό άμυνας, ή αποβάλλονται στο περιβάλλον ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Συνεπώς αυτά τα συστατικά αποτελούν αξιόπιστες πηγές άνθρακα και ενέργειας για άλλους μικροοργανισμούς. Από τη στιγμή που τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται στο περιβάλλον αρχίζει ο μετασχηματισμός τους από τους μικροοργανισμούς και η μικροβιακή αποδόμηση θεωρείται ο πιο σημαντικός μηχανισμός διάσπασης αυτών των μορίων.

Οι μικροοργανισμοί που αναφέρονται ως αποικοδομητές των συστατικών αυτών συχνά ανήκουν σε διαφορετικά γένη που ανήκουν σε υψηλού και χαμηλού (G+C) Gram θετικών, και α, β, και γ Πρωτεοβακτήρια. Συχνά αναφερόμενα γένη είναι: Mycobacterium, Rhodococcus (8,25,45) , Bacillus, Dietzia (24), Acinetobacter, Ochrobacter (1), Enterobacter (1), Alcaligenes (3), Nocardioides sp. (29) Mycobacterium, Corynebacterium, Gordona (45), Pseudomonas (20,28). Ιδιαίτερα το τελευταίο έχει παίξει πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλές μελέτες σχετικά με την βιοαποικοδόμηση αλκανίων και πετρελαίου, καθώς όλες οι σειρές των ψευδομονάδων περιλαμβάνουν είδη που αποδομούν αλκάνια.(8)

1.2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Ο όρος βιοαποικοδόμηση αναφέρεται στην δράση των ζωντανών οργανισμών στη διάσπαση και τελική μετατροπή ουσιών στα δομικά συστατικά τους. Οι ουσίες αυτές που υπόκεινται σε διάσπαση μπορεί να προέρχονται από οποιαδήποτε πηγή, νεκρή βιομάζα, ανθρωπογενείς εναποθέσεις ουσιών κ.ά. Οι οργανισμοί που λαμβάνουν μέρος σ’ αυτές τις διεργασίες ανήκουν στο βασίλειο των φυτών, των ζώων, των μυκήτων, των βακτηρίων και των αρχαίων.

Η ικανότητα αυτή των οργανισμών χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια στην αποκατάσταση του περιβάλλοντος και με αυτό τον σκοπό έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και στρατηγικές για την βιοεξυγίανση εδαφών και υδάτων, καθώς οι τεχνολογίες αυτές είναι πιο οικονομικές και κατά περιπτώσεις πιο αποτελεσματικές.

Βιο-αποκατάσταση περιβάλλοντος, βιοεξυγίανση (Bioremediation), ορίζεται η απορρύπανση του περιβάλλοντος, κυρίως των υπόγειων υδάτων και του εδάφους, με βιολογικές διεργασίες, με την χρήση μικροοργανισμών σαν βιοκαταλύτες. Οι βιοχημικές αντιδράσεις μετατροπής των ρύπων λαμβάνουν χώρα στις ρυπασμένες περιοχές χωρίς τη δική μας παρέμβαση, αλλά συνήθως ο ρυθμός τους είναι εξαιρετικά αργός λόγω έλλειψης θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου ή ακόμα και εξειδικευμένων μικροοργανισμών.(4)

Μηχανική βιοεξυγίανση ονομάζουμε την τεχνική αύξησης του ρυθμού φυσικής βιοδιάσπασης των ρύπων (π.χ. του πετρελαίου) με την παρέμβαση του ανθρώπου. Αυτή μπορεί να λάβει δυο μορφές: Biostimulation και Bio-augmentation.

Η πρώτη βασίζεται στο γεγονός ότι υπάρχουν πάντα μικροοργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν τον ρύπο, π.χ. το πετρέλαιο, αλλά στην ρυπασμένη περιοχή δεν έχουμε την ιδανική αναλογία θρεπτικών συστατικών ικανών να υποστηρίξουν την αύξηση των επιθυμητών αποικοδομητών, όπως σε μια πετρελαιοκηλίδα έχουμε μεγάλη ποσότητα άνθρακα χωρίς τις απαιτούμενες ποσότητες αζώτου και φωσφόρου. Biostimulation είναι η προσθήκη λιπασμάτων ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμενη σχέση C:N:P, για την ανάπτυξη των αποικοδομητών.

Στην περίπτωση της Bio-augmentation γίνεται προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διασπούν τους ρύπους (τα πετρελαιοειδή) και λόγω του υψηλού αριθμού των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται ένας υψηλότερος βαθμός βιοδιάσπασης.(4)

Οι βιολογικές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί διαχωρίζονται σε ex situ και in situ. Με τον όρο in situ εννοούμε την επί τόπου χρήση βιολογικών διεργασιών για τον καθαρισμό ενώσεων που βρίσκονται στο υπέδαφος. Σε αυτήν την περίπτωση έχουμε την τεχνική καλλιέργειας ρυπασμένου χώματος (Landfarming). Είναι επίσης γνωστή και ως τεχνική επεξεργασίας στερεής φάσης ή τεχνική επεξεργασίας χωμάτων. Πρόκειται για ένα από τα απλούστερα συστήματα επεξεργασίας τοξικών και επικίνδυνων στερεών αποβλήτων. Τα στερεά απόβλητα, ή το ρυπασμένο χώμα, αναμειγνύονται με καθαρό χώμα το οποίο ανακατεύεται μηχανικά για να επιτευχθεί καλή οξυγόνωση και να διατηρηθούν αερόβιες συνθήκες.(4)

Ο όρος ex situ αναφέρεται στην εκσκαφή και επεξεργασία του ρυπασμένου χώματος σε βιοαντιδραστήρες.

1.2.1 Έδαφος

Το έδαφος είναι ένα πολύπλοκο σύστημα, όπου συμβαίνουν πολλές διεργασίες και υπάρχει δυσκολία κατά την μελέτη και την παρακολούθησή τους. Οι ιδιότητες του εδάφους που παίζουν σημαντικό ρόλο στην συμπεριφορά του σε όλο το οικολογικό σύστημα και συνεπώς καθορίζουν την ποικιλότητα και την επιβίωση των οργανισμών είναι : η μηχανική σύστασή [1] του, το πορώδες[2], το pH[3] του εδάφους ή ρυθμιστική ικανότητα, η περιεχόμενη οργανική ύλη. Πρόκειται για παράγοντες που ελέγχουν και καθορίζουν τη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος χώρου, μέσω της ρύθμισης και συγκράτησης της υγρασίας, του αερισμού των εδαφικών πόρων, τη συγκράτηση ουσιών στα κολλοειδή του εδάφους μέσω της χημικής αντίδρασης, τη συγκράτηση σε διαλυμένη ή προσροφημένη μορφή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (31).

Σημαντικοί επίσης παράγοντες είναι οι επικρατούσες κλιματικές συνθήκες, οι βροχοπτώσεις, το ετήσιο θερμοκρασιακό εύρος, η ηλιοφάνεια. Οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν την βιοποικιλότητα του συστήματος καθώς επηρεάζουν έμμεσα και άμεσα το μικροπεριβάλλον στο οποίο διαβιούν οι οργανισμοί και επιδρούν στην δραστηριότητά τους, την αύξηση (ευδοκίμηση) και την εξάπλωση (επικράτηση κάποιων εις βάρος κάποιων άλλων).

Σε όλα τα παραπάνω πρέπει να προστεθεί και ο παράγοντας του βάθους/ύψους όπου βρίσκεται ο μικροβιότοπος που μελετάμε, καθώς οι προαναφερθέντες παράγοντες συμμετέχουν σε

---

[1] Η μηχανική σύσταση του εδάφους αναφέρεται στις σχετικές αναλογίες των συστατικών (άμμου, ιλύος, αργίλου)ενός εδάφους. (31)

[2] Πορώδες ενός εδάφους καλούμε το επί τοις εκατό ποσοστό του όγκου του εδάφους, που βρίσκεται σε φυσική κατάσταση και καταλαμβάνεται από πόρους που σχηματίζονται μεταξύ των στερεών συστατικών του εδάφους. Οι πόροι του εδάφους καταλαμβάνονται από την αέρια και την υγρή φάση. Το πορώδες εξαρτάται από τη διάταξη των εδαφικών συσσωματωμάτων.(31)

[3] Το pH του εδάφους παίζει σπουδαίο ρόλο στην δράση των μικροοργανισμών, ρυθμίζοντας τον πληθυσμό τους. Η βέλτιστη τιμή στο έδαφος για τα βακτήρια κυμαίνεται μεταξύ 5.5 και 9, για τους μύκητες μεταξύ 4 και 6 και για τους ακτινομύκητες μεταξύ 5 και 9 (31)

διαφορετικό ποσοστό και συνεπώς η σημαντικότητα του καθενός διαφέρει. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση των κλιματικών συνθηκών επιδρά περισσότερο την επιφάνεια του εδάφους και η επίδρασή τους μειώνεται όσο προχωρούμε σε βάθος στο εδαφικό προφίλ, μέχρι ένα σημείο όπου πλέον οι καιρικές συνθήκες δεν επιδρούν καθόλου άμεσα[4] και οι συνθήκες παραμένουν σταθερές. Στην επιφάνεια όμως του εδάφους, το σύστημα είναι αρκετά πολύπλοκο καθώς υπόκειται στις ημερήσιες αλλαγές της ατμόσφαιρας.

1.2.1.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την βιοαποικοδόμηση στο έδαφος από μικροοργανισμούς είναι η περιεχόμενη οργανική ύλη, η πρωταρχική δηλαδή πηγή άνθρακα.

Η παρουσία και η αφθονία των μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον καθορίζεται όχι μόνο από τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα αλλά και από πλήθος άλλων φυσικο-χημικών παραγόντων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, των θρεπτικών συστατικών, τη θερμοκρασία (25), το pH, την αλατότητα (24,25) και το υδατικό δυναμικό. Η βιοαποικοδόμηση μπορεί να παρεμποδιστεί όταν ένας από τους παραπάνω παράγοντες γίνει περιοριστικός. Ωστόσο η αιτία της εμμονής ενός ρύπου σ' ένα περιβάλλον είναι δύσκολο να καθοριστεί. Ίσως από τους πιο σημαντικούς παράγοντες είναι το οξυγόνο, η οργανική ύλη, η διαθεσιμότητα του αζώτου καθώς και η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου. Οι τρεις πρώτοι παράγοντες διαφοροποιούνται σημαντικά με βάση την τοποθεσία του ρύπου, σε επιφανειακό έδαφος, στην υποεπιφανειακή ακόρεστη ζώνη ή στην υποεπιφανειακή κορεσμένη ζώνη.

Συνεπώς μπορεί να γενικευτεί ότι η βιοαποικοδόμηση στην επιφάνεια του εδάφους είναι πρωταρχικά αερόβια και γρήγορα, στην υποεπιφανειακή ακόρεστη ζώνη είναι επίσης αερόβια πρωταρχικά αλλά ίσως είναι απαραίτητο να παρέλθει χρόνος εγκλιματισμού για την σημαντική αύξηση των υπεύθυνων για βιοαποικοδόμηση πληθυσμών των μικροοργανισμών. Ενώ η βιοαποικοδομηση στην βαθιά υποεπιφανειακή κορεσμένη ζώνη του εδάφους γίνεται επίσης με χαμηλούς ρυθμούς εξαιτίας των χαμηλών πληθυσμών, εντούτοις μπορεί πολύ γρήγορα να γίνει αναερόβια λόγω έλλειψης διαθέσιμου οξυγόνου. Η βιοαποικοδόμηση σε ρηχές υποεπιφανειακές

[4] Σε βαθιά εδαφικά στρώματα οι παράγοντες ακτινοβολία, και θερμοκρασία μηδενίζονται και δεν παρουσιάζεται καμία μεταβολή που να συμβαδίζει με την μεταβολή των καιρικών συνθηκών της ατμόσφαιρας σε ημερήσια κλίμακα. Σε αυτά τα στρώματα το κλίμα της ατμόσφαιρας επηρεάζει μόνο σε ετήσια κλίμακα, όπου υπάρχει αντιληπτή διαφορά, μέσω των βροχοπτώσεων ή της αυξημένης ξηρασίας.

περιοχές είναι αρχικά πιο γρήγορη εξαιτίας των υψηλών μικροβιακών πληθυσμών, αλλά σύντομα μειώνεται λόγω χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου.

1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα

Για πολύ καιρό επικρατούσε η άποψη ότι για να συμβεί βιοαποικοδόμηση αρκεί η παρουσία κατάλληλων μικροβιακών ενζύμων. Συνεπώς η περισσότερη έρευνα έχει συγκεντρωθεί σε αυτά τα πεδία. Υπάρχουν όμως δυο στάδια κατά την διεργασία της βιοαποικοδόμησης. Το πρώτο αφορά την πρόσληψη του υποστρώματος από το κύτταρο και το δεύτερο αφορά τον μεταβολισμό ή την αποικοδόμηση του υποστρώματος. Υπάρχουν τρεις τρόποι πρόσληψης μιας υγρής οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς. Κατά την πρώτη μορφή γίνεται χρήση των διαλυμένων οργανικών συστατικών. Αυτός ο τρόπος πρόσληψης αρχίζει να γίνεται περιοριστικός όσο μειώνεται η υδατική διαλυτότητα των ρύπων (υδρογονανθράκων). Κατά τον δεύτερο τρόπο συμβαίνει πρόσληψη με άμεση επαφή των κυττάρων με την διεπιφάνεια ύδατος-υδρογονανθράκων σε μια μεγάλη ελαιοκηλίδα σε νερό. Αυτός ο τρόπος πρόσληψης περιορίζεται από την/στην επιφάνεια επαφής των δυο φάσεων. Στον τρίτο τύπο πρόσληψης τα κύτταρα προσλαμβάνουν μέσω επαφής με υπομικροσκοπικού μεγέθους κηλίδες που βρίσκονται σε διασπορά στην υδατική φάση. Αυτός ο τρόπος δράσης περιορίζεται από τον σχηματισμό τέτοιων κηλίδων. Όπως για παράδειγμα σε ωκεάνιο περιβάλλον η δράση των κυμάτων αυξάνει τη διασπορά τέτοιων κηλίδων ενώ σε ένα εδαφικό περιβάλλον η διασπορά είναι περιορισμένη. Υπάρχει και η ενισχυμένη πρόσληψη που αφορά την χρήση βιο επιφανειοδραστικών ή και γαλακτωματοποιητικών παραγόντων που αυξάνουν αποτελεσματικά την υδατική διαλυτότητα των υδρογονανθράκων μέσω του σχηματισμού μικκυλίων ή σωματιδίων που συνδέονται με τους υδρογονάνθρακες, ή επιτρέπουν την καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων στους υδρογονάνθρακες μετατρέποντας την επιφάνεια των κυττάρων πιο υδροφοβική.

Ο τρόπος πρόσληψης που επικρατεί σε κάθε περιβάλλον εξαρτάται από την υδατική διαλυτότητα των οργανικών συστατικών. Γενικά ισχύει ότι η άμεση επαφή με τα οργανικά συστατικά παίζει πιο σημαντικό ρόλο όσο μειώνεται η υδατική διαλυτότητα. Επιπλέον για συστατικά που βρίσκονται σε στερεή φάση, όπως οι πολυαραωματικοί υδρογονάνθρακες, μόνο με δυο πιθανούς τρόπους μπορεί το κύτταρο να προσλάβει το υπόστρωμα, με άμεση επαφή με το υπόστρωμα και με χρήση του διαλυμένου υποστρώματος.

Διαθέσιμες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι για στερεής κατάστασης οργανικούς ρύπους, ο τρόπος πρόσληψης των ρύπων από τους αποικοδομητές μικροοργανισμούς με τη μεγαλύτερη σημασία είναι αυτός κατά τον οποίο γίνεται χρήση των διαλυμένων ρύπων. Συνεπώς η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα έχει μεγαλύτερη επίπτωση στην αποικοδόμηση στερεής φάσης οργανικών ρύπων από ότι στην αποικοδόμηση υγρής φάσης οργανικών ρύπων.(18)

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορα συστήματα πρόσληψης της τροφής τους. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω τα βακτήρια παράγουν ουσίες οι οποίες δρουν επιφανειοδραστικά ενισχύοντας την διαλυτότητα των ουσιών αυτών (44). Αυτό έχει μεγάλη σημασία στη βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων, που αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες αποτυχίας απομάκρυνσης μέσω πρόσληψης των ρύπων από τους ζωντανούς οργανισμούς, ώστε το τελικό αποτέλεσμα να είναι η πλήρης αποκατάσταση των περιβαλλόντων όπου εφαρμόζεται κάποιο πρόγραμμα.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα ενός οργανικού συστατικού είναι η ρόφησή του από το έδαφος ή από τα ιζήματα. Ανάλογα με τον μηχανισμό ρόφησης, τα οργανικά συστατικά μπορούν να είναι δεσμευμένα στο έδαφος με ασθενείς (δεσμοί υδρογόνου, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals) ή δυνατούς δεσμούς (ομοιοπολικοί δεσμοί). Η ρόφηση των υπολειμμάτων που δεσμεύονται με ασθενείς δεσμούς ή είναι ασταθή, είναι μια αντιστρεπτή κατάσταση, έτσι ώστε όταν ο ροφημένος ρύπος απελευθερωθεί πίσω στο διάλυμα γίνεται διαθέσιμος για μικροβιακή χρήση. Η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί επίσης να μειωθεί εξαιτίας της διάχυσης των ρύπων σε εδαφικούς μικροπόρους στους οποίους δεν έχουν πρόσβαση τα αποικοδομητικά βακτήρια εξαιτίας αποκλεισμού λόγω μεγέθους πόρων (pore size exclusion).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το ποσοστό των ευμετάβλητων υπολειμμάτων που γίνονται βιοδιαθέσιμα μέσω εκρόφησης από τα σωματίδια του εδάφους μειώνεται όσο αυξάνει το χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα υπολείμματα παραμένουν στο έδαφος. Συνεπώς όσο περνάει ο χρόνος και οι ρύποι γίνονται ολοένα και περισσότερο μη προσβάσιμοι στους μικροοργανισμούς εξαιτίας της διάχυσής τους σε βαθύτερους και πιο απομακρυσμένους μικροπόρους του εδάφους, η βιοδιαθεσιμότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα αναμένεται να μειωθούν.

Επίσης κάποιοι ρύποι μπορούν να εισαχθούν στην οργανική ύλη του εδάφους με τη δράση μιας μεγάλης γκάμας οξειδωτικών ενζύμων τα οποία είναι παρόντα στο έδαφος. Η διεργασία αυτή αποκαλείται χουμοποίηση (humification). Η χουμοποίηση είναι μια διεργασία μη αντιστρεπτή και μπορεί να θεωρηθεί ως ένας παράγοντας «γήρανσης (aging)». Αυτά τα χουμοποιημένα ή δεσμευμένα υπολείμματα απελευθερώνονται και αποικοδομούνται μόνο πάρα πολύ αργά ως τμήμα της κανονικής, φυσιολογικής μεταβολής της χουμικής ύλης σε έδαφος.(18)

1.2.2.1 Φαινόμενα τοξικότητας

Σε περιοχές με διαρροές ρύπων ή σε προγράμματα εξυγίανσης, για παράδειγμα landfarming των υπολειμμάτων επεξεργασίας πετρελαίου, μπορεί να αφορούν εξαιρετικά αυξημένη συγκέντρωση οργανικών ρύπων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η τοξικότητα των ρύπων στους μικροβιακούς πληθυσμούς μπορεί να καταστήσει την διεργασία εξυγίανσης πολύ αργή. Η τοξικότητα των μη ιονιζόμενων οργανικών ρύπων (όπως οι πετρελαϊκοί υδρογονάνθρακες ή οι οργανικοί διαλύτες), οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε έναν μη εξειδικευμένο ναρκωτικού τύπου τρόπο δράσης. Σε αυτή την περίπτωση η τοξικότητα βασίζεται στην δέσμευση ενός διαλυμένου ρύπου στο λιποφιλικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας διάρρηξη της ακεραιότητας της μεμβράνης. Εφόσον η κυτταρική μεμβράνη είναι το κύριο σημείο συσσώρευσης του οργανικού ρύπου στους μικροοργανισμούς, η έκθεση της μεμβράνης στους ρύπους οδηγεί στην αυξημένη διαπερατότητά της σε ρύπους (permeability). (18)

1.2.3 Βιοτικοί Παράγοντες

Στην φύση υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες και η προσθήκη των συστατικών αυτών στο περιβάλλον οδηγεί σε επιλεκτικό εμπλουτισμό των μικροοργανισμών αυτών.(44)

Τα βακτήρια κινούνται γλιστρώντας πάνω σε στερεές επιφάνειες [5] ή με κίνηση που εξαρτάται από μαστίγια σε νερό ή σε σωματίδια του εδάφους που είναι καλυμμένα με ένα στρώμα υγρασίας. Η κίνηση των βακτηρίων δεν είναι ανεξέλεγκτη. Ο φυσιολογικός έλεγχος της κίνησης είναι γνωστός ως τάξις. Το θετικό ερέθισμα που ελκύει ένα βακτήριο μπορεί να είναι το φως, το μαγνητικό πεδίο της γης, το επίπεδο οξυγόνου, ή οργανικές ενώσεις.(17)

Ο μετασχηματισμός των οργανικών συστατικών από τα μικρόβια σε φυσικά ή τεχνητά περιβάλλοντα συμβαίνει με μια καθορισμένη σειρά φυσιολογικών αντιδράσεων. Οι μικροοργανισμοί αισθάνονται, μεταφέρουν και επεξεργάζονται ενζυματικά τα οργανικά συστατικά. Η μικροβιακή συμπεριφορά περιφέρεται γύρω από αυτές τις αντιδράσεις στα χημικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Η βακτηριακή χημειοτακτική αντίδραση είναι πιθανόν η πιο πρωτόγονη απ' όλες τις

[5] Τα αρνητικά κατά Gram χημειοετερότροφα βακτήρια, περιλαμβάνουν πολλές ομάδες βακτηρίων που κινούνται με ολίσθηση. Η κίνηση αυτή προϋποθέτει επαφή του κυττάρου με στερεή επιφάνεια, και είναι βραδύτερη της κίνησης με μαστίγια. Στους οργανισμούς αυτούς δεν έχουν βρεθεί μέχρι τώρα οργανίδια κίνησης. Στα μονοκύτταρα βακτήρια που ολισθαίνουν, η κίνηση συνοδεύεται με κάμψη των κυττάρων , γεγονός που δείχνει ότι το κυτταρικό τοίχωμα στους οργανισμούς αυτούς θα πρέπει να είναι λιγότερο στερεό.(15)

αισθήσεις και πιο κοντινή με την αίσθηση της ανθρώπινης όσφρησης, η οποία επίσης θεωρείται η πιο πρωτόγονη από τις πέντε αισθήσεις μας. Ο χημειοτακτισμός έχει μελετηθεί πολύ στο βακτήριο *E.coli*. τα κύτταρα του βακτηρίου αυτού έχουν παρατηρηθεί να απομακρύνονται από κάποια χημικά συστατικά, αυτά που δεν μπορεί να μεταβολίσει και μπορεί να δράσουν αρνητικά στην επιβίωσή τους.

Η μετακίνηση ολόκληρου του οργανισμού σαν αποτέλεσμα κάποιου χημικού ερεθίσματος στην περίπτωση νηματοειδών μυκήτων και φυκιών, που δεν έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης (η μεταβολή στη διεύθυνση αύξησης) ονομάζονται χημειοτροπισμός. Μικροοργανισμοί που πλησιάζουν προς, ή απομακρύνονται από το χημικό ερέθισμα παρουσιάζουν το φαινόμενο της θετικής ή αρνητικής χημειόταξης αντίστοιχα. Γενικά ουσίες με παρεμποδιστικές ή δηλητηριώδεις ιδιότητες, προκαλούν αρνητική χημειόταξη, ενώ το αντίθετο συμβαίνει συνήθως με θρεπτικές ουσίες αλλά και χημικά συστατικά που προκαλούν τη συγκέντρωση των βακτηρίων που ολισθαίνουν και ορισμένων μυξομηκύτων.

Στο βακτήριο *E. coli*, όπου έχουν γίνει μελέτες για την χημειόταξη, αυτή εξαρτάται από την ύπαρξη ορισμένου αριθμού χημειοευαίσθητων υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου, καθένας από τους οποίους είναι ειδικός για μια ή περισσότερο αριθμό συγγενών, δομικά, ουσιών. Σήμερα είναι γνωστοί τουλάχιστον δώδεκα χημειοευαίσθητοι υποδοχείς που συνδέονται με ουσίες οι οποίες προκαλούν θετική χημειόταξη και οκτώ που προκαλούν αρνητική χημειόταξη.(15)

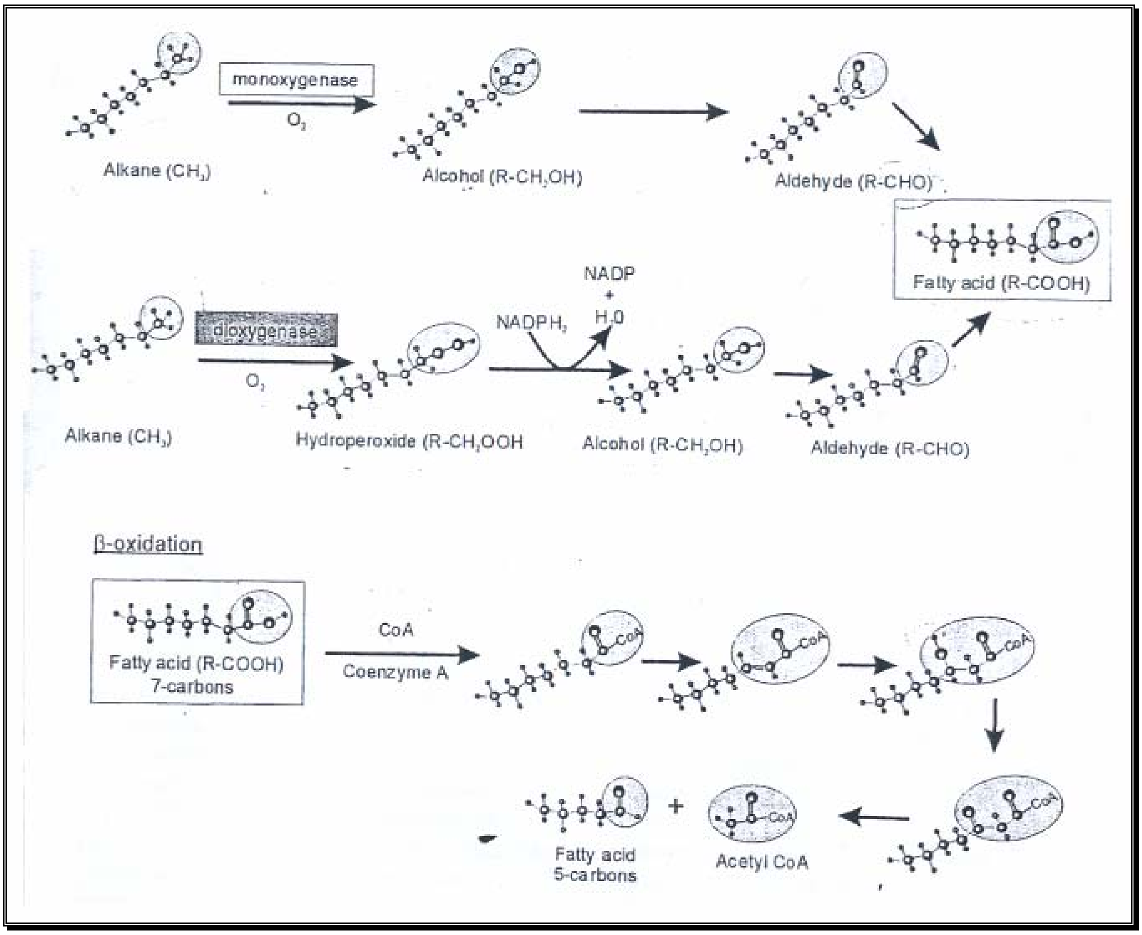
Η διαδικασία της αίσθησης ξεκινάει με τη δέσμευση στην επιφάνεια του κυττάρου μιας πρωτεΐνης χημειόταξης (CMP – Methyl - accepting chemiotaxis protein) που δέχεται μεθύλιο. Το εξωτερικό ερέθισμα μεταδίδεται μέσω της πρωτεΐνης CMP, η οποία διαπερνάει την μεμβράνη, στο εσωτερικό του κυττάρου. Η διαμόρφωση της πρωτεΐνης που δραστηριοποιείται από τη δέσμευση του χημικού, επιτρέπει την μεθυλίωση υποκαταστατών του γλουταμικού οξέος στην πρωτεΐνη. Καθ’ όλη τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το βακτήριο είναι «κλειδωμένο» σε μια χημειο-αισθητική διαμόρφωση, και το μαστίγιο συνεχίζει να περιστρέφεται προς την ίδια κατεύθυνση, αναγκάζοντας το κύτταρο να συνεχίσει να κινείται προς την ίδια κατεύθυνση. (17)

Αρκετοί μικροοργανισμοί έχουν αναγνωριστεί (44) να εκκρίνουν ουσίες (κυρίως βιο επιφανειοδραστικές - bio-surfactants) που μετατρέπουν την μη υδατική φάση σε σταγόνες μεγέθους μικρότερου του 1μm, όπως το *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis* (42). Η διεργασία αυτή συχνά ονομάζεται και ψευδοδιάλυση (pseudosolubilization). Τα μικρά αυτά σταγονίδια (0.1 -1 μm) αφομοιώνονται άμεσα από τους μικροοργανισμούς. Όσο πιο μικρά είναι τα σταγονίδια τόσο πιο γρήγορη είναι η αφομοίωσή τους από τους μικροοργανισμούς.(4)

Αυτές οι βιο- επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν την ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση του νερού ή να σταθεροποιούν τα γαλακτώματα μεταξύ του νερού και ενός οργανικού υγρού (42). Στην περίπτωση ενός συστήματος δυο φάσεων νερού και αλκανίων μη αναμίξιμων σε νερό, τα αλκάνια είναι διαθέσιμα σε βακτήρια του διαλύματος μόνο όταν αυτά βρίσκονται στην διεπιφάνεια αλκανίων – νερού. Η δημιουργία γαλακτώματος οδηγεί στη διασπορά πολλών μικρών σταγονιδίων αλκανίων στο νερό, αυξάνοντας κατά πολύ την διεπιφάνεια αλκανίων – νερού. Όπως και τα συνθετικά επιφανειοδραστικά τα μικροβιακά επιφανειοδραστικά περιέχουν υδροφιλικά και υδροφοβικά τμήματα. Πολλά από αυτά είναι γλυκοπεπτίδια, λιποπεπτίδια.(17)

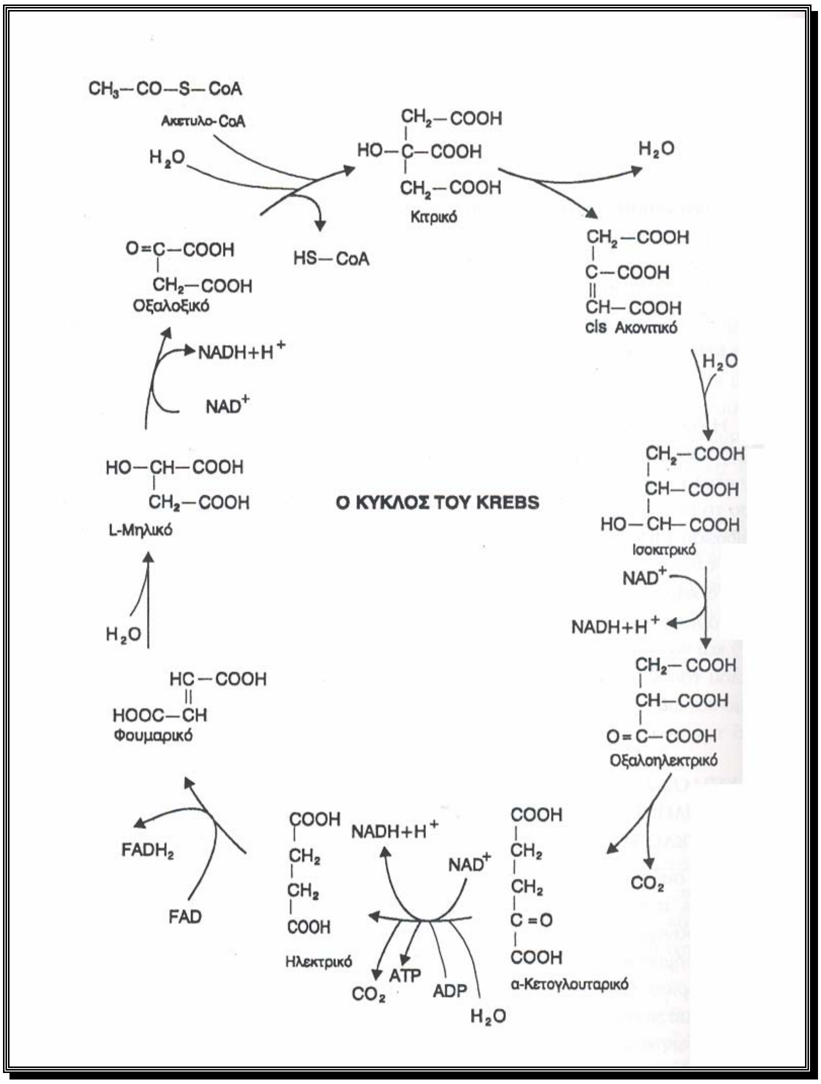
1.2.4 Αλκάνια

Τα αλκάνια έχουν παρόμοια δομή με τα λιπαρά οξέα και πολλά φυτικά προϊόντα, φυτικές παραφίνες, τα οποία είναι άφθονα στη φύση και για τα οποία υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που μπορούν να τα αποικοδομήσουν. Έτσι στο περιβάλλον υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ν- αλκάνια ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ως αποτέλεσμα τα ν – αλκάνια θεωρούνται ο πιο εύκολος τύπος βιοαποικοδομήσιμου υδρογονάνθρακα.



Εικόνα 1- IV Βιοχημικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης αλκανίων (8)

Από τη δεκαετία του 1950 και 1960 έχουν απομονωθεί μικροοργανισμοί του γένους *Pseudomonas* υπεύθυνοι για την αποδόμηση αλκανίων, και ήδη από τα πρώτα πειράματα με τα στελέχη αυτά φαίνεται ότι τα αλκάνια μεταβολίζονται σε CO_2 και νερό, και ότι 1 αλκανόλες, αλδεύδες και λιπαρά οξέα αποτελούν ενδιάμεσα στάδια του αποικοδομητικού μονοπατιού.



Εικόνα 1- V Ο κύκλος του Krebs (41)

Η βιοαποικοδόμηση των αλκανίων συμβαίνει με υψηλό βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο, (BOD), με δυο βιοχημικά μονοπάτια που φαίνονται στην εικόνα 1.IV. Ο πιο κοινός τρόπος βιοαποικοδόμησης είναι ο πρώτος της α' οξείδωσης κατά τον οποίο ένα άτομο οξυγόνου εισέρχεται άμεσα στο τελευταίο άτομο άνθρακα της αλυσίδας των αλκανίων με ένα ένζυμο την μονοξυγενάση των αλκανίων. Αυτή η εισαγωγή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αρχικής αλκοόλης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε αλδεΰδη και τελικά σε λιπαρό οξύ. Εναλλακτικά, το ένζυμο διοξυγενάση εισάγει δυο άτομα οξυγόνου σε ένα αλκάνιο για να σχηματίσει έτσι υδρουπεροξείδιο. Το τελικό προϊόν και σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι είναι ο σχηματισμός ενός λιπαρού οξέος. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί και η περίπτωση της προσθήκης δυο ατόμων οξυγόνου στα δυο άκρα της αλυσίδας, έτσι ώστε και τα δυο άκρα της αλυσίδας να οξειδώνονται, αλλά και η περίπτωση της οξείδωσης εσωτερικού ατόμου άνθρακα να οξειδώνεται.

Τα λιπαρά οξέα είναι ενδιάμεσοι μεταβολίτες και βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα. Τα λιπαρά οξέα χρησιμεύουν στον σχηματισμό μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αλλά και γενικότερα στην αποθήκευση λιπιδίων. Το κοινό βιοχημικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων είναι γνωστό ως β- οξείδωση. Πρόκειται για ένα μονοπάτι το οποίο αποκόπτει δυο άτομα άνθρακα σε κάθε κύκλο.

Κάθε ένα κομμάτι από αυτά τα δυο άτομα άνθρακα απομακρύνονται από την υπόλοιπη αλυσίδα μέσω του συνένζυμου Α, ως ακετυλοσυνένζυμο – Α, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, για ολοκληρωτική ανοργανοποίηση σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό (εικόνα 1.V).

Σε γενικές γραμμές οι μικροοργανισμοί προτιμούν μεσαίας αλυσίδας υδρογονάνθρακες, και αυτοί οι υδρογονάνθρακες είναι που χρησιμοποιούνται αμέσως σε σχέση με υδρογονάνθρακες με μικρότερες ή μακρύτερες αλυσίδες.

1.2.5 Εξέλιξη καταβολικών γονιδίων

Οι μικροοργανισμοί και οι πρόγονοί τους υπάρχουν στη γη 3,6 δισεκκατομμύρια χρόνια, αρκετό χρονικό διάστημα για την εξέλιξη μεταβολικών μονοπατιών με νέες ενζυματικές δραστηριότητες. (17)

Η ανακάλυψη των Zuckerkandl και Linus Pauling[6] το 1965, οδήγησε τον Carl Woese και τους συνεργάτες του να πρωτοστατήσουν στη χρήση του 16S rRNA για τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των προκαρυωτικών κυττάρων. Η ιδέα στηρίχθηκε στο ότι το γονίδιο αυτό είναι

[6] Όταν το 1965 οι Emily Zuckerkandl και Linus Pauling ανέπτυξαν την ιδέα ότι η αλληλουχία των πρωτεϊνών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μοριακό απολίθωμα, ανέλυσαν την ακολουθία των αμινοξέων μορίων αιμογλοβίνης διαφόρων ειδών και παρατήρησαν ότι αυτές διέφεραν σε ένα βαθμό που ήταν συμβατός με την προτεινόμενη εξελικτική χρονική κλίμακα που διαχώριζε αυτά τα είδη. Αυτή η ιδέα έγινε γνωστή ως μοριακό εξελικτικό ρολόι (Molecular Evolutionary Clock). Διαφορετικά γονίδια εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς και γενικά ότι προϊόντα γονιδίων τα οποία είναι πολύ σύνθετα βιοχημικά και ουσιαστικά στις ζωτικές λειτουργίες ενός κυττάρου έχει παρατηρηθεί να εξελίσσονται, να αλλάζουν, με πολύ χαμηλότερους ρυθμούς.(17, 40)

σχετικά εύκολο να απομονωθεί και να αναλυθεί. Πρόκειται για σημαντικό τμήμα του μηχανισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης όλων των μικροβίων και έχει παρατηρηθεί να υπόκειται μόνο σε μικρές αλλαγές ακόμη και μεταξύ πολύ διαφοροποιημένων συγγενικών ειδών. Η ιδιότητά του αυτή, δηλαδή η μικρή διαφοροποίησή του, δίνει τη δυνατότητα της χρήσης του μορίου αυτού ως φυλογενετικού δείκτη όλων των προκαρυωτικών οργανισμών εφόσον η εξελικτική διαφορά τους επεκτείνεται σε εκατομμύρια χρόνια.(7, 40)

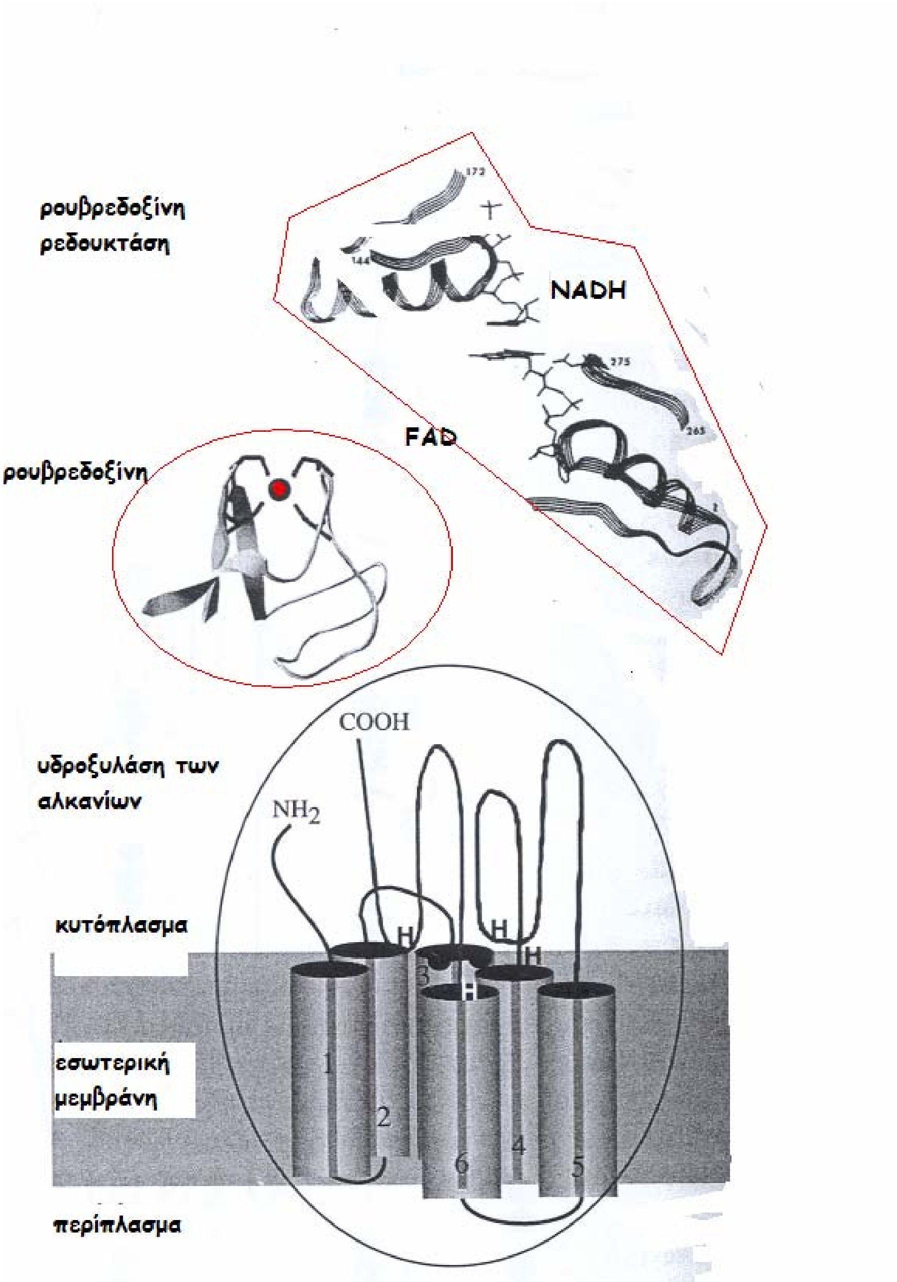
1.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΟΝΟΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΛΚΑΝΙΩΝ

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για το ένζυμο μονοοξυγενάσης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση των αλκανίων, έχει βρεθεί ότι ανήκουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: I, II και III. Σύμφωνα με αυτήν την κατηγοριοποίηση και τα βακτήρια που έχουν γονίδια που ανήκουν σε κάποια από αυτές τις οικογένειες γονιδίων παίρνουν αντίστοιχα το όνομα αυτής, έτσι έχουμε βακτήρια I, II και III κατηγορίας αποδομούντων αλκανίων.

Ο μηχανισμός αποικοδόμησης ν-αλκανίων, όπως έχει αναφερθεί από τους K. Sei et al το 2003 (7), σε μια μελέτη των μικροβιακών πληθυσμών σε θαλάσσιο νερό, ακολουθεί μια πορεία κατά την οποία τα μικρότερου μοριακού βάρους αλκάνια, με κοντή αλυσίδα, είναι αυτά που παρατηρούνται να αποδομούνται πρώτα, χρονικά, από βακτήρια που έχουν καταβολικά γονίδια αλκανίων που ανήκουν στην κατηγορία I. Έπειτα ακολουθούν τα αλκάνια με μεγαλύτερου μήκους αλυσίδα τα οποία αποικοδομούνται επιτυχώς από βακτήρια που έχουν καταβολικά γονίδια των κατηγοριών II και III.(6,7).

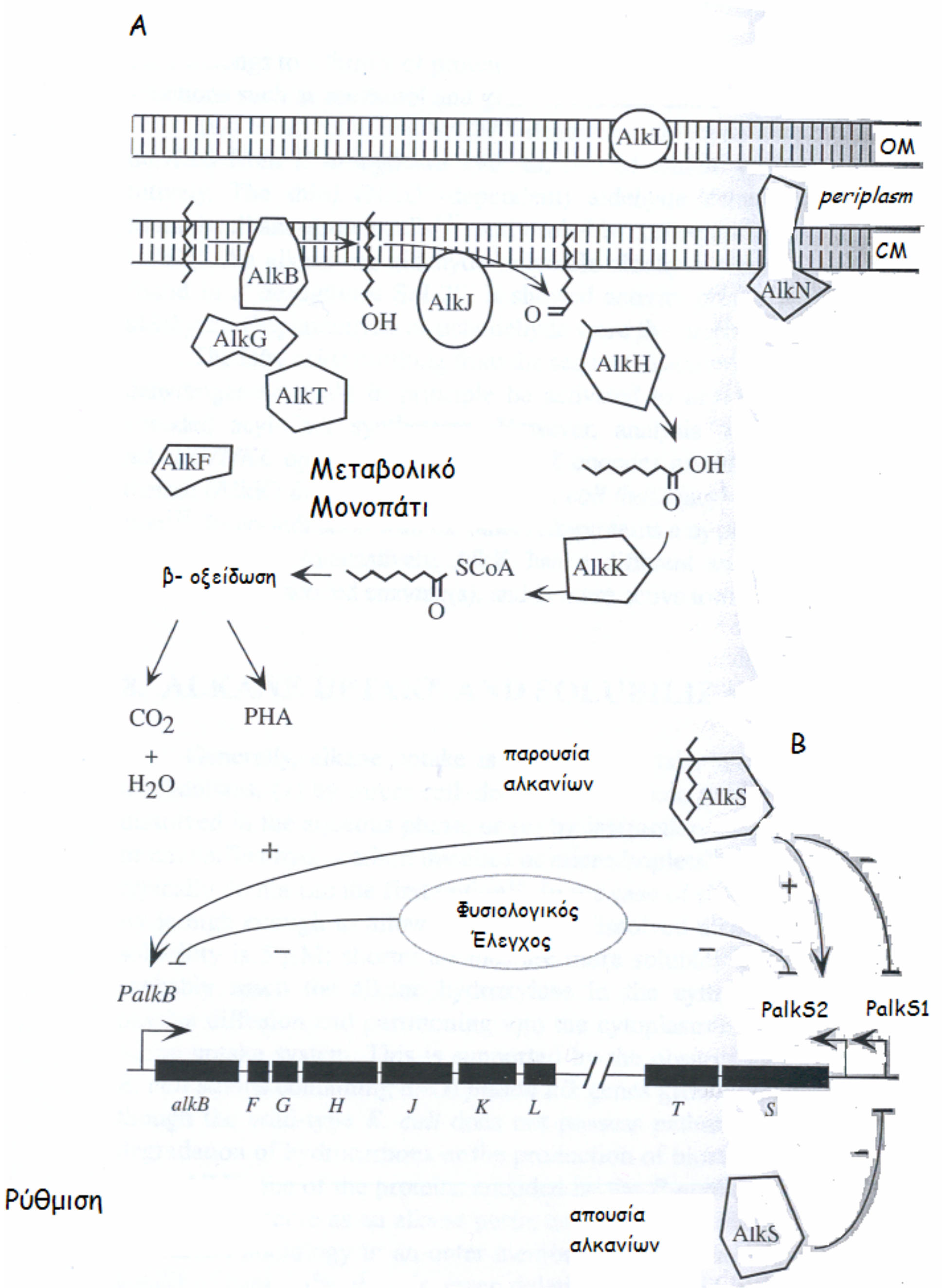
Οι περισσότερες μελέτες του συστήματος της βακτηριακής οξείδωσης των αλκανίων έγινε στα βακτήρια του γένους Pseudomonas τα οποία έχουν παρόμοιο ενζυμικό σύστημα.(8,9, 20)

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του συστήματος της υδροξυλάσης των αλκανίων έδειξε ότι αυτό αποτελείται από τρία συστατικά, μια υδροξυλάση και δυο υδατοδυαλυτές πρωτεΐνες οι οποίες δρουν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων μεταξύ του NADH και της υδροξυλάσης. Η υδροξυλάση των αλκανίων είναι μια ενδομεμβρανική πρωτεΐνη η οποία απαιτεί φωσφολιπίδια και σίδηρο για να ενεργοποιηθεί. Η πρωτοταγής δομή περιέχει έξι υδρόφοβα τμήματα τα οποία διαπερνούν την κυτοπλασματική μεμβράνη ως α – έλικες (εικόνα 1.VI). Υπάρχουν τέσσερα υψηλά συντηρημένα μοτίβα τα οποία περιέχουν ιστιδίνες και είναι ουσιώδη για τον καταλυτικό ρόλο των πρωτεϊνικών συστημάτων, υδροξυλάσης των αλκανίων και μονοξυγενάσης του ξυλένιου, καθώς και στις πιο μακρινά συγγενικές desaturases. Οι συντηρημένες ιστιδίνες πιθανόν σχηματίζουν μια σφαιρική διάταξη πλούσια σε άζωτα για δυο άτομα σιδήρου, όπως δείχνει η φασματοσκοπία Moessbauer. Οι δυο πρωτεΐνες που δρουν ως ηλεκτρονιομεταφορείς και παρέχουν ηλεκτρόνια για την αντίδραση της μονοοξυγενάσης είναι η ρουβρεδοξίνη και η ρεδουκτάση της ρουβρεδοξίνης. Η ρεδουκτάση είναι μια φλαβοπρωτεΐνη η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στην ρουβρεδοξίνη. Η τελευταία ανήκει σε μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων περιέχοντας ένα σίδηρο ο οποίος είναι περιτριγυρισμένος από τέσσερις κυστεΐνες. Η ρουβρεδοξίνη του βακτηρίου *P. putida* GPo1 είναι διαφορετική στο ότι περιέχει δυο ρουβρεδοξίνες συνδεδεμένες μεταξύ τους από έναν σύνδεσμο. Οι περισσότερες ρουβρεδοξίνες που σχετίζονται με την υδροξυλίωση των αλκανίων είναι τυπικές μονομερείς ρουβρεδοξίνες.(8,9)



Εικόνα 1- VI

1.3.1 Ρύθμιση και Καταβολισμός Αλκανίων



Εικόνα 1- VII. Αποδόμηση Αλκανίων από *P. putida* GPo1. A το μεταβολικό μονοπάτι, ο ρόλος και η θέση των πρωτεϊνών Alk. B Η γενική δομή της γονιδιακής θέσης alk, και η ρύθμιση των γονιδίων alk.

Το προϊόν της αντίδρασης της υδροξυλάσης των αλκανίων είναι συνήθως 1-αλκανόλη. Οι περισσότερες ψευδομονάδες που είναι ικανές να αυξηθούν σε αυτά τα υποστρώματα, ακόμη και αν δεν μπορούν να αυξηθούν σε αλκάνια, κατέχουν διυδρογενάσες αλκοόλης και αλδεΰδης που μετατρέπουν την 1- αλκανόλη σε λιπαρά οξέα. Αυτά αποδομούνται περαιτέρω, μέσω της β-οξείδωσης, σε ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), το οποίο παίρνει μέρος στον βασικό μεταβολισμό. Όταν το άζωτο και ο φώσφορος είναι περιοριστικοί παράγοντες το 3-ύδροξυ λιπαρό οξύ, ένα ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου της β-οξείδωσης, μπορεί να μετατραπεί στο αποθηκευτικό υλικό πολύ- (ύδροξυαλκανικό οξύ) (poly-hydroxyalkanoate). Όταν ο περιοριστικός παράγοντας περάσει, το πολυμερές εξυπηρετεί ως πηγή άνθρακα (Εικ.1.VII).(8) Στο σύστημα αυτό η μονοοξυγενάση είναι μια ενδομεμβρανική πρωτεΐνη.

1.4 ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε δείγματα από την Κόρινθο οι οποίες χρησιμεύουν στην τεχνική Landfarming, σύμφωνα με την οποία γίνεται εναπόθεση υπολειμμάτων διύλισης πετρελαίου (Motor Oil Hellas), από τους Κατσίβελα et al το 2004 για την μελέτη της αλλαγής της μικροβιακής κοινότητας για χρονικό διάστημα 14 μηνών οπότε και συντελείται αποικοδόμηση αλκανίων και άλλων συστατικών του πετρελαίου, παρατηρείται ένα σχετικά παραλλαγμένο μοτίβο αποικοδόμησης αλκανίων.

Από την παρακολούθηση των πειραματικών τεμαχίων μέσω συχνής δειγματοληψίας (1,3,16) για την εκτίμηση των αλλαγών που συμβαίνουν τόσο στη σύσταση του αποβλήτου όσο και του μικροβιακού πληθυσμού έχουν προκύψει αποτελέσματα που οδηγούν σε συμπεράσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης στις περιοχές αυτές ώστε να καταστεί εφικτή η πλήρης αποκατάσταση των εδαφών που χρησιμεύουν για τη διάθεση αποβλήτων σε τακτική βάση.(16)

Έτσι βρέθηκε ότι συμβαίνει εμπλουτισμός της κοινότητας των ενδογενών βακτηρίων μετά την προσθήκη υπολείμματος πετρελαϊκής λάσπης στους χώρους του πειράματος και της δειγματοληψίας. Αυτή η παρατήρηση προήλθε από την ανίχνευση με μεθόδους μοριακής βιολογίας (16), που δεν απαιτούν την καλλιέργεια των βακτηρίων. Η εκτίμηση της αλλαγής της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων έγινε με την παρατήρηση της παραλλακτικότητας των OTUs[7] (23) από τη σύγκριση αποτελεσμάτων των αναλύσεων που αντιστοιχούν σε δείγματα που προέρχονται από χρονικά διαφορετικά πειραματικά τεμάχια (3).

Αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων (GC-MS) έδειξαν ότι συμβαίνουν αλλαγές στην σύνθεση των υπολειμμάτων του πετρελαίου στην περιοχή των πειραμάτων κατά τη διάρκεια του εξεταζόμενου χρόνου, 14 μήνες, και σύμφωνα με τα οποία συμβαίνει 75% με 100% απομάκρυνση των αλκανίων, μέσω αποικοδόμησης, συνιστώντας την ύπαρξη μικροβιακών κοινοτήτων ικανών να βιοαποικοδομούν τις ουσίες αυτές.

Αναλυτικά χρονικά έχει ως εξής : στα πρώτα στάδια (4 πρώτοι μήνες) παρατήρησης συναντάται μείωση των αρχικών επιπέδων μόλυνσης κατά 50% των υδρογονανθράκων με μεγάλες και μικρές αλυσίδες (C23-C34 και C11-C13 αντίστοιχα), ενώ οι υδρογονάνθρακες με μήκος

[7] Operational Taxonomic unit- Αντιπροσωπεύει διαφορετικά γένη βακτηρίων

αλυσίδας C18-C23 μειώθηκαν κατά λιγότερο από 20%. Σε επόμενο στάδιο παρατήρησης (10 πρώτοι μήνες) αλκάνια με ενδιάμεσου μήκους αλυσίδα εμφανίζονται να μειώνονται πιο αποτελεσματικά κατά 50% (C13-C14 και C18-C24), ενώ τα εναπομείναντα αλκάνια μειώνονται λίγο παραπάνω ενώ αυτά με μήκος αλυσίδας C31-C34 και C11-C12 εξαφανίζονται κατά 100%. Ακόμη όμως και έπειτα από 14 μήνες εμφανίζονται να μειώνονται τα επίπεδα αλκανίων με μήκος αλυσίδων C14-C21 σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%.

Η απομάκρυνση των αλκανίων από το περιβάλλον εναπόθεσης της πετρελαϊκής λάσπης σημαίνει ύπαρξη των κατάλληλων καταβολικών γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα που επιτρέπουν την αποδόμηση αλκανίων μέσω ήδη γνωστών μεταβολικών βιοχημικών μονοπατιών (9).

Στα δείγματα που εξετάστηκαν για την ύπαρξη του γονιδίου μονοοξυγενάση των αλκανίων alcB, του υπεύθυνου για τον καταβολισμό τους, με γνωστούς εκκινητές, δεν έγινε ανίχνευση και απομόνωση του γονιδίου, είτε εξαιτίας της αδυναμίας εκχύλισης από το εδαφικό δείγμα, είτε λόγω μη πολλαπλασιασμού κατά την αντίδραση της πολυμεράσης, είτε λόγω ανικανότητας των χρησιμοποιούμενων εκκινητών.(3)

Επιπλέον του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υδροξυλάση των αλκανίων έγινε έλεγχος, για την ύπαρξη στα δείγματα γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα υπεύθυνων για την αποικοδόμηση συστατικών του αποβλήτου, 2,3 διοξυγενάση κατεχόλης ένα ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό πλήθους αρωματικών ενώσεων καθώς και τη διοξεγονάση του ναφθαλενίου υπεύθυνου ενζύμου για τον καταβολισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

Τα αποτελέσματα των αλυσιδωτών αντιδράσεων της πολυμεράσης έδειξαν την ύπαρξη καταβολικών γονιδίων μόνο στο απόβλητο και όχι στα δείγματα εδάφους και μόνο για την διοξυγενάση της κατεχόλης.(3)

Σύμφωνα με τη χημική ανάλυση των υπολειμμάτων πετρελαϊκής λάσπης και των δειγμάτων εδάφους από το πεδίο , η μεγαλύτερη πηγή άνθρακα στα μολυσμένα από πετρέλαιο εδάφη ήταν τα αλκάνια.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Μέχρι τώρα η εκτίμηση της βακτηριακής βιοποικιλότητας, έχει παρεμποδιστεί από περιορισμούς που σχετίζονται με την καλλιέργεια των βακτηρίων από το φυσικό περιβάλλον. Έχει αναγνωριστεί ότι το μη καλλιεργήσιμο τμήμα αποτελεί ένα μεγάλο τμήμα όλων των βακτηριακών κοινοτήτων (46). Η εφαρμογή μοριακών προσεγγίσεων στον χαρακτηρισμό των βακτηριακών κοινοτήτων έχει ξεπεράσει τις απαιτήσεις για καλλιέργεια όλων των μελών κάθε κοινότητας. Ιδιαίτερα η ανάλυση των 16S r RNA γονιδίων, βοηθούμενη με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό των ακολουθιών στόχων ενός περιβαλλοντικού δείγματος έχει δώσει την δυνατότητα σε μοριακούς οικολόγους να παρέχουν καλύτερες εκτιμήσεις της βακτηριακής ποικιλότητας.(12)

Σε αυτή την μελέτη παρουσιάζεται το φάσμα των οργανισμών που λαμβάνουν μέρος στον εμπλουτισμό του ενδογενούς πληθυσμού, με την ίδια μέθοδο (3), 16S rDNA, και περαιτέρω εξακρίβωση της ακολουθίας των βάσεων (sequencing) των γονιδίων και συσχέτιση με βάση δεδομένων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και την εύρεση φυλογενετικών σχέσεων.

Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την εξακρίβωση των ακολουθιών των νουκλεοτιδικών βάσεων παρέχουν την βάση για την στατιστική ανάλυση των κοινοτήτων με τρόπο που προάγει τις αναφορές σχετικά με τις διαδικασίες που διαμορφώνουν τη σύσταση και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων (23). Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.5, η εκτίμηση της παραλλακτηκότητας των επικρατούντων μικροβιακών κοινοτήτων έγινε με την εκτίμηση των OTUs, παραλείποντας σημαντικές πληροφορίες. Επειδή η γενετική παραλλακτικότητα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με λειτουργικές ιδιότητες πέρα από την εκτίμηση της παραλλακτικότητας των ειδών, μια πιο πληροφοριακή ανάπτυξη της γενετικής παραλλακτικότητας είναι αυτή κατά την οποία παρουσιάζονται οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών της δειγματοληψίας.(23)

Σκοπός είναι η ανίχνευση καταβολικών γονιδίων, υπεύθυνων για την αποικοδόμηση συστατικών των υπολειμμάτων πετρελαίου με εκκινητές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και μπορούν να απομονώσουν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που καταλύουν καταβολικά βιοχημικά μονοπάτια. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση ενζύμων που ανήκουν στις οικογένειες των α) μονοξυγονάση των αλκανίων, β) 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης ,γ) υδροξυλάση της φαινόλης, δ) διοξυγενάση του τουλουενίου.

Η παρούσα εργασία εστιάζεται επίσης στη μοριακή κλωνοποίηση και ανάλυση αλληλουχίας λειτουργικών γονιδίων που κωδικοποιούν για το ένζυμο μονοοξυγενάση των αλκανίων, ταυτοποίηση και φυλογενετική ανάλυση των μικροοργανισμών που συνθέτουν την βιοκοινότητα, από όπου εκχυλίστηκε το γενετικό υλικό προς επεξεργασία, (απόβλητα διύλισης πετρελαίου).

Επιπλέον στόχο της μελέτης αποτελεί ο σχεδιασμός ενός νέου ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο της υδροξυλάσης των αλκανίων εφόσον οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα (3), παρόλο που διαπιστώθηκε μικροβιακή διάσπαση ν- αλκανίων. Ο σχεδιασμός γίνεται από έναν αριθμό ειδών που το περιέχουν και κωδικοποιούν για το ένζυμο μονοοξυγονάση των αλκανίων και για τα οποία έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η υπευθυνότητα του για την επιβίωση των μικροοργανισμών σε υπόστρωμα υδρογονανθράκων πετρελαίου. Έλεγχος της λειτουργίας των νεοσχηματιζομενων εκκινητών σε θετικό δείγμα και στο δείγμα προς ανάλυση, μοριακή κλωνοποίηση και ανάλυση αλληλουχίας του ίδιου του γονιδίου και ταυτοποίηση του πιο διαδεδομένου μικροοργανισμού στο δείγμα- κοινότητα που φέρει το γονίδιο.

Επιπλέον σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύγκριση δυο μεθόδων της μοριακής βιολογίας για την διεξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν τον πολυμορφισμό κλώνων - τμημάτων γονιδιώματος που έχει απομονωθεί από περιβαλλοντικό δείγμα. Οι τεχνικές αυτές αφορούν τη δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων με μετασχηματισμό πλασμιδίων (όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω) και μιας νεότερης μεθοδολογίας που έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στο εργαστήριο Environmental Biodegradaation GBF Braunsweig της Γερμανίας με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η δεύτερη τεχνική είναι πολύ πιο γρήγορη και λιγότερο επίπονη, απαιτεί όμως αρκετή προσοχή διότι είναι πολύ ευαίσθητη, καθώς επίσης απαιτεί προσαρμογή των συνθηκών λειτουργίας οι οποίες διαφέρουν για διαφορετικά τμήματα DNA.

Η τελευταία θα εφαρμοστεί μόνο για το γονίδιο της μονοξυγονάσης των αλκανίων για το οποίο οι συνθήκες λειτουργίας έχουν βρεθεί και έχουν αναφερθεί πολύ καλά αποτελέσματα (22,34).

Η ποικιλομορφία των καταβολικών γονιδίων δεν αντικατοπτρίζει αντίστοιχη συγγένεια σε ταξινομικό επίπεδο των οργανισμών που τα περιέχουν και τα εκφράζουν (22). Αυτό οφείλεται όπως έχει αναφερθεί στο ότι τα καταβολικά γονίδια βρίσκονται σε πλασμίδια και συμβαίνει μεταφορά αυτών από οργανισμό σε οργανισμό, χωρίς αυτοί να είναι συγγενικοί μεταξύ τους. Η διαδικασία αυτή απαντάται κατά τον εγκλιματισμό βακτηρίων σε περιβάλλοντα όπου παρατηρούνται αλλαγές (47), και σε αυτόν τον λόγο μπορεί να οφείλεται η χρονική καθυστέρηση ανταπόκρισης ενδογενών πληθυσμών κατά την προσθήκη ρύπων στο περιβάλλον.

Έτσι έχει σημασία πέρα από την διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών που απαρτίζουν μια κοινότητα σε ένα μολυσμένο από υδρογονάνθρακες περιβάλλον, και η παραλλακτικότητα σε επίπεδο αλληλουχίας νουκλεοτιδικών βάσεων των καταβολικών γονιδίων, των υπεύθυνων για την αποικοδόμηση των ρύπων, εφόσον δίνουν μια εικόνα της διαδικασίας προσαρμογής των υπαρχόντων μικροοργανισμών εξαιτίας της άσκησης της πίεσης επιλογής.

Η διερεύνηση της παραλλακτικότητας της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υδροξυλάση των αλκανίων γίνεται, όπως και στην περίπτωση της φυλογενετικής σχέσης των μικροβίων, με την κατασκευή φυλογενετικών χαρτών από την συσχέτιση αλληλουχιών των νουκλεοτιδικών βάσεων που απομονώνονται από το δείγμα και άλλες που έχουν απομονωθεί από γνωστά αποικοδομητικά βακτήρια.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ

Τα δείγματα εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν έχουν προέλθει από περιοχές διαχείρισης πετρελαϊκής λάσπης, της εταιρείας Motor Oil Hellas, στις εγκαταστάσεις της στην Κόρινθο, τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες (1,3,16) και ήταν τα ακόλουθα:

1. A: καθαρό χώμα, χωρίς καμία προσθήκη αποβλήτου, που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς (16.10.2000).
2. C: χώμα προερχόμενο από περιοχή διαχείρισης πετρελαϊκής λάσπης μετά από επώαση 4 μηνών (22.2.2001).
3. D: χώμα προερχόμενο από περιοχή διαχείρισης πετρελαϊκής λάσπης μετά από επώαση 14 μηνών (12.2001).
4. OSL: απόβλητο επεξεργασίας διύλισης πετρελαίου, που εναποτίθεται για βιοαποικοδόμηση στους χώρους landfarming (22.2.2001).

Τα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από την επιφάνεια (0–15 cm) του εδάφους και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4^0 C, μέχρι τον Αύγουστο 2003 οπότε και έγιναν τα πειράματα. Πρόκειται για τα ίδια δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες εργασίες (1,3,16).

2.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

2.2.1 *Alkanivorax_borkumensis*

Το *Alkanivorax borkumensis* είναι ένα θαλάσσιο βακτήριο που αποικοδομεί αλκάνια και πρωτοστατεί (είναι κυρίαρχο) σε θαλάσσιο νερό όπου υπάρχει αργό πετρέλαιο και παρέχονται τα θρεπτικά συστατικά Άζωτο και Φώσφορος.(8)

Οι φυλές των Alkanivorax ανήκουν στην γ-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων που μπορούν να χρησιμοποιούν τα ν-αλκάνια ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Αυτό το βακτήριο βρέθηκε να χρησιμοποιεί υδρογονάνθρακες που έχουν από 6 εως τουλάχιστον 20 άτομα άνθρακα και έχει αποδειχθεί να κατέχει δυο συγγενικά μακρινές υδροξυλάσες των αλκανίων AlkB1 και AlkB2. η πρώτη είναι πιο στενά συνδεδεμένη με τις υδροξυλάσες των αλκανίων που συναντώνται στο *Pseudomonas putida,* ενώ οι AlkB2 είναι πιο στενά συνδεδεμένες με αυτές που κωδικοποιεί το *Pseudomonas aeruginosa* από ότι με την AlkB1.(6,)

Το *Alkanivorax borkumensis* SK2 έχει πρόσφατα απομονωθεί από θαλάσσια δείγματα νερού, από τους Hara et al., και έχει δειχθεί ότι ενώ μπορεί να επιβιώσει χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα υδρογονάνθρακες δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει αμινοξέα και υδατάνθρακες. Επιπλέον τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι το AlkB1 είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση μικρής αλυσίδας αλκανίων και το AlkB2 είναι αντίστοιχα υπεύθυνο για την αποικοδόμηση μέτριου μήκους αλυσίδας αλκανίων, υπάρχουν και άλλα γονίδια που συμμετέχουν στην υδροξυλίωση των ν – αλκανίων εκτός από τα δυο παραπάνω.(8)

Το βακτήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα στα πειράματα για την πιστοποίηση της ορθότητας των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, και ως είδος αναφοράς για τον σχεδιασμό των εκκινητών του γονιδίου υδροξυλάσης των αλκανίων και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα αποτελέσματα.

2.2.2 *Pseudomonas putida*

Το βακτήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης, για την διαβεβαίωση της ορθότητας των αποτελεσμάτων. Η ύπαρξη θετικού και αρνητικού δείγματος στα πειράματα βοηθάει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων είτε όταν είναι θετικά, οπότε γίνεται επαλήθευση, είτε όταν είναι αρνητικά, ώστε να αποδοθεί η αιτία του αποτελέσματος σε κάθε περίπτωση.

2.2.3 *Escherichia coli*

Το βακτήριο αυτό χρησιμοποίηθηκε για την κατασκευή των βιβλιοθηκών κλώνων. Είναι η καλλιέργεια των κυττάρων που μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο φορέα, και αφού πολλαπλασιαστεί, δίνει πολλά αντίγραφα του κλώνου που φέρει.

2.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα και τις αναλύσεις καθώς και τα αντιδραστήρια παρατίθενται παρακάτω.

Μηχανήματα Αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (θερμοκύλινδροι)

1. Gene Amp R PCR system 2700
2. PCR express HYBAID (εικόνα 2.2)

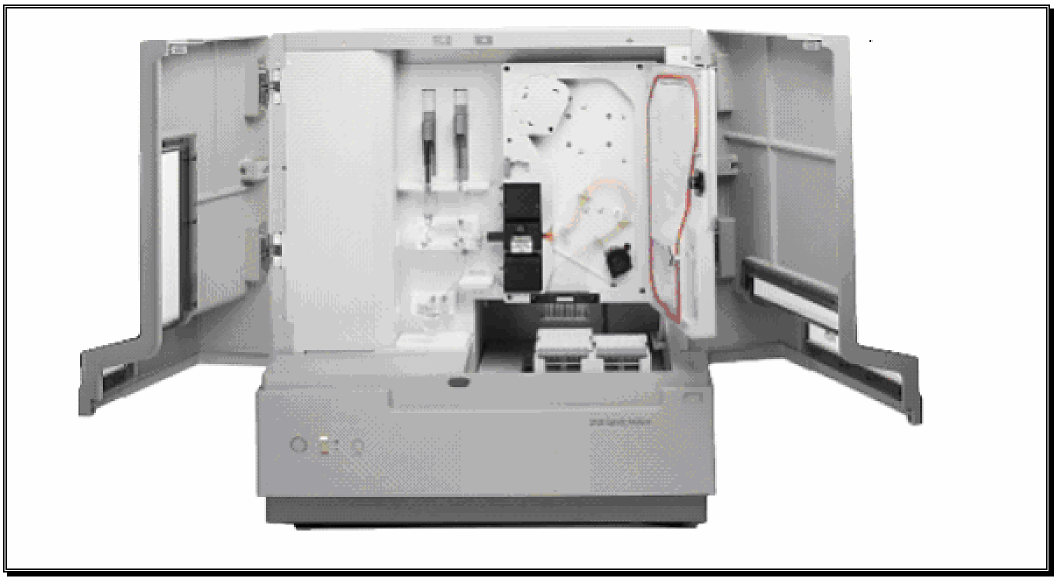
Φυγόκεντρος

3. Centrifuge – Biofuge fresco Heraeus (εικόνα 2.1)

Εικόνα 2. 1

Εικόνα 2. 2

4. 3100 ABIPRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (εικόνα 2.3)



Εικόνα 2. 3

5. SSCP (εικόνα 2.4)

Εικόνα 2. 4 SSCP

6. Σύστημα ηλεκτροφόρησης για πηκτή αγαρόζης
7. Σύστημα UV ανίχνευσης και φωτογράφησης των πηκτών αγαρόζης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. QIA quick PCR purification Kit (250) – Cat No 28106
2. QIA quick Gel Extraction Kit
3. «Συνταγή» των διαλυμάτων, κατά την προετοιμασία για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Πίνακας 2 1

		1X	17X	
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X με Mg Promega	5μl	85 μl	
dNTPs	10mM	1 μl	17 μl	
16F27[11]	10-25μM	1 μl	17 μl	
16R1492[12]	pmol/ μl	1 μl	17 μl	
Taq	5U/μl	0.5 μl	8.5 μl	
DNA	0.001-100ng	2 μl	34 μl	
BSA	100X	0.5 μl	8.5 μl	
Νερό[13]		39 μl	663 μl	
Τελικός όγκος		50 μl	850 μl	

11 Ο εκκινητής της forward ακολουθίας

12 Ο εκκινητής της reversed – αντίστροφης ακολουθίας

13 Χρησιμοποιήθηκε κυρίως απιονισμένο νερό που υπάρχει στο KIT εκχύλισης του εδάφους, και απιονισμένο νερό της βρύσης αποστειρωμένο σε κλίβανο.

4. Τα είδη των βακτηριακών αλληλουχιών και οι κωδικοί τους, που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό νέων εκκινητών για το γονίδιο της μονοοξυγενάσης των αλκανίων.

AJ297269 Rhodococcus erythropolis NRRL B-16531 AlkB2,
BX842582 Mycobacterium tuberculosisH37Rv AlkB,
AJ009587 Prauserella rugosa NRRL B-2295 AlkB,
AJ293306 Burkholderia cepacia RR10 AlkB,
AJ002316 Acinetobacter sp.ADP1 AlkM,
AJ233398 Acinetobacter calcoaceticus EB104 AlkM,
AJ233397 Pseudomonas putida P1 AlkB,
AJ245436 Pseudomonas putida GPo1 AlkB,
AJ295164 Alcanivorax borkumensis AP1 AlkB1,
AE004581 Pseudomonas aeruginosa PAO1 AlkB1.
AE004685 Pseudomonas aeruginosa PAO1 AlkB1,
AB110226 Alcanivorax borkumensis SK2 AlkB2,
AJ009579 Pseudomonas fluorescens CHA0 AlkB

5. Τα ζεύγη των νεοσχηματιζόμενων εκκινητών του γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο μονοοξυγενάση των αλκανίων:

20b 5’>3’ 5’- GSN CAY GAR YTS RKB CAY AA-3’ alkF[14]
20b 5’>3’ 5’- CCR TAR TGY TCR ABR TAR TT -3’ alkR1
23b 5’>3’ 5’-GCR TGR TGR TCN SWR TGN CGY TG-3’ alkR2
Με μήκος F- R1 και F- R2 αντίστοιχα είναι 435 και 565 βάσεις.

[14] Οι συμβολισμοί και οι βάσεις που αυτά αντιπροσωπεύουν παρατίθενται στο παράρτημα στον πίνακα 0.III

6. Υλικά Ηλεκτροφόρησης

- 1% Agarose gel
- TAE 1X
  a) 40mM Tris acetate
  b) 1mM EDTA
- Loading Buffer 6X Buffer σε αναλογία ¼ ή 1/5 Loading Buffer / δείγμα
  a) 0.25 % (w/v) bromophenol blue
  b) 0.25% (w/v) xylene cyanol FF
  c) 30% (v/v) glycerol in H_2O
- Συνθήκες Ηλεκτροφόρησης
  a) 30’ – 40’ σε 90V
  b) 30’ – 40’ σε 90V

7. Χρωματισμός και αποτύπωση (Staining and Visualization)

- Ο χρωματισμός των gel της ηλεκτροφόρησης γίνεται μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε ξεχωριστό χώρο και υποδοχείς όπου βρίσκεται η ουσία χρωματισμού και είναι: EtBr
- Η απεικόνιση των πηκτών αγαρόζης γίνεται σε ειδικό φίλμ, έπειτα από λήψη φωτογραφίας με δέσμη UV φωτός, απευθείας συνδεδεμένο με υπολογιστή.

8. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση καταβολικών γονιδίων πετρελαϊκών υπολειμμάτων:

a) Για το γονίδιο 16S r DNA (Noogales et al. 1999, Moore ER et al. 1996)

20 b 5’>3’ 16 F 27 Tm = 59^0 C 5’-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3’

και 22b 5'>3' 16 R 1492 Tm= 63^0 C 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

b) Για το γονίδιο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης C23O (Junca, 2003)

F 5'- ATG GAT TTY ATG GSB TTC AAG G-3'

R 5'- TCG ATV GAK GTR TCG GTC ATG-3'

c) Για το γονίδιο διοξυγενάση τολουενίου RHDO (Yeates et al. 2001)

RHDOF 5'- ATH CCX TGT AAY TGG AAR TTY GC -3'

RHDOR 5'-CCA RTT YTC XCC RTC RTC YTG YTC -3'

d) Για το γονίδιο 16S r DNA Com (Schweiger & Tebbe 1998)

Com 1 5'-CAG CAG AAG AGG TAA TAC -3'

Com2-Ph 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3'

e) Για το γονίδιο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης C23DO ()

F 5'- TCA GGT CAG CAC GG TCA-3'

R 5'- CGA CCT GAT CTC CAT GAC CGA-3'

f) Για το γονίδιο M13 F/R

g) Για το γονίδιο υδροξυλάση φαινόλης PHEH (Junca, 2003)

PHEHF 5'-GAY CCB TTY CGY HTR ACC ATG GA -3'

PHEHR 5'-GGC ARC ATG TAR TCC WKC ATC AT-3'

h) Για το γονίδιο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης C230DO (Junca, 2003)

C230DOF 5'- CGA CCT GAT CTC CAT GAC CGA -3'

C230DOR 5'-TCA GGT CAG CAC GGT CA -3'

i) Για το γονίδιο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης C23OORF (13, Mesarch et al., 2000)

C23OORF 5'- AGG TGW CGT SAT GAA MAA AGG -3'

C230DOR 5'-TYA GGT SAK MAC GGT CAK GAA -3'

9. Θρεπτικό υπόστρωμα LB (Broth)

Σε 800ml νερού προστίθενται

8 gr Bacto^{TM} Tryptone (Pancreatic Digest of Casein),

4 gr Yeast Extract,

8 gr Sodium Chloride NaCl (58.44rg/ml) και

12 gr Agar

10. Συστατικά για τη δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων (Promega)

pGEM®-T Easy Vector (50ng/μl)
T4 DNA Ligase
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
E. coli JM109 Competent Cells, High Efficiency

11. 2X Rapid Ligation Buffer,T4 DNALigase (provided)

60mM Tris-HCl (pH 7.8)
20mM MgCl2
20mM DTT
2mM ATP
10% polyethylene glycol

12. SOC medium (100ml)

2.0g Bacto®-tryptone
0.5g Bacto®-yeast extract
1ml 1M NaCl
0.25ml 1M KCl
1ml 2M Mg2+ stock, filtersterilized
1ml 2M glucose, filtersterilized

13. L. B. Τριβλία Petri με αμπικιλλίνη/ IPTG/X-Gal

14. IPTG stock 0.1M (200x)
1.2g
50ml H_2O

15. X-Gal 80mg/ml

16. Αμπικιλλίνη stock 100mg/ml (1000x)
50ml H_2O
5000mg Amp

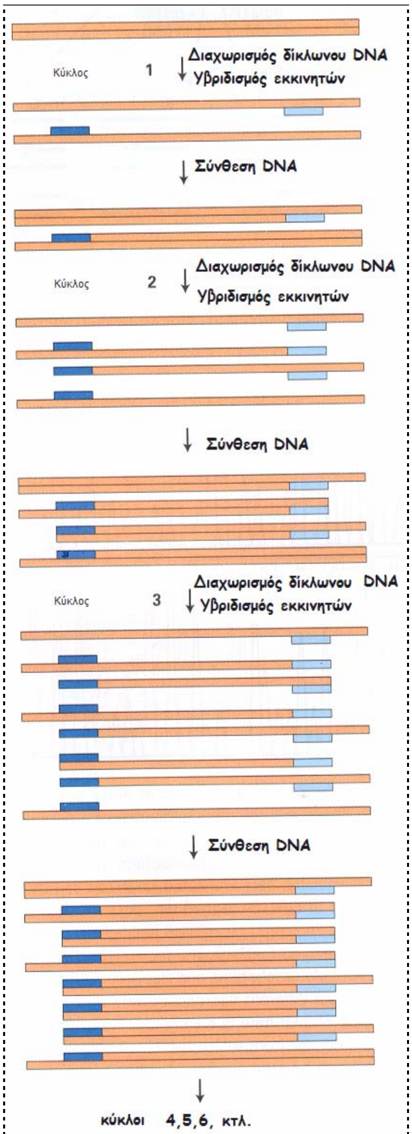
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ (Software)

1. Το πρόγραμμα CLUSTAL X Windows interface of CLUSTAL W
2. DDBJ/EMBL/Gen Bank
3. Microsoft Photo Editor

2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction)

Ένα μεγάλο πρόβλημα στην ανάλυση των γονιδίων είναι ότι τα γονίδια είναι πολύ σπάνιοι στόχοι. Πολλές από τις τεχνικές της μοριακής γενετικής προσπαθούν να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα αυτό, αλλά είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και πολύπλοκες. Η τεχνική PCR προσφέρει την λύση, επιτρέποντας με ένα απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής ακολουθίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εκμεταλλεύεται δυο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA : η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για να αρχίσει η σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δυο κλώνοι ενός δίκλωνου μορίου DNA και χρησιμοποιηθεί ένα ολιγονουκλεοτίδιο που υβριδίζεται σε ένα σημείο του ενός κλώνου, τότε θα αρχίσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου από το σημείο που υβριδίστηκε το ολιγονουκλεοτίδιο – εκκινητής (primer). Επομένως μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δυο εκκινητές που υβριδίζονται εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τον κάθε κλώνο και οι δυο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος (εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Σύνθεση DNA με PCR (5)

Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Διαχωρισμό/Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος περίπου στους 94°C-96°C. Το αντιδρών μίγμα περιέχει το δίκλωνο DNA, τους εκκινητές, τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες και DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται συχνά προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus** και ονομάζεται Taq πολυμεράση, έτσι ώστε να μην μειώνεται η δράση της κατά τους διάφορους κύκλους εξαιτίας της θέρμανσης.

- Ψύξη του μίγματος για να υβριδιστούν οι εκκινητήρες με τους δυο κλώνους. Τα εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο δείγμα – μίγμα σε αντίθεση με τις μακριές αλυσίδες του DNA στόχου, οπότε υβριδίζονται με τα συμπληρωματικά τμήματα του μορίου (DNA στόχου) ενώ η αλυσίδες στόχοι παραμένουν διαχωρισμένες. Η θερμοκρασία ψύξης είναι καθοριστική για την εξειδίκευση της μεθόδου, για αυτό η ακριβής θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Τα υβριδισμένα ολιγονουκλεοτίδια παίζουν τον ρόλο των εκκινητών για την σύνθεση της επιθυμητής αλυσίδας στην παρουσία των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Θέρμανση του μίγματος στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της συγκεκριμένης πολυμεράσης, οπότε λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA.

Όταν η σύνθεση έχει ολοκληρωθεί, το μίγμα θερμαίνεται στους 94°C για να διαχωρίσει τις νεοσυντηθέμενες αλυσίδες. Ακολουθεί πτώση της θερμοκρασίας και λαμβάνει χώρα ένας νέος κύκλος σύνθεσης εφόσον οι εκκινητές είναι σε περίσσεια. Η επανάληψη του κύκλου όπως περιγράφεται παραπάνω οδηγεί σε γρήγορο πολλαπλασιασμό της ακολουθίας που μας ενδιαφέρει. Σε κάθε κύκλο ο αριθμός των αντιγράφων της ακολουθίας μεταξύ των εκκινητήρων διπλασιάζεται, συνεπώς η επιθυμητή ακολουθία αυξάνεται εκθετικά. Μετά από n κύκλους λαμβάνονται 2^n δίκλωνα μόρια DNA. Στους πρώτους κύκλους παράγονται αρκετά μόρια με διαφορετικό μήκος, εξαιτίας της δυνατότητας να επιμηκυνθούν οι νεοσυντηθέμενοι κλώνοι πέρα από την θέση του εκκινητήρα στον απέναντι κλώνο. Όσο όμως αυξάνεται ο αριθμός των κύκλων τα μόρια αποκτούν το επιθυμητό μήκος, με αποτέλεσμα, μετά από πολλούς κύκλους, να επικρατεί το επιθυμητό προϊόν (2,4,5).

Πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για καθένα από τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, με τη σειρά που αναφέρονται παραπάνω:

a) Με τους εκκινητές για το γονίδιο 16S r DNA

* Το βακτήριο αυτό ζει σε θερμές πηγές και το ένζυμο Taq πολυμεράση που παράγει μπορεί να παραμείνει ενεργό ακόμη και μετά τη θέρμανσή του σε 95°C

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 95^0 C για 5’

35 κύκλοι _______________ 95^0 C για 1’, 55^0 C για 1’ και 72^0 C για 2’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

b) Με τους εκκινητές C23O και PHEH

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 52^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

c) Με τους εκκινητές RHDO

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 50^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

d) Με τους εκκινητές Com

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 3’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 1’, 50^0 C για 1’ και 72^0 C για 70’’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

e) Με τους εκκινητές C23DO

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

10 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 60^0 C για 45’’ και 72^0 C για 2’

20 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 53^0 C για 45’’ και 72^0 C για 2’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 10’ και διατήρηση σε 4^0 C

f) Με τους εκκινητές AlkFR2

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 45.1^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

g) Για το γονίδιο AlkFR1

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 48^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’

τελευταίος κύκλος_______ 72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

h) M13 F/R

$1^{ος}$ κύκλος ______________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι _______________ 94^0 C για 45’’, 55^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’

τελευταίος κύκλος_______72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

i) Με τους εκκινητές C23OOR

1ος κύκλος _____________ 94^0 C για 4’

35 κύκλοι ______________94^0 C για 45’’, 55^0 C για 45’’ και 72^0 C για 1’ 30’’

τελευταίος κύκλος_______72^0 C για 8’ και διατήρηση σε 4^0 C

2.4.2 Σχεδιασμός Νέων Εκκινητών

Για τον σχεδιασμό νέων ζευγών εκκινητών για το γονίδιο της διοξυγενάσης των αλκανίων χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των βάσεων του γονιδίου 13 βακτηρίων για τα οποία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία η παραγωγή του γονιδίου αυτού και υπάρχει σε βάση δεδομένων ο κωδικός και αλληλουχία των βάσεων που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι κωδικοί με τους οποίους μπορεί κανείς να τα βρει στην EMBL/GenBank/DBBJ βάση δεδομένων αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.1 υλικά και μέθοδοι. Οι 13 αυτές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ομοσυσχετίστηκαν μεταξύ τους με τη χρήση του προγράμματος Clustal X (εικόνα 2.6).

Αυτές οι ακολουθίες αποτελούν τα κύρια εξελικτικά κλαδιά γνωστών μελών των γονιδίων της υδροξυλάσης των αλκανίων. Έπειτα από παρατήρηση των ομοσυσχετίσεων αναγνωρίστηκαν κάποιες διατηρημένες περιοχές και με βάση το βαθμό διατήρησης τους σχεδιάστηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές (δυο ζεύγη) οι οποίο δοκιμάστηκαν σε βακτηριακά στελέχη και σε δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από υπολείμματα διύλισης πετρελαίου. Στο παράρτημα στον πίνακα 0.1 συνοψίζονται τα κριτήρια επιλογής ακολουθιών για τη χρήση τους ως εκκινητές στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

```
                                         500       510       520       530       540       550       560
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AJ002316_Acinetobacter_sp._ADP  TTAGGCATTTCGATGGGTGCAATCAATGGTATTGCAGTGAATACCGCGCATGAATTGAGCCATAAAGCAG 469
AJ233398-Acinetobacter-calcoac  CTTGGTATTTCGATGGGTGCCATTAATGGTATTGCAATTAATACAGCCCATGAATTAAGCCATAAACATG 466
AJ233397-Pseudomonas-putida-P1  CTTGCCTTGTCACTGGGCATCGTGAATGGCCTAGCGCTTAATACAGGCCACGAACTGGGTCACAAAAAAG 433
AJ245436-Pseudomonas-putida-GP  CTTGCCTTGTCACTGGGTATCGTGAACGGACTAGCGCTCAATACAGGACACGAACTCGGTCACAAGAAGG 433
AJ295164_Alcanivorax-borkumens  CTCGCCCTTTCTCTAGGCATTGTTAATGGCCTGGCACTCAACACAGGCCATGAACTCGGGCATAAAAAAG 448
AJ297269_Rhodococcus_erythropo  CTGGCGATCAGTATCGGTTGTGTCGCAGGAATCGGGATCAACACCGCACACGAGCTCGGTCACAAGAAGG 493
BX842582_Mycobacterium_tubercu  GTGGCGCTGTCGGTCGGTGTGCTTGGCGGCGTCGGTATCAACACCGCCCACGAAATGGGGCACAAGAAGG 502
AJ009587_Prauserella_rugosa_NR  CTGGCGATCACGGTCGGCTGCGTCGGCGGTATCGGCATCAACACCGCCCACGAACTCGGCCACAAGAAGG 469
AJ293306-Burkholderia-cepacia_  TTCGCGCTGTCGCTCGGCGCGGCGACCGGCATCTCGATCAACACCGCGCATGAACTCGGGCACAAGACGA 424
AE004581_Pseudomonas-aeruginos  ACCGTGAT------GGGCGC---------CATCGGCATCACCGTCTCCCACGAACTGATCCACAAGGACC 433
AE004685-Pseudomonas-aeruginos  ACGGTGAT------GGGAGC---------GGTGGGGATCGTCGTCGCCCATGAGCTGATCCACAAGGACT 433
AB110226-Alcanivorax-borkumens  ACCGTAGG------TGGCAT---------TATCGCAATCAATTTGGGGCATGAGTTGATCCACAAAGATC 433
AJ009579-Pseudomonas-fluoresce  ATGGCGATGTCCACTGGCGCGGCCACCGGCATTGCCATCAACATCGCTCATGAGCTGGGGCACAAGAACC 535
Clustal Consensus                  *           **              *     *          ** **  *    ** **      16
Primer AlkF                                                               5’ GSNCAYGARYTSRKBCAYAA 3’

                                        920       930       940       950       960       970       980
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AJ002316_Acinetobacter_sp._ADP  CGCAAGCTTTTTACGGGATTAGTTTATTTGAGATCATTAATTATATCGAGCATTATGGTCTAAAACGCCA 872
AJ233398-Acinetobacter-calcoac  CACAAGCATTTTACGGGATTAGCCTATTCGAAATTATTAACTATATTGAACATTATGGCTTATTGCGCCA 869
AJ233397-Pseudomonas-putida-P1  TTCAGATGGCTTTCGGGTGGTGGCAGTTAACAAGCGCGAACTACATTGAACACTACGGTTTGCTGCGTGA 836
AJ245436-Pseudomonas-putida-GP  TTCAAATGGCTTTCGGTTGGTGGCAGCTGACCAGTGCGAACTATATTGAACATTACGGCTTGCTCCGTCA 836
AJ295164_Alcanivorax-borkumens  TTCAAATGGCCTTCGGCTGGTGGCAGCTGACCAGTGCCAATTATATTGAGCACTACGGACTGCTGCGTGA 851
AJ297269_Rhodococcus_erythropo  TGCAGGCCGTGTTCGGATTCTGTCTGCTCGAAACCGTCAACTACCTCGAACATTACGGACTGAAGCGTCG 896
BX842582_Mycobacterium_tubercu  TCCAGGCAGTCTTCGGCTTCAGCCTGTTAGAGGCCGTCAACTACCTCGAACACTACGGACTGCTACGGCA 917
AJ009587_Prauserella_rugosa_NR  TTCAGGCGGTGGTCGGGTTTTCCCTGCTCGAGATCGTCAACTACATGGAGCACTACGGCATGCTGCGGCA 872
AJ293306-Burkholderia-cepacia_  TCCAGGCCGTGTACGGCGCGTCGCTGCTCGAAGTCGTGAACTACGTCGAGCACTACGGGCTCGGCCGGCG 827
AE004581_Pseudomonas-aeruginos  --CAGTCGGTGATGGCCTTCACCCTGCTGGAGATCGTCAACTACGTCGAGCACTACGGCCTGCATCGGCG 836
AE004685-Pseudomonas-aeruginos  --CAAGCGTTCGTCGCGGTGACCCTGCTGGAGATCATCAACTACGTCGAGCACTACGGCCTGCATCGGCG 836
AB110226-Alcanivorax-borkumens  --CAGAGTTTCTTTGCCGCCCTAGCCTTAGAGATCATTAACTACATTGAACACTACGGTTTGCATCGCCG 836
AJ009579-Pseudomonas-fluoresce  TCCAGGGGATCTACGGCTTCTCTCTGCTGGAGGTGGTCAACTACGTCGAGCACTACGGTCTGCTGCGCCA 938
Clustal Consensus                 **          *            *          ** **  * ** ** ** **   *    **    84
Primer AlkR1                                                      3’ TTRATRBARCTYGTRATRCC 5’

                                          1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AJ002316_Acinetobacter_sp._ADP  ATCGTGACGAATCTGTTTTTATACCAGTTACAACGACATTCAGATCATCACGCTTATCCGACGCGTCCAT 1003
AJ233398-Acinetobacter-calcoac  GTAGTGACCAACTTATTCTTATATCAGTTACAGCGTCACTCAGATCATCATGCTTATCCAACTCGGCCAT 1000
AJ233397-Pseudomonas-putida-P1  ATCGTGTCAAATCTGGTTCTGTTTCACCTTCAACGGCACTCTGATCACCACGCGCACCCAACTCGCTCTT 967
AJ245436-Pseudomonas-putida-GP  ATCGTCTCTAATCTAGTGCTGTTCCACCTTCAGCGGCACTCGGATCACCACGCGCATCCAACACGTTCTT 967
AJ295164_Alcanivorax-borkumens  GTAATGTCGAACCTCATCCTGTTTCATCTGCAACGTCATTCAGATCACCATGCGCATCCTACAAGATCTT 982
AJ297269_Rhodococcus_erythropo  ATCTGCACCAACATCTTCCTGTATCACCTCCAGCGTCACAGCGATCATCACGCGAACCCGACGCGTCGTT 1027
BX842582_Mycobacterium_tubercu  ATCGTCACCAACCTGTTCCTCTACCACCTGCAGCGACACAGCGATCACCACGCCAACCCCACTCGCCGCT 1048
AJ009587_Prauserella_rugosa_NR  ATCGCCACGAACGTGCTGCTGTACCACCTGCAGCGGCACAGCGATCACCACGCGAACCCGGTGCGCCGCT 1012
AJ293306-Burkholderia-cepacia_  GTCGTCACGAACCTGTTCCTGTATCAGCTGCAGCGACACGCGGATCATCATGCGAATCCGACGCGCTCGT 958
AE004581_Pseudomonas-aeruginos  CTCCTGACCAACCTGTTCCTTTTCCACCTGCAGCGCCATTCCGACCACCATGCCTACGCCAAGCGCCGCT 967
AE004685-Pseudomonas-aeruginos  GTCTTCACCAACCTGGTCCTGTTCCATCTGCAACGGCATTCCGACCATCATGCCTTCGCCAAACGCCCCT 967
AB110226-Alcanivorax-borkumens  TTGTTAACTAACTTGGCCCTGTTTCAACTACAGCGCCACAGTGACCACCATGCTTACGCCAAGCGTCGTT 967
AJ009579-Pseudomonas-fluoresce  ATCGTCACCAACATCTTCCTGTTCCAGTTGCAGCGCCACTCCGACCACCACGCCAACCCGACCCGTGCGT 1069
Clustal Consensus                *     * **   *     * *  **   * ** ** **    ** ** ** **     *     *    * 125
Primer AlkR2                                              3’ GTYGCNGTRWSNCTRGTRGTRCC 5’
```

Εικόνα 2. 6 Συσχέτιση των αλληλουχιών των νουκλεοτιδίων των ενζύμων υδροξυλάσης των αλκανίων με το πρόγραμμα Clustal X για τον σχεδιασμό νέων εκκινητών (AlkF, AlkR1, AlkR2)

2.4.3 Εκχύλιση Γενετικού Υλικού από Έδαφος

Η εκχύλιση του DNA έγινε όπως και σε προηγούμενα πειράματα (16) με το Fast DNA SPIN KIT για έδαφος, και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι όπως συστήνει το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, με κάποιες μικρές παραλλαγές, και περιγράφεται με 12 βήματα παρακάτω (33).

Fast DNA SPIN KIT – BIO 101 protocol

1) Ζύγισμα, Προσθήκη 500mg εδάφους σε Lysing Matrix tubes, Ονομασία σωληναρίων – δειγμάτων
2) Προσθήκη 978 μl Sodium Phosphate Ρυθμιστικού διαλύματος και 122μl MT Ρυθμιστικού διαλύματος σε κάθε δείγμα
3) Φυγοκέντριση των (Lysing Matrix Tubes) δειγμάτων σε 14,000Xg για 15’.

4) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα, Προσθήκη 250 μl PPS αντιδραστήρα και ανάμιξη με ανακίνηση με το χέρι 10 φορές

5) Φυγοκέντριση των (Lysing Matrix Tubes) δειγμάτων σε 14,000Xg για 5’, για να καθιζάνει το στερεό υπόλειμμα.

6) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα των 15 μl.

7) Προσθήκη 1ml Binding Matrix Suspension (αιωρήματος στρώματος δέσμευσης του DNA), αφού πρώτα ανακινηθεί.

8) Τα δείγματα τοποθετούνται σε ανακινητή ή ανακινούνται με το χέρι για 2’ για να επιτραπεί η δέσμευση του DNA από το στρώμα. Αφήσαμε για 10’ σε μηχάνημα ανκίνησης. Τοποθετούνται σε πλέγμα για 10’ περίπου , μέχρι να είναι αρκετά διαφανές το υπερκείμενο.

9) Απομακρύνονται 600 μl από το υπερκείμενο προσέχοντας να αποφύγουμε το ήρεμο στρώμα (Binding Matrix). Αφού πετάξουμε το υγρό στα άχρηστα υγρά, ανακινούμε ξανά το αιώρημα το οποίο είναι πλέον συμπυκνωμένο. Μεταφέρουμε περίπου 600-700μl του μίγματος σε ένα SPIN ™ Filter και φυγοκεντρούμε σε 14,000Xg για 1'. Αδειάζουμε τον σωλήνα συλλογής και ανατοποθετούμε το φίλτρο στον σωλήνα και έπειτα ξαναφυγοκεντρούμε.

10) Προσθέτουμε 500μl SEWS-M στο SPIN ™ Filter και φυγοκεντρούμε σε 14,000Xg για 1'. Αδειάζουμε τον σωλήνα συλλογής και ξανατοποθετούμε το φίλτρο στο σωλήνα και έπειτα ξαναφυγοκεντρούμε σε 14,000Xg για 2', για να στεγνώσει από τα υπολείμματα του SEWS-M διαλύματος που χρησιμοποιήσαμε για να ξεπλύνουμε.

11) Απομακρύνονται τα SPIN ™ Filter και τοποθετούνται σε νέο σωλήνα και τοποθετούνται σε φούρνο στους 62^0 C για 2'. Αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.

12) Προστίθενται 50μl DES (καθαρό νερό) και 25μl Tris CL 10 mM pH 8 και απαλά ανακατεύεται το στρώμα της σιλικόνης στο φίλτρο με την πιπέτα ή με κτύπημα με το δάχτυλο για να έχουμε ικανοποιητική έκλυση του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 14,000Xg για 1' για να εκλυθεί το DNA στον σωλήνα συλλογής.

2.4.4 Βελτίωση Συνθηκών Πολλαπλασιασμού με τους νέους Εκκινητές

Το πρόγραμμα πολλαπλασιασμού στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, με τους νέους εκκινητές για το γονίδιο της μονοοξυγενάσης των αλκανίων διαπιστώθηκε με τον σχεδιασμό ενός πειράματος που καλείται 'gradient PCR' και εφαρμόστηκε με τη βοήθεια του οργάνου PCR express HYBAID και κατάλληλου προγραμματισμού. Παρακάτω φαίνεται ο τρόπος διάταξης των μεμονωμένων σωλήνων, στις θέσεις του οργάνου. Κάθε μια από αυτές αντιπροσωπεύει διαφορετική θερμοκρασία. Οι σωλήνες της Αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης έχουν κωδικοποιηθεί με διαφορετικό χρώμα που αντιστοιχεί στα δύο διαφορετικά ζεύγη των εκκινητών που περιλαμβάνουν, κόκκινο για τα F/R1 και κίτρινο για τα F/R2. Οι θέσεις των διαφορετικών θερμοκρασιών που επιλέχθηκαν βασίζονται σε προηγούμενα πειράματα που έγιναν και με τα δυο ζεύγη των εκκινητών απευθείας στο δείγμα υπό εξέταση. Οι θερμοκρασίες αυτές διαφέρουν για τα δυο ζεύγη των εκκινητών και αντιστοιχούν σε 45,1 ^{0}C στη θέση 1, 47,7^{0}C στη θέση 4, 49,4^{0}C στη θέση 5, 51,4 ^{0}C στη θέση 6, 53,3^{0}C στη θέση 7, 57,6^{0}C στη θέση 9 και 60,2^{0}C στη θέση 12.

Στο πρόγραμμα αυτό το μηχάνημα ορίζεται να λειτουργεί με διαφορετική θερμοκρασία σε κάθε μια από τις σημειωμένες θέσεις, που σημαίνει ότι σε κάθε διακεκριμένη θέση τρέχουν τόσα διαφορετικά προγράμματα όσες και οι διαφορετικές θερμοκρασίες, δηλαδή 7 στην συγκεκριμένη περίπτωση. Στον πίνακα 2.2 αναφέρονται λεπτομερώς αυτά, και φαίνεται ότι η θερμοκρασιακή διαφορά βαθμιαία αυξανόμενη, έχει προγραμματιστεί να είναι διαφορετική μόνο στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, στο στάδιο δηλαδή όπου οι εκκινητές υβριδίζονται με το DNA στόχο.

Επιπλέον της εφαρμογής της διαφορετικής θερμοκρασίας έχει εφαρμοστεί και διαφορετική συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, με την σημασία που περιγράφεται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες φέρουν κωδικούς, A, B, και Γ αναφορικά σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου (Mg^{++})[16], όπου A αντιστοιχεί σε 1,5mM, B σε 2,5mM και Γ σε 4mM Mg^{++} πίνακας 2.1. Η διάταξη των ειδικών δοκιμαστικών σωλήνων φαίνεται με όλες τις κωδικοποιήσεις στον πίνακας 2.3.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μόνο θετικό και αρνητικό δείγμα για την ανίχνευση των βέλτιστων συνθηκών δραστηριοποίησης των εκκινητών, οι οποίες αργότερα εφαρμόζονται στο

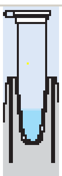
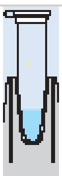
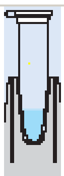
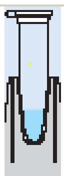
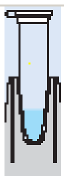
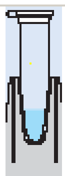
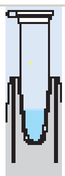
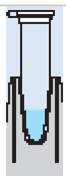
[16] Τα ιόντα μαγνησίου Mg^{+2} σχηματίζουν συμπλέγματα με dNTPs και την μήτρα (template) DNA για να παράγουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.Η συγκέντρωση των ελεύθερων Mg^{+2} ιόντων, εξαρτάται από τη συγκέντρωση συστατικών όπως των dNTPs, ελεύθερων πυροφοσφωρικών ριζών (DDi) και EDTA (π.χ TE Buffer). Αυτά τα συστατικά δεσμεύουν τα ιόντα μέσω αρνητικών φορτίων. Έτσι η συγκέντρωση των dNTPs θα πρέπει πάντα να είναι υψηλότερη από τη συγκέντρωση αυτών των συστατικών. Η βέλτιστη συγκέντρωση καθορίζεται εμπειρικά και ποικίλλει μεταξύ 1mM – 5mM. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση Mg^{+2} είναι 1.5 με συγκέντρωση 200μM. Επιπλέον συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου στην αντίδραση μπορεί να αυξήσει μη συγκεκριμένη δέσμευση εκκινητών και να αυξήσει μη συγκεκριμένο ‘ θόρυβο’ της αντίδρασης, Από την άλλη πολύ λίγη ποσότητα Mg^{+2} στην αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Η τελική συγκέντρωση των dNTPs θα έπρεπε να είναι μεταξύ 50 - 500μM, η ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι 200μM.. Εμείς χρησιμοποιούμε αρκετά μεγάλη τελική συγκέντρωση Mg^{+2}. Πρέπει να αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των dNTPs. Η αύξηση των dNTPs μειώνει τη συγκέντρωση των ελεύθερων Mg^{+2} εμποδίζοντας τη δραστικότητα του ενζύμου της πολυμεράσης.

δείγμα υπό εξέταση για την ανίχνευση της ύπαρξης των συγκεκριμένων γονιδίων. Ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA που εκχυλίστηκε από καλλιέργεια βακτηρίων του είδους *Alkanivorax borcumensis*, που έχει αναφερθεί ότι περιέχει το εν λόγω γονίδιο, ενώ ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό, για τον έλεγχο της μόλυνσης.

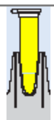
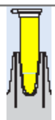
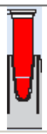
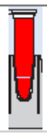
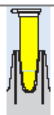
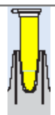
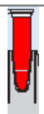
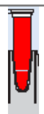
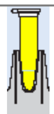
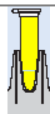
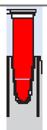
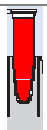
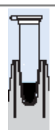
Πίνακας 2. 1

	1.5mM Mg (A)	**2.5mM Mg (B)**	**4mM Mg (Γ)**	
Buffer 10* (Mg)	5 μl	5 μl	5 μl	5μl/50μl
dNTPs	1 μl	1 μl	1 μl	
Primer 1	1 μl	1 μl	1 μl	
Primer 2	1 μl	1 μl	1 μl	
Taq	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	
DNA	2 μl	2 μl	2 μl	
H_2O	39 μl	37 μl	34 μl	
Mg^{++}	-	2 μl	5 μl	
BSA	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	
Volume	50 μl	50 μl	50 μl	

Πίνακας 2. 2

45,1^{0}C	45,5^{0}C	45,5^{0}C	47,7^{0}C	49,4^{0}C	51,4^{0}C	53,3^{0}C	55,3^{0}C	57,6^{0}C	59^{0}C	59,7^{0}C	60^{0}C
											

Πίνακας 2. 3

45,1^{0}C	47,7^{0}C	49,4^{0}C	47,7^{0}C	Τ/Εκκινητές		C Mg^{++}	
				AlkFR1		A 1,5mM	
				AlkFR2			
				AlkFR1		B 2,5mM	
				AlkFR2			
				AlkFR1		Γ 4mM	
				AlkFR2			

2.4.5 Δημιουργία Βιβλιοθήκης Κλώνων

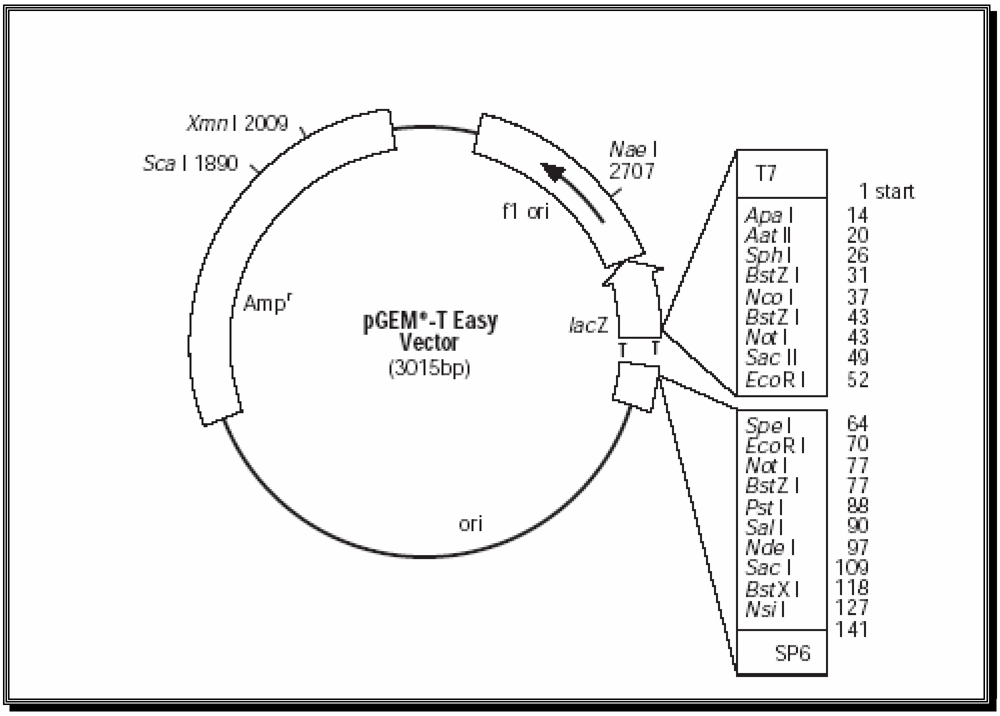
Για να διερευνηθεί η παραλλακτικότητα των αλληλουχιών των προϊόντων πολλαπλασιασμού από το περιβαλλοντικό DNA, κατασκευάστηκε μια βιβλιοθήκη κλώνων των τμημάτων 16S rDNA (με δυο σετ εκκινητών) και Alk FR (με δυο σετ εκκινητών), αφού πρώτα τα τμήματα αυτά καθαρίστηκαν από υπολείμματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τη χρήση του Qiaquick PCR cleaning kit (Qiagen) (περιγραφή στο κεφάλαιο 2.4.5.2).

2.4.5.1 Πλασμίδια- Μετασχηματισμός

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA τα οποία είναι ξεχωριστά από το χρωμοσωμικό γενετικό υλικό του κυττάρου. Αυτό το εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό, το οποίο υπάρχει φυσικά στα βακτήρια και σε κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως οι ζύμες, υπάρχουν με μια παρασιτική ή συμβιωτική σχέση στο κύτταρο – ξενιστή. Όπως το χρωμοσωμικό DNA του κύτταρου – ξενιστή, και το πλασμιδιακό DNA διπλασιάζεται πριν από κάθε κυτταρική διαίρεση. Κατά τη διάρκεια κάθε κυτταροδιαίρεσης αντίγραφα του πλασμιδιακού DNA διαχωρίζονται σε κάθε θυγατρικό κύτταρο, εξασφαλίζοντας συνεχόμενη αναπαραγωγή του πλασμιδίου μέσω των επακόλουθων γενεών του κυττάρου ξενιστή [4].

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ευρέως στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA είναι αυτά που πολλαπλασιάζονται στο βακτήριο *E. Coli.* Οι ερευνητές έχουν κατασκευάσει αυτά τα πλασμίδια για να βελτιώσουν τη χρήση τους ως φορείς στην τεχνική της κλωνοποίησης του DNA. Τα πλασμίδια αυτά περιλαμβάνουν τρεις βασικές περιοχές για την κλωνοποίηση του DNA : μια περιοχή αναδιπλασιασμού, έναν δείκτη που να επιτρέπει την επιλογή και μια περιοχή όπου μπορούν να εισαχθούν εξωγενή τμήματα DNA [εικόνα 2.6]. Τα ένζυμα του κυττάρου ξενιστή αναπαράγουν ξεκινώντας από την περιοχή αναδιπλασιασμού (replication origin - ORI), μια συγκεκριμένη ακολουθία 50 -100 ζευγών βάσεων. Από τη στιγμή που ο αναδιπλασιασμός του DNA έχει ξεκινήσει στην περιοχή ORI, συνεχίζει γύρω από το κυκλικό πλασμίδιο ανεξάρτητα από την ακολουθία των νουκλεοτιδίων. Συνεπώς οποιαδήποτε ακολουθία έχει εισαχθεί σε τέτοιο πλασμίδιο αναδιπλασιάζεται με το υπόλοιπο πλασμιδιακό DNA.

Όταν τα κύτταρα του βακτηρίου DNA *E. Coli* αναμιχθούν με ανασυνδυασμένα συστήματα μεταφοράς DNA υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω, ένα μικρό τμήμα αυτών των κυττάρων θα παραλάβει το πλασμιδιακό DNA, με μια διαδικασία γνωστή ως μετασχηματισμός. Τυπικά 1 στα 10 000 κύτταρα καταφέρνουν να παραλάβουν ένα πλασμίδιο, και το κύτταρο αυτό γίνεται μετασχηματισμένο. Έπειτα από επώαση του μίγματος των 'ικανών' βακτηρίων με τα πλασμίδια, τα κύτταρα που έχουν παραλάβει το πλασμίδιο μπορούν εύκολα να επιλεχθούν από ένα μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων. Όταν ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που περιέχει το τμήμα του DNA, μετασχηματίζει ένα κύτταρο *E. Coli* όλα τα κύτταρα – απόγονοι που προκύπτουν από το αρχικό μετασχηματισμένο κύτταρο θα περιέχουν πλασμίδια με το ίδιο εισερχόενο/ ξένο DNA. Με αυτόν τον τρόπο το αρχικό τμήμα του DNA αναδιπλασιάζεται στην αποικία των κυττάρων και τελικά υπάρχει σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό αντιτύπων. Εφόσον όλα τα κύτταρα σε μια αποικία προέρχονται από ένα και μόνο μετασχηματισμένο προγονικό κύτταρο, συνιστούν μια αποικία κλώνων και το αρχικό τμήμα DNA που έχει εισαχθεί στο πατρικό πλασμίδιο κλωνοποιημένο DNA ή DNA κλώνος [εικόνα 2.8].

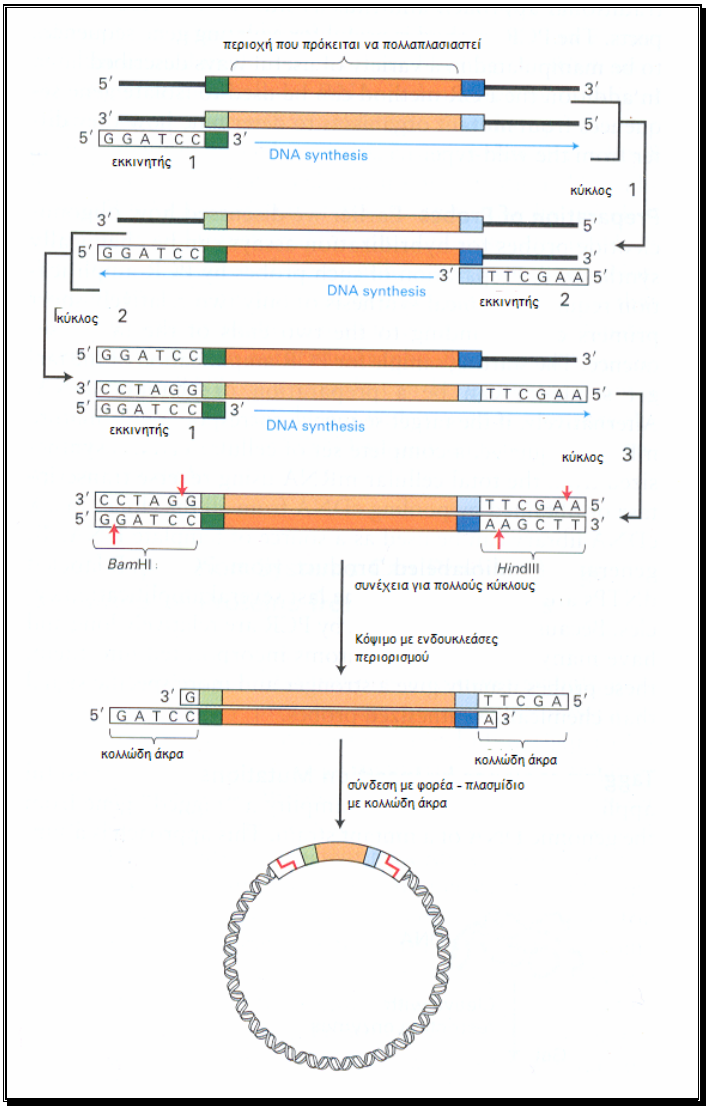


Εικόνα 2. 5 pGEM®-T Easy Vector (38)

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
lacZ start codon	180
lac operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
lac operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Εικόνα 2. 6 (38)



Εικόνα 2. 7 Ανασυνδυασμός πλασμιδίο

Η δημιουργία της βιβλιοθήκης κλώνων αναμενόμενου μεγέθους που πολλαπλασιάστηκαν από το δείγμα του αποβλήτου κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pGEM-T[17] το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης, μετασχηματίζοντας ικανή καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli* της φυλής JM109, χρησιμοποιώντας το pGEM-T Easy Kit (Promega) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (38).Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιλαμβάνει τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων, που περιγράφεται παρακάτω :

- Φυγοκέντριση των σωλήνων που περιέχουν το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και τον φορέα κλωνοποίησης – πλασμίδιο.
- Ανάμιξη των πλασμιδίων, βακτηρίων, ενζύμου λιγάσης και του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με την αναλογία που φαίνεται στην εικόνα 2.8
- Ανάμιξη των αντιδρώντων με φυγοκέντριση
- Αφήνουμε το μίγμα σε 4^0 C για 3 ώρες
- Αφήνουμε συμπληρωματικά σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα

Στο δεύτερο βήμα περιγράφεται η διαδικασία εισόδου των πλασμιδίων στα κύτταρα του βακτηρίου

- Τοποθέτηση κενών – κωδικοποιημένων σωλήνων σε πάγο
- Τοποθέτηση καλλιέργειας βακτηρίων σε πάγο, από τους-70^0 C όπου έχουμε κρατήσει, για περίπου 5 λεπτά
- Προσθήκη 2μl της αντίδρασης συγκόλλησης από το πρώτο βήμα στους σωλήνες και μεταφορά 50 περίπου μl από το βακτήριο
- Ανάμιξη με απαλή ανακίνηση και τοποθέτηση για 20 λεπτά στον πάγο
- Μεταφορά σε θερμοκρασία 42^0 C όπου έχουμε κρατήσει, για περίπου 5 λεπτά για 45'', για την επίτευξη θερμοκρασιακού σοκ

[17] Τα pGEM®-T Easy Vector Systems(a,b) είναι βολικά συστήματα για την κλωνοποίηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Οι vectors προετοιμάζονται με κόψιμο με EcoR V των pGEM®-5Zf(+)(b) and pGEM®-T Easy Vectors και την προσθήκη μιας 3΄ θυμιδίνης και στα δυο άκρα. Αυτά τα δυο ξεχωριστά T overhangs στα άκρα ενσωμάτωσης βελτιώνουν κατά πολύ την αποδοτικότητα της ένωσης του προϊόντος της PCR με τα πλασμίδια, παρεμποδίζοντας την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου-φορέα, παρέχοντας ταυτόχρονα συμβατές περιοχές υβριδισμού overhangs στα σημεία ενσωμάτωσης-εισαγωγής. Αυτά παράγονται από συγκεκριμένες θερμοσταθερές πολυμεράσες, οι οποίες προσθέτουν συχνά, μια δεοξυαδενοσίνη, με ένα τρόπο ανεξαρτήτου από την ύπαρξη μήτρας, στο 3' άκρο των πολλαπλασιασμένων τμημάτων.(38)

- Επανατοποθέτηση στον πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 950 ml SOC διαλύματος και τοποθέτηση για 1,5 – 2 ώρες στους 37^0 C όπου έχουμε κρατήσει, για περίπου 5 λεπτά με ανακίνηση (150rpm)
- Μεταφορά 100μl από κάθε καλλιέργεια σε πιάτα με θρεπτικό υπόστρωμα L. B. και αμπικιλλίνη/ IPTG/X-Gal καθώς και αραιώσεις των 10^{-1} και 10^{-2}.
- Τα μετασχηματισμένα κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* επωάζονται σε 37°C για 16 – 24 ώρες.
- Έπειτα διατηρούνται σε 4°C
- Οι αποικίες που δημιουργούνται ξεχωρίζουν μεταξύ τους σε αυτές που έχουν το νέο τμήμα του DNA, και έχουν χρώμα άσπρο επειδή είναι αρνητικές στην αντίδραση της γαλακτοσιδάσης[18].

Ακολουθεί μεταφορά μία προς μία των αποικιών σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα οι οποίες διαλύονται σε 50 ml από 100 ul Tris-Cl 10 mM pH 8.0, θερμαίνονται σε 95°C για πέντε λεπτά και φυγοκεντρούνται για ένα λεπτό.

	Standard Reaction
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5μl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1μl
PCR product	Xμl*
Control Insert DNA	–
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)	1μl
deionized water to a final volume of	10μl

Εικόνα 2. 8 Τυπική αντίδραση όπου προστέθηκαν 3μl του προϊόντος της αύσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που θέλουμε να εισάγουμε. (38)

Η αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τους εκκινητές M13 γίνεται είτε απευθείας, είτε αργότερα εφόσον τα δείγματα με τις αποικίες διατηρηθούν σε – 20 °C και πριν

[18]Το γονίδιο lac - Z κωδικοποιεί την β – γαλακτοσιδάση που καταλύει την υδρόλυση του δισακχαρίτη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Επιπλέον αντιδρά ενζυμικά με το υστατικό X – Gal με αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε χρώματος. Παρουσία στο θρεπτικό υπόστρωμα του X-Gal τα βακτήρια που εκφράζουν το γονίδιο lacZ έχουν χρώμα γαλάζιο ενώ αυτά που δεν το εκφράζουν έχουν χρώμα άσπρο.(37)

από την αντίδραση προηγηθεί φυγοκέντριση που βοηθάει στην καθίζηση τμημάτων των βακτηρίων που δεν απομακρύνθηκαν.

2.4.5.2 Καθαρισμός Τμημάτων DNA

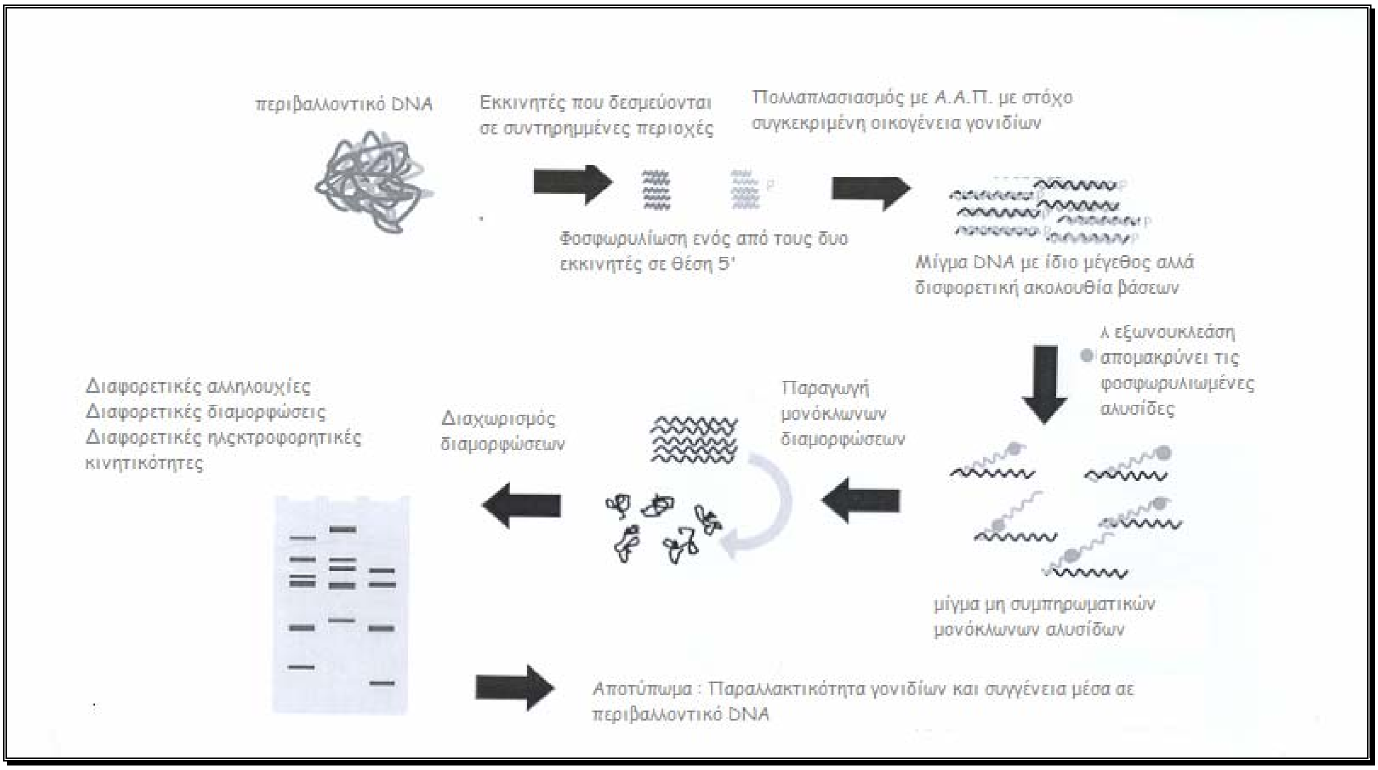
Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων από πλεόνασμα νουκλεοτιδίων , που δεν έχουν εισέλθει στις συντιθέμενες αλυσίδες. Τα βήματα που ακολουθούν περιγράφουν τη διαδικασία όπως στο πρωτόκολλο.

- Εισαγωγή τις στήλες QiaQuick στους σωλήνες – υποδοχείς.
- Πρόσθεση 500 μL PB Qiagen buffer, ανάλαφρη ανακίνηση με την πιπέτα και στη συνέχεια φυγοκέντριση για 1 λεπτό, στη μέγιστη ταχύτητα.
- Απομάκρυνση του flow-through και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα –υποδοχέα
- Πλύσιμο: προσθήκη 750 μL PE Qiagen ρυθμιστικού διαλύματος στην στήλη και φυγοκέντριση για ένα λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- Επανάληψη φυγοκέντρισης για ένα λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα, έχοντας απομακρύνει το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο το οποίο και έχει διαπεράσει την στήλη.
- Απόρριψη του σωλήνα υποδοχής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα1.5 mL.
- Εφαρμογή 50 μL EB Qiagen ρυθμιστικού διαλύματος στο κέντρο της στήλης
- Φυγοκέντριση σε μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό.
- Ξήρανση σε φυγοκέντριση υπό κενό

2.4.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – Πολυμορφισμός Μονόκλωνης Αλυσίδας (PCR - SSCP)

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει/ στηρίζεται στον διαχωρισμό μονόκλωνων προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, όπως έχει περιγραφεί από Schwieger (35).

Οι αλληλουχίες του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε πολλαπλασιάζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με τη χρήση εκκινητών εκ των οποίων ο ένας έχει το 5' άκρο φωσφωρυλιωμένο, για να αναγνωριστεί από την λ εξωνουκλεάση (NEB), η οποία χρησιμεύει για την καταστροφή της αυτής αλυσίδας του δίκλωνου DNA (εικόνα 2.9). Έτσι τα προϊόντα της PCR, εκχυλίζονται από πηκτή αγαρόζης και ενώ οι φωσφωρυλιωμένες αλυσίδες καταστρέφονται οι υπόλοιπες καθαρίζονται με Qiaquick PCR Cleaning Kit (Qiagen), ξηραίνονται σε φυγοκέντριση υπό κενό. Ακολουθεί προσθήκη ρυθμιστικού δυαλύματος 6 μl (95% formamide, 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylene cyanol), και ακολουθεί αποδιάταξη σε 94 °C για 5 λεπτά, στιγμιαία ψύξη σε παγωμένο υδατόλουτρο για 3 λεπτά. Οι συνθήκες διαχωρισμού είναι 250V (~30 mA) για 18 h σε σταθερή θερμοκρασία 20°C σε πηκτή μεγέθους 20 cm x 20 cm x 0,75 mm 0.625X MDE και σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE (Sambrook, 1989). Η συσκευή που χρησιμοποιείται είναι ένα σύστημα για PCR-SSCP (Bio-Rad) το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια συσκευή κρύου υδατόλουτρου (Lauda E100). Για την ανίχνευση των διαχωρισμένων μονόκλωνων αλυσίδων γίνεται χρώση με silver, όπως έχει αναφερθεί από Bassam (30). Οι ηλεκτροφορητικές κινητικότητες των μονόκλωνων αλυσίδων είναι διαφορετικές λόγω διαφορετικής διάταξης των αλληλουχιών στο χώρο, ακόμη και με ένα μόνο νουκλεοτίδιο διαφορετικό, αντιπροσωπεύονται από διαφορετικές μπάντες. Οι μπάντες αυτές αποχωρίζονται από την αποξηραμένη πηκτή και το DNA που περιέχεται εκχυλίζεται με την εφαρμογή της μεθόδου "Crush and Soak" (14). Έπειτα ακολουθεί πολλαπλασιασμός των τμημάτων αυτών με PCR και τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τον πολλαπλασιασμό του δίκλωνου τμήματος. Οι μπάντες που προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνικής PCR-SSCP ποσοτικοποιούνται με την χρήση του προγράμματος Imagequant Software (Molecular Dynamics).



Εικόνα 2. 9 Σχηματική αναπαράσταση τη τεχνικής PCR – SSCP (Polymerase Chain Reaction – single Strand Conformation Polymorphism)

2.4.7 Αντίδραση με Big Dye

Η αντίδραση για την ανάλυση της ακολουθίας των βάσεων των απομονωμένων τμημάτων DNA έγιναν με την χρήση του Big Dye 1.0 (Applied Biosystems)

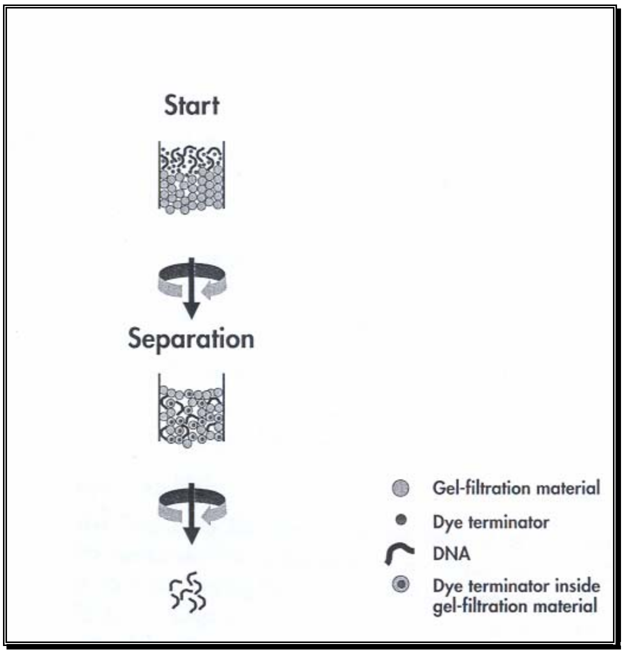
2.4.8 Καθαρισμός του DNA από Big Dye

Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης « sequencing reaction » με το « DyeEx 2.0 Spin protocol for dye-Terminator Removal » (39) όπως ακριβώς αναφέρει το πρωτόκολλο, ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα :

- Απαλή ανακίνηση της στήλης για καλή ανάμιξη του μίγματος
- Ανοίγοντας το καπάκι της στήλης κατά ¼ προς αποφυγή δημιουργίας κενού μέσα στον φυγοκεντρικό σωλήνα,
- Αποκοπή της βάσης της στήλης και τοποθέτηση της σε συλλεκτικό σωλήνα που παρέχεται..
- Φυγοκέντριση για τρία λεπτά σε 2800 rpm Heraeus Biofuge 15 microcentrifuge [19]
- Προσεκτική μεταφορά της στήλης σε 1.5 ml σωλήνα και σιγανή μεταφορά του δείγματος (sequencing reaction 20μl) στη στήλη.
- Φυγοκέντριση για τρία λεπτά σε 2800 rpm Heraeus Biofuge 15 microcentrifuge
- Απομάκρυνση της στήλης από τον μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου έχει συλλεχθεί το DNA του δείγματός μας καθαρό και
- Ξήρανση τους δείγματος σε φυγόκεντρο υπό πίεση.
- Τελικά το δείγμα του καθαρού DNA είναι έτοιμο είτε για να προωθηθεί για την ανάλυση της ακολουθίας των βάσεων του αμέσως είτε αποθηκεύεται σε -20 ^{0}C.

[19] Όλα τα βήματα φυγοκέντρισης εκτελούνται σε 750 X g σε ένα συμβατικο μικροφυγόκεντρο. Η κατάλληλη ταχύτητα για κάθε φυγόκεντρο μπορεί να υπολογιστεί με βάση τον τύπο rpm= 1000X √750/1.12r (όπου r= radius of rotor in mm)

Η διαδικασία διαχωρισμού φαίνεται στην εικόνα 2.10



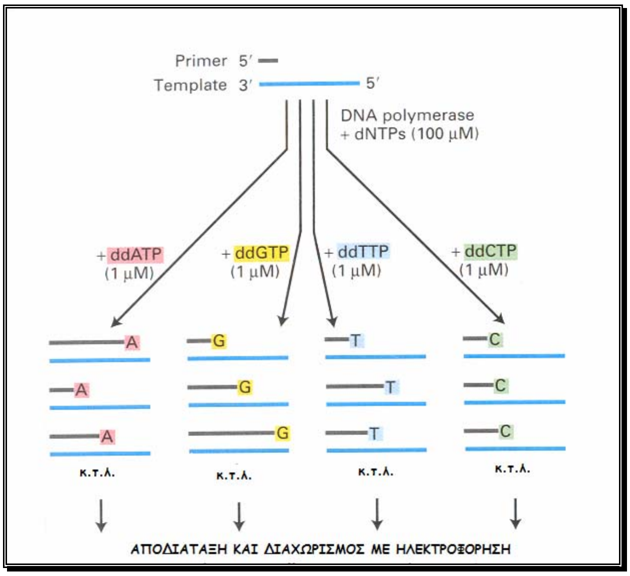
Εικόνα 2. 10 Διαδικασία Διαχωρισμού

2.4.9 Εξακρίβωση Αλληλουχίας Βάσεων Νουκλεοτιδίων

Η ανάλυση των αλληλουχιών των DNA έγινε με τη χρήση 3100 ABIPRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έτσι κατασκευάστηκαν συμπληρωματικές αλληλουχίες με το πρόγραμμα Gene Codes Corp version 4.0.5. Από κάθε είδος ελήφθησαν αλληλουχίες 5' – 3'. Αυτές οι πληροφορίες χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθούν τα πιο κοντινά συγγενικά είδη / φυλές για τα τμήματα του γονιδίου 16s rRNA στην βάση δεδομένων Ribosomal Database Project II με το πρόγραμμα Sequence Aligner Program, και για τα τμήματα του γονιδίου Alk (υδροξυλάσης των αλκανίων) στην βάση δεδομένων GenBank με την χρήση του προγράμματος BLASTX στο NCBI.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA βασίζεται στη χρήση 2',3'- διδεοξυνουκλεοτιδίων τα οποία είναι ανάλογα των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει κλωνοποιείται σε ένα πλασμίδιο (2.4.5). Στη συνέχεια αφού απομονωθεί πλασμιδιακό DNAαυτό κόβεται με ένα ένζυμο περιορισμού σ' ένα σημείο έξω από την περιοχή που μας ενδιαφέρει. Προστίθεται ένα συνθετικό μονόκλωνο μόριο έναρξης το οποίο είναι συμπληρωματικό προς έναν από τους DNA κλώνους. Το μίγμα DNA και μορίου έναρξης θερμαίνεται στους 100 (γίνεται αποδιάταξη της δίκλωνης δομής του DNA) και κατόπιν ψύχεται πολύ γρήγορα ώστε να υβριδιστεί το μόριο έναρξης με τον συμπληρωματικό DNA κλώνο. Στη συνέχεια το δείγμα χωρίζεται σε 4 κλάσματα και το καθένα περιέχει τα τέσσερα νουκλεοτίδια και ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο. Τέλος προστίθεται η πολυμεράση χρησιμοποιώντας το μόριο έναρξης για να ξεκινήσει και συνθέτει το συμπληρωματικό κομμάτι DNA χρησιμοποιώντας το υπάρχον κομμάτι σαν εκμαγείο. Η σύνθεση σταματά στο σημείο που η πολυμεράση ενσωματώνει στο το διδεοξυνουκλεοτίδιο. Η τυχαία ενσωμάτωση του διδεοξυνουκλεοοτίδιου παράγει πολλά κομμάτια που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Έτσι καθένα από αυτά τα 4 δείγματα περιέχει όλα τα πιθανά κομμάτια τα οποία διαφέρουν στο μήκος, τον αριθμό των νουκλεοτιδίων πρόλαβαν να ενωθούν πριν την ενσωμάτωση ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου και στο είδος του. Έπειτα ακολουθεί αποδιάταξη των δίκλωνων δομών τα οποία αναλύονται με ηλεκτροφόρηση, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.11.

Οι πληροφορίες αυτές με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή αυτοματοποιούνται και παίρνουμε ηλεκρτρογραφήματα (applied biosystems). Οι πληροφορίες αποθηκεύονται και μπορούν να επεξεργαστούν με ειδικά προγράμματα επεξεργασίας.



Εικόνα 2. 11 Σχηματική αναπαράσταση της αρχής στην οποία είναι βασισμένη η ανάλυση των αλληλουχιών των βάσεων του DNA από τον αυτόματο αναλυτή – sequencer.

2.4.10 Κατασκευή Φυλογενετικών Δέντρων

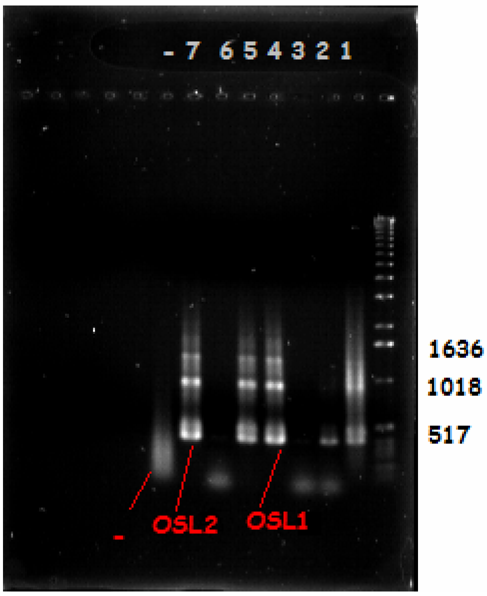
Για την κατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν και αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν από βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CLUSTAL X 1.8 για την δημιουργία ομοσυσχετίσεων πολλαπλών αλληλουχιών DNA (Thompson, 1997).

Για την μετάφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GeneDoc (version 2.6.001).

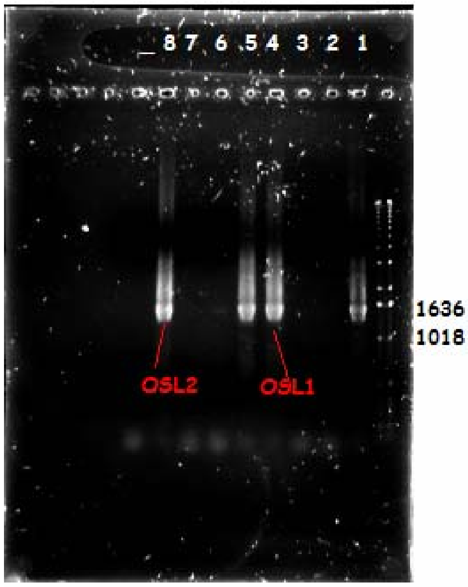
Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με την διαθέσιμη επιλογή neighbor-joining (N-J), ενώ η σταθερότητα του γραφήματος στηρίζεται μέσω της ανάλυσης Bootstrap με τιμές μεγαλύτερες από 50% σε 1000 επαναλήψεις, όπως και φαίνεται στα σημεία – κόμβους.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων της αλυσιδωτής αντίδρασης του DNA, που εκχυλίστηκε από τα περιβαλλοντικά δείγματα, με τους εκκινητές COM και 27F 1453R 16S rDNA για το καλά διατηρημένο 16S rDNA γονίδιο που κωδικοποιεί την μεγάλη υπομονάδα του ριβωσωμικού RNA των βακτηρίων εικόνα 3.A και 3.B αντίστοιχα, έδειξε την ύπαρξη DNA στα δείγματά μας εκτός από το δείγμα με την ένδειξη D, που αντιπροσωπεύει χώμα από την περιοχή διαχείρισης της πετρελαϊκής λάσπης έπειτα από την πάροδο 14 μηνών από την εφαρμογή του αποβλήτου στο πεδίο. Αυτό που επίσης παρατηρούμε είναι το έντονο σήμα που ακολουθεί το δείγμα υπό την ένδειξη OSL.

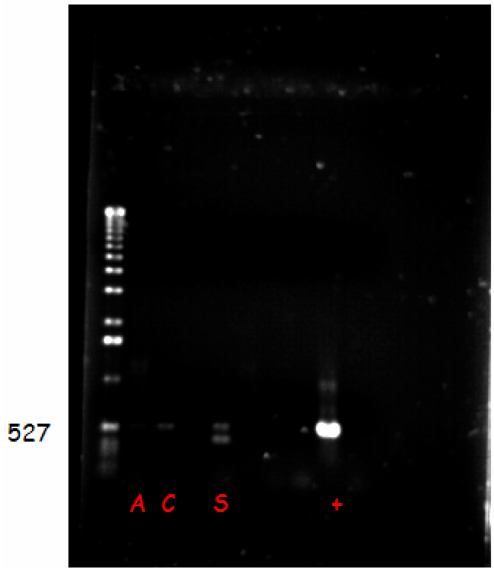


Εικόνα 3. A PCR COM - ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 1, 2 : όπου 1, 2, 3, 4 αντιπροσωπεύουν τα δείγματα A, C, D, OS L από την πρώτη εκχύλιση αντίστοιχα και,5, 6, 7, - A, D, OSl , και το αρνητικό δείγμα.

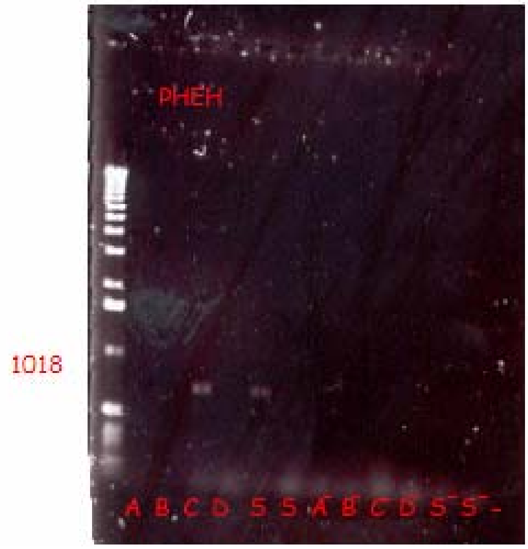


Εικόνα 3. B PCR 16S rRNA - ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τα καταβολικά γονίδια με εκκινητές που αναφέρονται στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι» δεν έδειξε θετικά αποτελέσματα παρά μόνο για τα γονίδια 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης, υδροξυλάση της φαινόληςς και υδροξυλάσης των αλκανίων με τους αντίστοιχους εκκινητές C23O, PHEH, AlkFR1 και C23DO, στις εικόνες 3.C, 3.D, 3.E και 3.G.

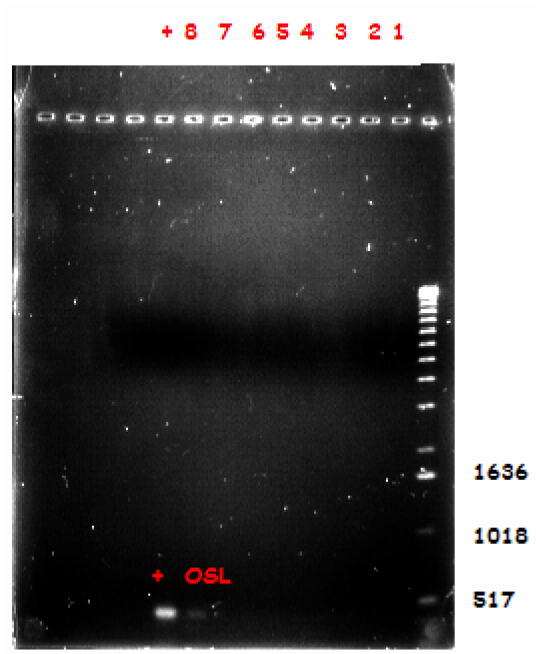


Εικόνα 3-C Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τους εκκινητές C23O για το γονίδιο της 2, 3 διοξυγενάσης της κατεχόλης, *Pseudomonas putida* με θετικό δείγμα

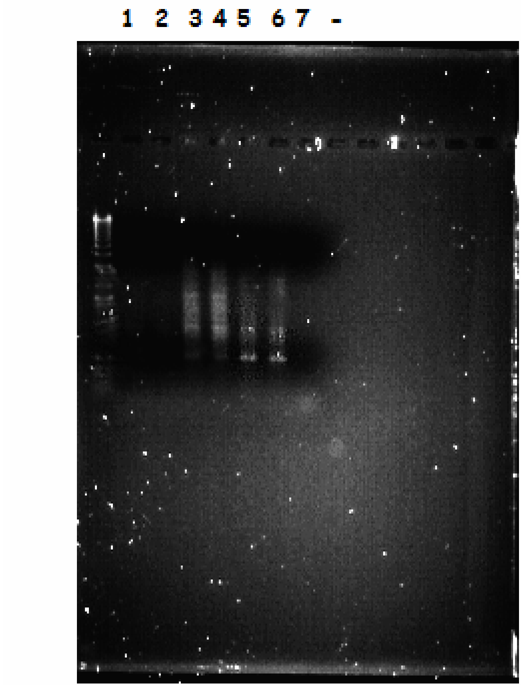


Εικόνα 3. D Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τους εκκινητές PHEH για το γονίδιο της υδροξυλάση της φαινόληςς

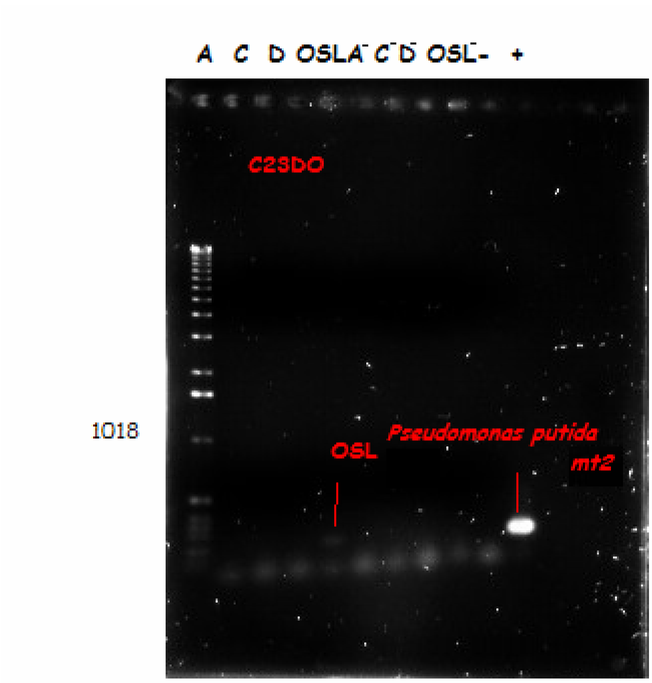
Η ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων του πειράματος για την βελτίωση των συνθηκών αντίδρασης των νέων εκκινητών της υδροξυλάσης των αλκανίων, εικόνα 3.F και 3.E, έδειξε ότι έχουμε καλό σήμα όταν το πρόγραμμα της αντίδρασης είναι αυτό που αντιπροσωπεύει η θέση αυτή στην οποία αντιστοιχεί συγκέντρωση ιόντων Μαγνησίου 4mM για θερμοκρασίες β' βήματος του δευτέρου σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης 47,7^{0}C 45,1^{0}C, για τα ζεύγη AlFR1 AlkFR2 αντίστοιχα, συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανίχνευση του γονιδίου της υδροξυλάσης των αλκανίων από τα περιβαλλοντικά δείγματα, εικόνα 3.E, 3.I.



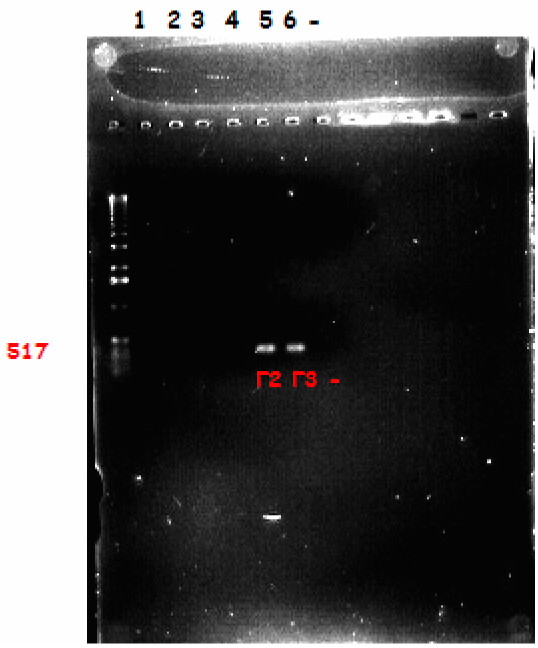
Εικόνα 3. EAlk FR1, με *A. borcumensis* θετικό δείγμα



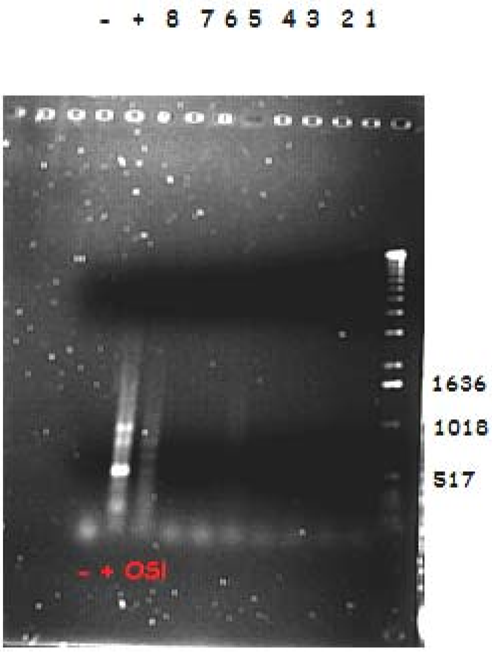
Εικόνα 3. FGradient MG-T, AlkFR2, με A. borcumensis



Εικόνα 3. G



Εικόνα 3. H Gradient Mg – T.AlkFR1, με *A. borcumensis*



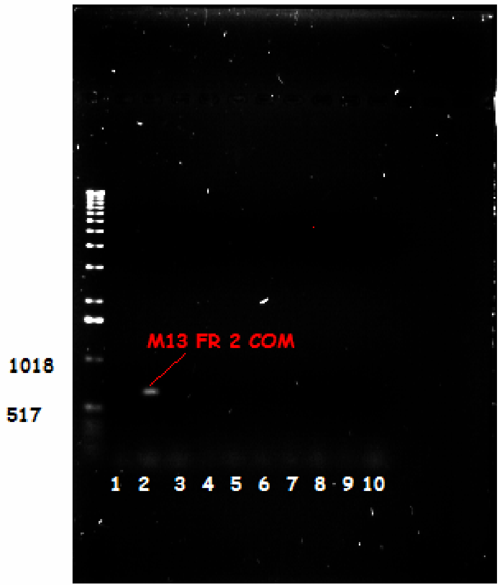
Εικόνα 3. Ι AlkFr2, με *A. borcumensis* θετικό δείγμα

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΚΛΩΝΩΝ

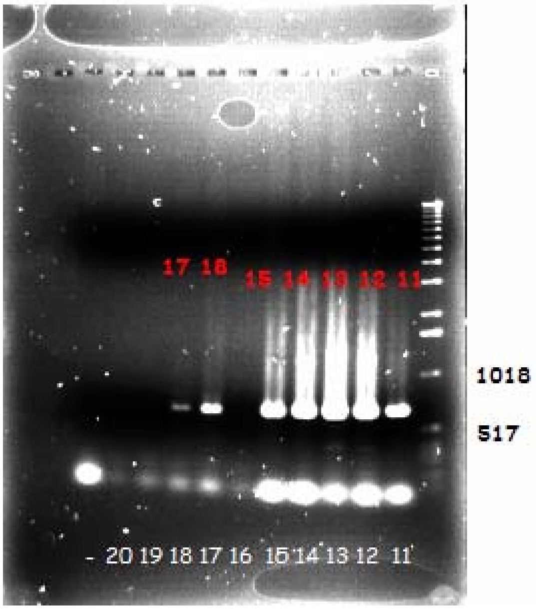
Τα αποτελέσματα της βιβλιοθήκης κλώνων του γονιδίου 16S rDNA και της υδροξυλάσης των αλκανίων από εκχυλισμένο DNA του δείγματος των πετρελαϊκών αποβλήτων (OSL), το οποίο πολλαπλασιάστηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με την χρήση των αντίστοιχων εκκινητών, των COM και 27F 1453R για το 16S rDNA, AlkFR1 και AlkFR2 για την υδροξυλάση των αλκανίων, παρουσιάζονται ως φωτογραφίες ηλεκτροφόρησης των πολλαπλασιασμένων τμημάτων με τους εκκινητές που δίνει ο κατασκευαστής M13.

3.1.1 Κλωνοποίηση του 16S rRNA με τους Εκκινητές COM

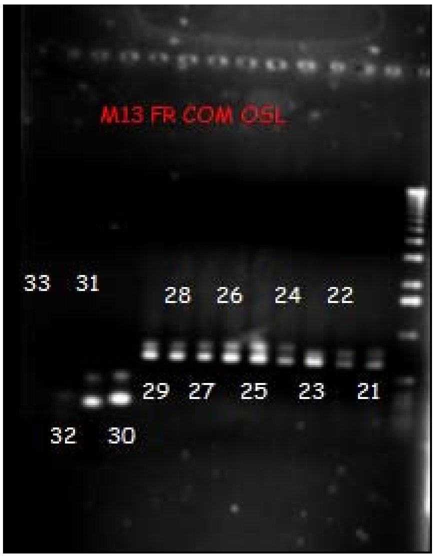
Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τους εκκινητές M13 έδειξαν ότι από τις 70 συνολικά απομονωμένες αποικίες των θετικών για την γαλακτοσιδάση αποικιών του βακτηρίου, οι επιτυχώς μετασχηματισμένες ήταν 51 αυτές με τους αριθμούς 2, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21-29, 34,35, 35', 36, 37, 39, 39', 40, 41, 42 46-55,56, 58-66, 67, 68, οι οποίες καθαρίστηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση των ακολουθιών τους (εικόνες 3.1 1, 3.1 2, 3.1 3, 3.1 4, 3.1 5, 3.1 6).



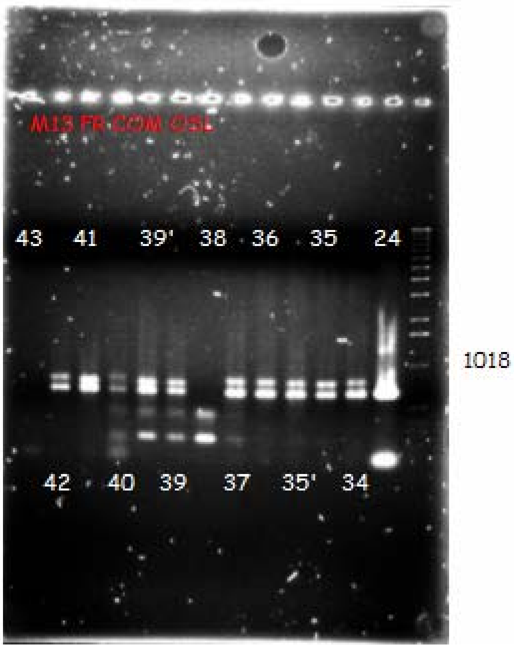
Εικόνα 3.1 1 M13 FR COM CDNA LIBRARY 1 – 10



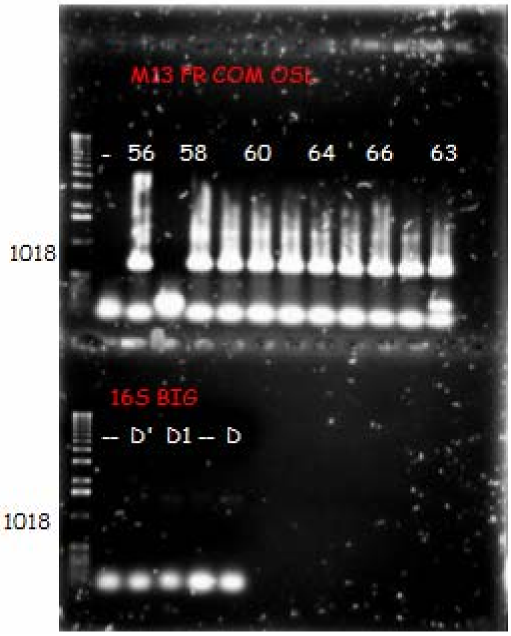
Εικόνα 3.1 2 M13 FR COM CDNA LIBRARY 11 – 20



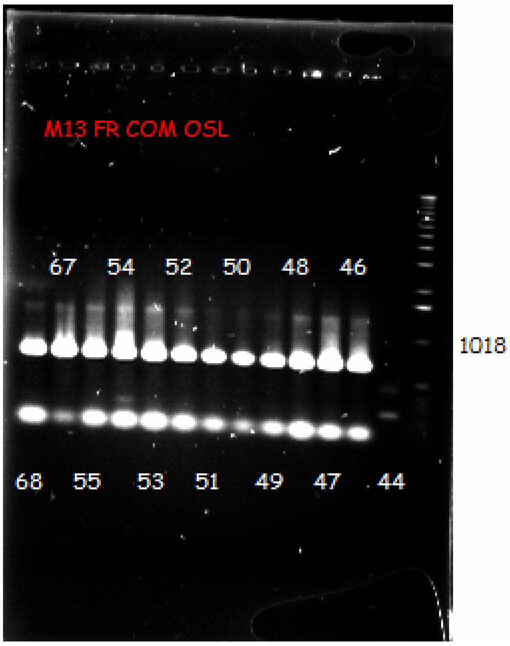
Εικόνα 3.1 3M13 FR COM CDNA LIBRARY OSL 21 – 33



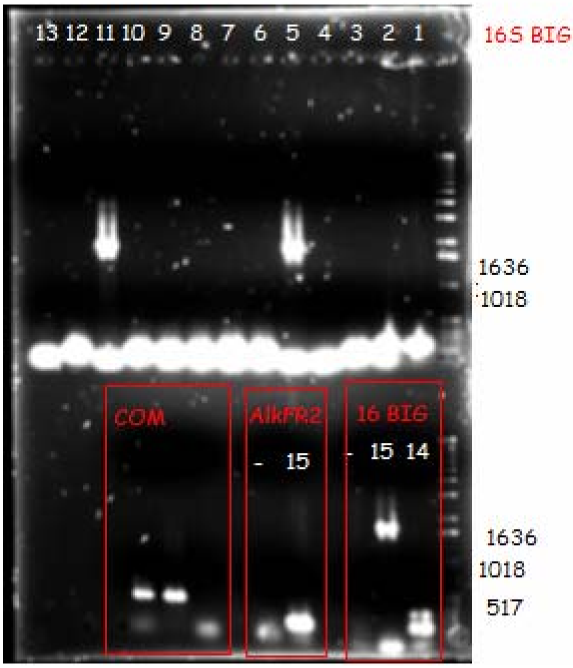
Εικόνα 3.1 4 M13 FR COM OSL 24, 34 – 43



Εικόνα 3.1 5 M13 FR COM OSL 56 – 63



Εικόνα 3.1 6 M13 FR COM OSL 44, 46 - 55, 67, 68



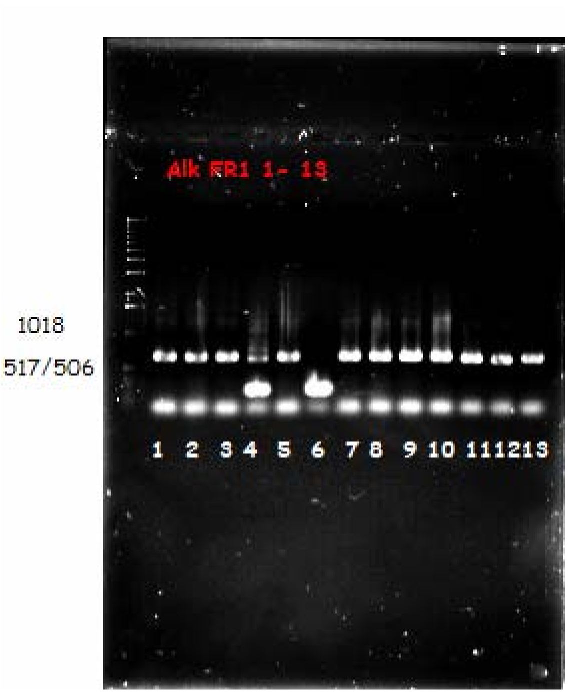
Εικόνα 3.1 7 M13 FR ΤΩΝ ΕΞΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ : 16S BIG 1-15, AlkFR2 NEGATIVE, 15, COM

3.1.2 Κλωνοποίηση του 16S rRNA με τους Εκκινητές 27F /1453R

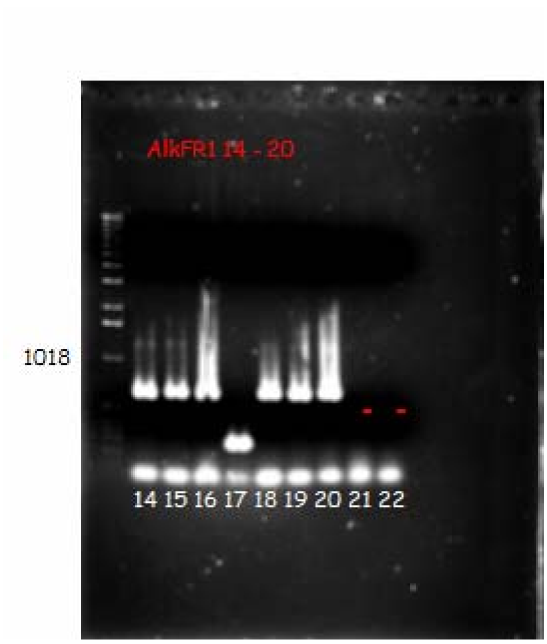
Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τους εκκινητές M13 έδειξαν ότι από τις 15 συνολικά απομονωμένες αποικίες των θετικών για την γαλακτοσιδάση αποικιών του βακτηρίου, οι επιτυχώς μετασχηματισμένες ήταν 3, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.7.

3.1.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου μονοξυγενάσης των αλκανίων με τους Εκκινητές AlkF/R1

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τους εκκινητές M13 έδειξαν ότι από τις 20 συνολικά απομονωμένες αποικίες των θετικών για την γαλακτοσιδάση αποικιών του βακτηρίου, οι επιτυχώς μετασχηματισμένες ήταν 17, οι οποίες καθαρίστηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση των ακολουθιών τους.



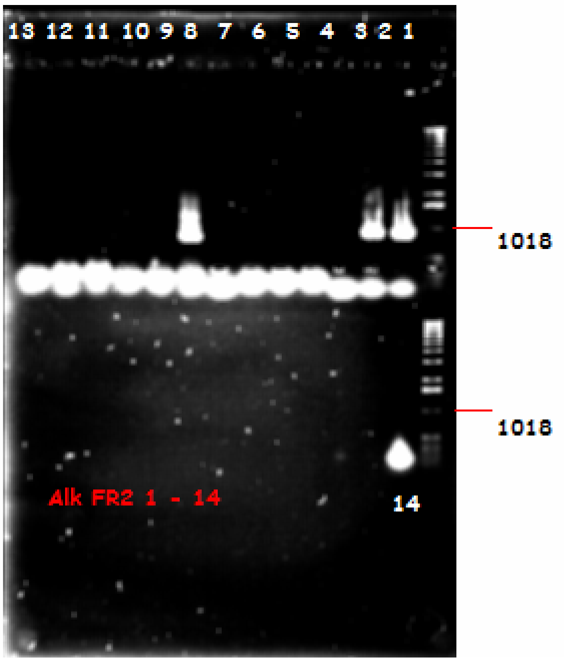
Εικόνα 3.1 8 M23 FR Alk FR1 1-13



Εικόνα 3.1 9 M13 FR AlkFR1 14-20

3.1.4 Κλωνοποίηση του γονιδίου μονοξυγενάσης των αλκανίων με τους Εκκινητές AlkF/R2

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τους εκκινητές M13 έδειξαν ότι από τις 15 συνολικά απομονωμένες αποικίες των θετικών για την γαλακτοσιδάση αποικιών του βακτηρίου, οι επιτυχώς μετασχηματισμένες ήταν μόλις 3 οι οποίες καθαρίστηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση των ακολουθιών τους.



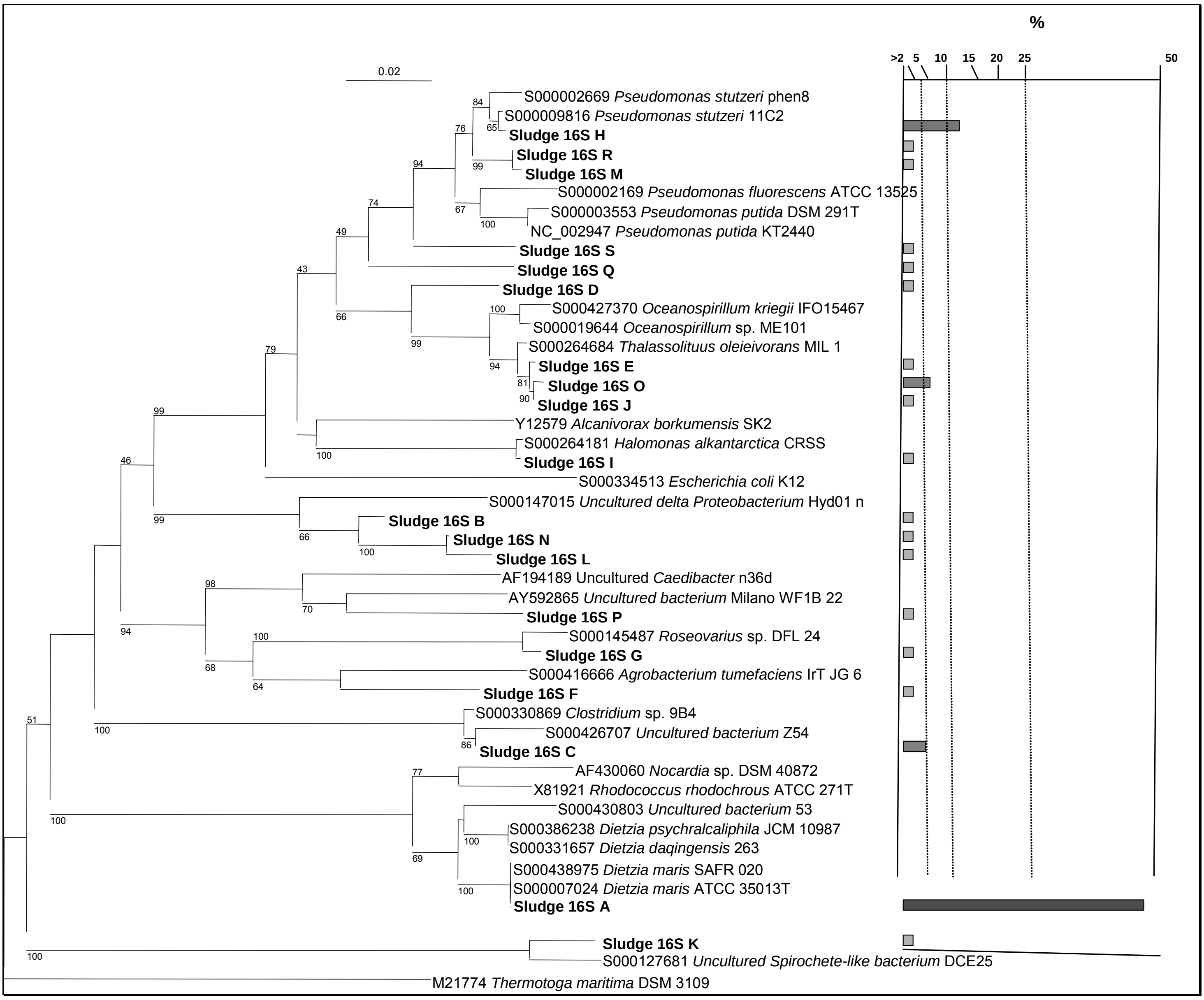
Εικόνα 3.1 10 M13 FR AlkF/R2 1 – 14

3.2 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ

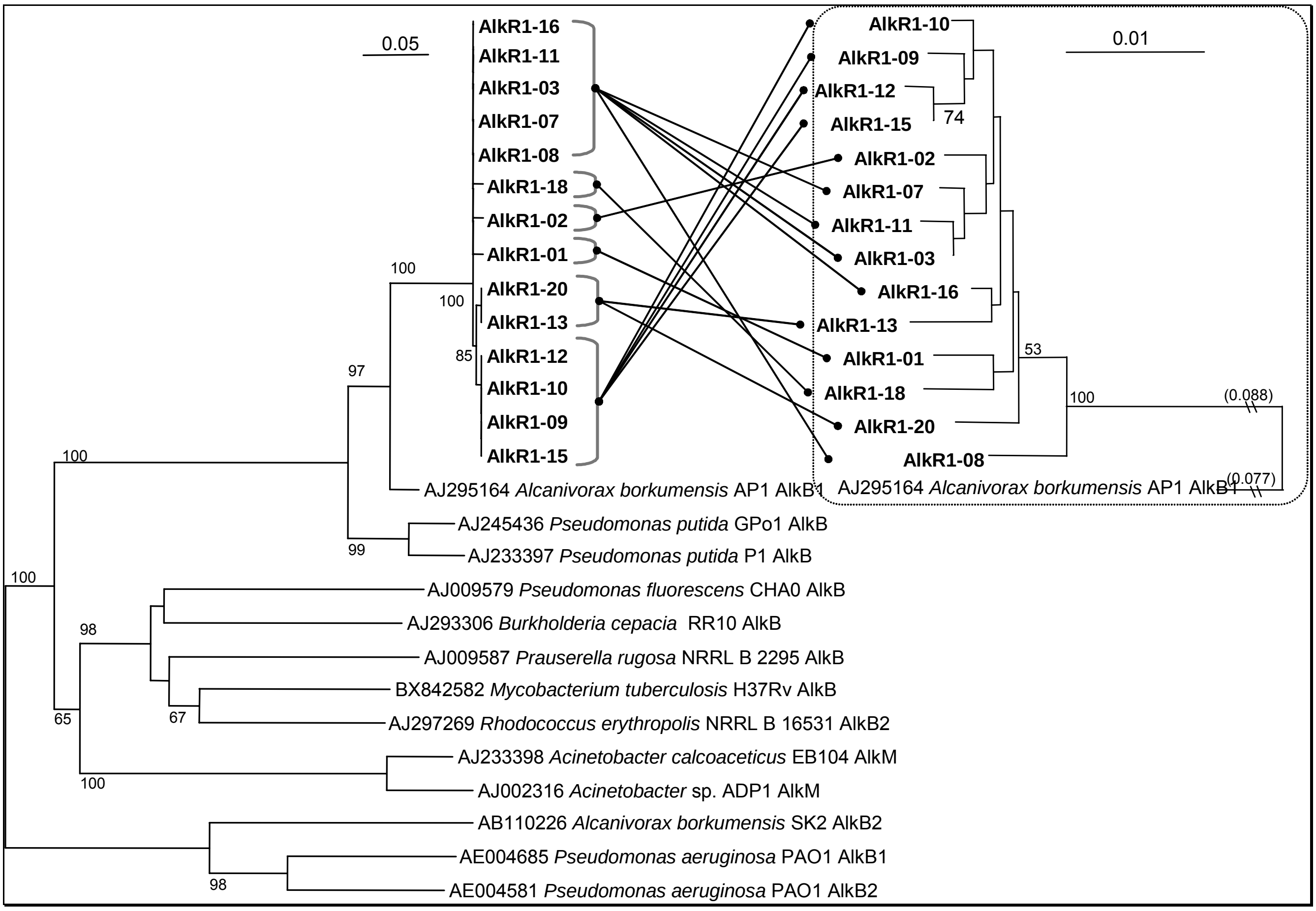
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας των 16S rRNA γονιδίων, έπειτα από επεξεργασία με το πρόγραμμα CLUSTAL W για την απόκτηση δέντρου που υποδεικνύει την φυλογενετική σχέση των μικροβίων που συνιστούν τους πληθυσμούς των οποίων το γονιδίωμα εκχυλίστηκε καθώς και το ποσοστό με το οποίο απαντούν στο συνολικό πληθυσμό.

Ένα φυλογενετικό δέντρο (εικόνα 3.5.1) προέκυψε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των αλληλουχιών των νουκλεοτιδικών βάσεων του γονιδίου 16S rRNA που πολλαπλασιάστηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης από το δείγμα του αποβλήτου της επεξεργασίας του πετρελαίου. Οι ακολουθίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τα στενότερα συγγενικά είδη που έχουν αναφερθεί και έχουν αποθηκευτεί σε βάσεις δεδομένων DDBJ/EMBL/GenBank. Αναφέρονται οι αριθμοί πρόσβασης, το όνομα προέλευσης και κωδικός είδους. Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA του βακτηρίου *Thermotoga maritime* χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς εκτός εύρους (outgroup). Οι ομοσυσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση CLUSTAL W χρησιμοποιώντας καθορισμένες τιμές. Τα φυλογενετικά δέντρα δημιουργήθηκαν με τις διαθέσιμες επιλογές στο πρόγραμμα CLUSTAL W. Η επιλογή Bootstrap τιμών-εκτιμήσεων πάνω από 50% από 1000 δέντρα τα οποία έχουν συσχετισθεί ως neighbor-joining αναγράφονται αριστερά από τους κόμβους. Η πλειονότητα μοναδικών τύπων ακολουθιών από A ως S δίνεται ως αναλογία των κλώνων που δείχνουν αυτήν την αναλογία ακολουθιών ανά αριθμό ολικών κλώνων που έχουν αναλυθεί, και γραφικά αποδίδεται από μια μπάρα μήκους ανάλογο με την καθορισμένη αναλογία. Σε αυτήν την περίπτωση η μπάρα αντιπροσωπεύει την αλλαγή – διαφορά 2 νουκλεοτιδίων για κάθε 100 αμινοξέα.

Έτσι όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.1, τα νούμερα υποδεικνύουν το ποσοστό της ομοιότητας των αλληλουχιών και στο δεξιό τμήμα αναγράφονται τα ποσοστά με κυρίαρχο είδος (περίπου 50%) με το κωδικό sludge 16S A, το οποίο είναι πάρα πολύ συγγενικό με το είδος *Dietzia maris,* το οποίο έχει βρεθεί να αποικοδομεί πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες σε θαλάσσιο περιβάλλον.



Εικόνα 3.5 1 Φυλογενετικό Δενδρόγραμμα των αποτελεσμάτων της βιβλιοθήκης κλώνων του τμήματος του γονιδίου 16SrDNA που πολλαπλασιάστηκε με τους εκκινητές COM



Εικόνα 3.5 2 Φυλογενετικό δενδρόγραμμα των αποτελεσμάτων της βιβλιοθήκης κλώνων του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο της μονοξυγονάσης των αλκανίων, που πολλαπλασιάστηκε με τους εκκινητές AlkFR1

Οι φυλογενετικές σχέσεις της υδροξυλάσης των αλκανίων στην εικόνα 3.5.2 προέρχεται από το δείγμα του DNA της πετρελαϊκής λάσπης OSL. Οι ακολουθίες της πρωτεΐνης υδροξυλάσης των αλκανίων που προέκυψαν από ανάλυση των νουκλεοτιδικών βάσεων μιας βιβλιοθήκης κλώνων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με εκκινητές ονομαζόμενους ως AlkR1. Η ομοδιάταξη των αμινοξέων αντιπροσωπεύει 5 διαφορετικά αμινοξέα στα 100. Στην δεύτερη εικόνα απεικονίζονται λεπτομέρειες των φυλογενετικών σχέσεων των βάσεων των DNA αλληλουχιών της υδροξυλάσης των αλκανίων, που προέκυψαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Από αυτά προκύπτει ότι 14στενά συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες κωδικοποιούν 6 αλληλουχίες αμινοξέων που διαφέρουν σε ένα σημείο (σημειακός πολυμορφισμός). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο ανά 100 αμινοξέα.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (PCR - SSCP)

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής αυτής της τεχνικής δεν ήταν ικανοποιητικά και δεν προχώρησε σε περαιτέρω καθαρισμό και ανάλυση των απομονωμένων τμημάτων DNA, με αρχικό σκοπό την επεξεργασία ομοίως όπως και με τις άλλες αλληλουχίες για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και την διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα εδάφους από τα landfarms και ένα δείγμα από την ανεπεξέργαστη πετρελαϊκή λάσπη (κεφάλαιο 2.1). Στην πορεία όμως η μελέτη του μικροβιακού πληθυσμού και τα υπόλοιπα πειράματα εστιάστηκαν στο δείγμα που προέρχεται από την ανεπεξέργαστη πετρελαϊκή λάσπη, το οποίο και παρουσιάζει την μεγαλύτερη αφθονία και ποικιλομορφία μικροβίων, όπως έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενη εργασία (3).

Η έλλειψη θετικής ένδειξης ύπαρξης DNA στο δείγμα D, επώασης 14 μηνών, ερμηνεύεται ως αδυναμία εκχύλισης / εξαγωγής του από το έδαφος για διάφορους λόγους όπως είναι π.χ. η ύπαρξη χημικών ουσιών καθώς και των χουμικών του εδάφους ή επίσης και παρατεταμένη παραμονή του DNA στο δείγμα αυτό (συλλογή 10.2001, έπειτα από παραμονή των αποβλήτων 14 μηνών στο έδαφος, και διατήρηση των δειγμάτων σε 4^0C μέχρι την επόμενη εκχύλιση 9.2004). Ένας άλλος λόγος για την αδυναμία εκχύλισης DNA από το συγκεκριμένο δείγμα είναι η πιθανότητα μη αντιπροσωπευτικής δειγματοληψίας εφόσον πρόκειται για έδαφος, το οποίο είναι από την φύση του πολύ ανομοιογενές καθώς και τα «φορτίο» των αποβλήτων της διύλισης του πετρελαίου μπορεί να ποικίλουν σε σύσταση οργανικών ρύπων και μικροοργανισμών που συνιστούν τις κοινότητες, όπως και η εφαρμογή αυτών στους χώρους επεξεργασίας. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε δυσκολία λήψης αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και μια γενίκευση των αποτελεσμάτων θα ήταν λανθασμένη, αν υποστηριζόταν ότι δηλαδή δεν υπάρχει DNA στους χώρους επεξεργασίας της πετρελαϊκής λάσπης έπειτα από την πάροδο 14 μηνών. Αυτό που μπορούμε να ισχυριστούμε είναι ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών έχουν αισθητά μειωθεί λόγω έλλειψης θρεπτικών υποστρωμάτων, τα οποία καταναλώθηκαν σε προηγούμενα στάδια υποστηρίζοντας την αύξησή τους, όπως εξακριβώθηκε και στην εργασία των Katsivela et al. (3).

Όσον αφορά την έλλειψη θετικών αποτελεσμάτων για τα εξεταζόμενα γονίδια 2,3 διοξυγενάσης τολουολίου, 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης, με τους εκκινητές RHDO (Yeates et al. 2001) για το πρώτο ένζυμο και C23OORF, C230DO (Junca, 2003), C23DO (Mesarch et al., 2000) για το δεύτερο, αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην έλλειψη των εν λόγω γονιδίων στο δείγμα μας, είτε στην αδυναμία ανίχνευσής τους. Αυτή μπορεί να αποδοθεί είτε στην έλλειψη αποτελεσματικών εκκινητών είτε εξαιτίας λανθασμένους χειρισμούς που μπορεί να έγιναν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Για τις αντιδράσεις που αφορούν όλα τα υπόλοιπα γονίδια, εκτός από την υδροξυλάση των αλκανίων και την 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης με τους C230 και C23DO, δεν χρησιμοποιήθηκε θετικό δείγμα (DNA από βακτήριο που είναι γνωστό ότι περιέχει το βακτήριο που θέλουμε ν' ανιχνεύσουμε), ώστε να διαβεβαιώνει ότι η αντίδραση έγινε χωρίς πρόβλημα. Από το γεγονός αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί η απουσία των εν λόγω γονιδίων από τα δείγματά μας.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το δενδρόγραμμα της εικόνας 3.5.2, οι αλληλουχίες των βάσεων του DNA που προέκυψαν από την βιβλιοθήκη κλώνων για το γονίδιο μονοξυγενάση των αλκανίων ανήκουν σε ένα κλάδο που αποτελείται από σχεδόν πανομοιότυπες αλληλουχίες με πολύ λίγες διαφορετικές νουκλεοτιδικές βάσεις. Οι νουκλεοτιδικές βάσεις κατά την μετάφραση τους κωδικοποιούν ένα μόνο νέο μέλος της ενδομεμβρανικής υδροξυλάσης των αλκανίων. Αυτό το γονίδιο είναι πιο συγγενικό με το γονίδιο της μονοοξυγενάσης των αλκανίων AlkB1 από το βακτήριο *A.borkumensis*.

Όσον αφορά την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των τμημάτων του γονιδίου Alk, αναφέρθηκε στα αποτελέσματα η παρατήρηση μιας σχετικής ποικιλομορφίας γύρω από τις αλληλουχίες που ανιχνεύτηκαν, υποστηρίζοντας / υποδεικνύοντας μια δυναμική βιολογική διεργασία μεταλλάξεων. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε ένα άλλο καταβολικό γονίδιο, που κωδικοποιεί το ένζυμο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης (C23O) (22), παρόλα αυτά οι διαφορές σε επίπεδο βάσεων DNA δεν αντιστοιχούν σε ίσο αλλά σε μικρότερο αριθμό παραλλακτικότητας σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικοποιούν. Υπάρχουν και άλλες πιθανές εξηγήσεις για την παρατηρούμενη ποικιλομορφία που μπορεί να αφορά μεταλλάξεις που συνέβησαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, ή λόγω του πολλαπλασιασμού στα πλασμίδια. Παρόλα αυτά αυτή η ποικιλομορφία διαφέρει από αυτή που έχει παρατηρηθεί αλλού από τους Junca and Pieper (22), που μπορεί να εξηγηθεί με την επιλογή για μια σταθερή πρωτεΐνη σε μια βιολογική διεργασία πολλαπλασιασμού και επιλογής στο εξεταζόμενο δείγμα.

Από την κλωνοποίηση του 16 S rRNA γονιδίου, με τους εκκινητές COM, από DNA που εκχυλίστηκε από το δείγμα της πετρελαϊκής λάσπης αναγνωρίστηκε ένα βακτήριο, πολύ συγγενικό με το βακτήριο *Dietzia maris*, που εμφανίζεται να βρίσκεται με το μεγαλύτερο ποσοστό στην βιοκοινότητα (44% επί της συνολικής βιομάζας). Πρόκειται για το πρώην ονομαζόμενο βακτήριο *Rhodococcus maris* (27), και έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι είναι υπεύθυνο για τον κατοβολισμό αλκανίων με C6 ως C17, C19 και C23 (27), και που έχει απομονωθεί σε ποικίλα περιβάλλοντα.

Έχουν γίνει διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές για την αποικοδομητική ικανότητα του *Dietzia maris* σε πειράματα αποικοδόμησης πετρελαίου, όπου γίνεται περιγραφή του τρόπου με τον οποίο έρχεται σε επαφή η αποικία του βακτηρίου αυτού με την κηλίδα, καθώς και κατά πόσο επηρεάζεται η αποδοτικότητα σε σχέση με την αλατότητα.(24)

Η αποδόμηση πετρελαίου από καλλιέργειες των βακτηρίων *Rhodococcus erythropolis* και *Dietzia maris*, βρέθηκε να εξαρτάται από την συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό μέσο. Βέλτιστη χρήση των υδρογονανθράκων παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις σε 0,5 και από 2 εως 5% NaCl για το βακτήριο *Rhodococcus erythropolis* και το *Dietzia maris* αντίστοιχα. Σαν πηγή χρησιμοποιήθηκε μίγμα παραφινών (C14-C18) σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας του μέσου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν (με παρατηρήσεις με μικροσκοπία φθορισμού) ότι οι αποικίες του βακτηρίου *Dietzia maris* σχηματίζονται στην επιφάνεια των σταγονιδίων της λιπόφιλης βάσης, ενώ τα κύτταρα του *Rhodococcus erythropolis* διεισδύουν στις σταγόνες – κηλίδες. Τα είδη αυτά μπορούν να εποικήσουν σε διάφορους οικολογικούς θώκους σε οικοσυστήματα που περιέχουν έλαια, πράγμα που τα καθιστά χρήσιμα για την ανάπτυξη μικροβιακών παρασκευασμάτων για τον καθαρισμό του περιβάλλοντος από μόλυνση με πετρέλαιο. (24)

Τα είδη του γένους *Dietzia sp.* που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία έχουν εντοπιστεί σε αλατούχα, αλκαλικά ή περιβάλλοντα με πετρελαϊκή ρύπανση, όπως σε βαθιά θαλάσσια ιζήματα στο Mariana Trench, και σε αλκαλικές λίμνες.(32)

Η προέλευση του δείγματος της πετρελαϊκής λάσπης OSL από τα διυλιστήρια της Motor Oil στην Κόρινθο (βρίσκεται κοντά στη θάλασσα) και οι επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες του μικροτόπου του εδαφικού ορίζοντα όπου εναποτίθεται το απόβλητο να παρομοιάζουν με το θαλάσσιο περιβάλλον όπου φαίνεται να ευδοκιμεί το συγγενικό είδος sludge 16 S A. Ίσως η επικράτηση του είδους αυτού στο δείγμα έναντι των άλλων να οφείλεται σε αυτές ακριβώς τις συνθήκες. Οι εδαφικές συνθήκες που επηρεάζουν το περιβάλλον διαβίωσης, αύξησης και πολλαπλασιασμού, των βακτηρίων μπορεί να αφορούν την οσμωτική πίεση, την υδροστατική πίεση, το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου, το φως και τα χημικά ερεθίσματα.(14)

Το κάθε είδος μικροβίου ζει και αυξάνεται σε αρκετά μεγάλη ποικιλία συνθηκών του περιβάλλοντος. Η ιδιότητα αυτή είναι αποτέλεσμα μικρότερης ευαισθησίας των ενζυμικών τους συστημάτων ή της αυξημένης ικανότητας ρύθμισης των διαφόρων μηχανισμών των κυττάρων στις ακραίες συνθήκες του περιβάλλοντος.

Σχετικά με την αδυναμία παραγωγής αξιόλογων αποτελεσμάτων με την τεχνική PCR - SSCP μπορεί να ειπωθεί ότι χρειάζεται περισσότερες επαναλήψεις από δύο που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας καθώς και ότι είναι απαραίτητο τα δείγματα που χρησιμοποιούνται να πληρούν όλες τις προϋποθέσεις όπως η ποσότητα του DNA, σε σχέση με το χρόνο χρώσης. Το στάδιο της χρώσης είναι πολύ ευαίσθητο ως προς την κατάλληλη χρονική στιγμή που θα πρέπει να ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία. Μια ποσότητα DNA χρωματίζεται σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με τον χρόνο χρώσης. Επειδή λοιπόν σε κάθε πηκτή υπάρχουν περισσότερα από ένα δείγματα, ανάλογα με τον χρόνο χρώσης της πηκτής μπορεί κάποιο να ευνοηθεί σε σχέση με άλλο που δεν γίνεται ορατό. Συνεπώς δεν μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την καταλληλότητα της μεθόδου.

Η περαιτέρω μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων του περιβάλλοντος στην αύξηση και επικράτηση των μικροοργανισμών έχει μεγάλη σημασία στην επιτυχή εφαρμογή της βιοεξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών. Η ύπαρξη προοπτικής συνέχισης των πειραμάτων και των αναλύσεων για την εξαγωγή συμπερασμάτων για αυτή την κοινωνία και αυτό τον μικροοργανισμό ειδικότερα σχετικά με την συμπεριφορά του στη διάρκεια του χρόνου καθώς και τις αναπτυσσόμενες σχέσεις με τους αυτόχθονους πληθυσμούς ή και άλλους που προστίθενται μαζί με το απόβλητου ή ακόμη και την προοπτική δημιουργίας κατάλληλου μίγματος ικανού για την πλέον αποδοτικότερη αποκατάσταση του εδάφους θα έδινε μια νέα προοπτική στον χώρο της εξυγίανσης περιοχών με παρόμοιο πρόβλημα, και θα συνέβαλλε ενεργά στην μείωση του προβλήματος της ρύπανσης στον πλανήτη.

Επιπλέον θα ήταν πολύ χρήσιμο και ενδιαφέρον για την πληρέστερη και επιστημονικότερη διαχείριση προβληματικών περιοχών, η διαπίστωση και ο χαρακτηρισμός των βιοχημικών μονοπατιών διάσπασης των υδρογονανθράκων καθώς και η εξερεύνηση των δυνατοτήτων για διάσπαση επιπλέον επικίνδυνων ρύπων σε τέτοια περιβάλλοντα, όπου φαίνεται ή καθαρή ευδοκίμηση του είδους αυτού του βακτηρίου.

Εφόσον δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία στη βιβλιογραφία που να στηρίζουν, σε αυτό το στάδιο, τη διαχείριση τέτοιων ρυπασμένων περιοχών, μέσω της ρύθμισης κατάλληλων παραγόντων, με ελεγχόμενα, αναμενόμενα και επιτυχή αποτελέσματα που να έχει πραγματική και ευρεία εφαρμογή, η βασική έρευνα οφείλει βρίσκεται στην υπηρεσία της εφαρμοσμένης πρακτικής με στόχο να δίνει λύσεις σε πραγματικά προβλήματα του καιρού μας με συνέπεια και υπευθυνότητα.

Η πρόταση λοιπόν σε αυτό το αρχικό στάδιο θα ήταν η συνέχιση της βασικής έρευνας για την διερεύνηση της λειτουργίας των βιοσυστημάτων αυτών σε υπομοριακό, μοριακό και σε επίπεδο βιοκοινότητας με την ελπίδα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων πριν την πρόταση οποιασδήποτε εφαρμογής- επέμβασης-λύσης, για την διασφάλιση της ποιότητας και του ελέγχου του περιβάλλοντος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Katsivela E., Moore E. R. B., and Kalogerakis N., 2003, Biodegradation Of Aliphatic And Aromatic Hydrocarbons: Specificity Among Bacteria Isolated From Refinery Waste Sludge, Water, Air, and Soil Pollution, Focus 3, 103–115.

2. Κυριακίδης Δ. Α., 2000, Βιοτεχνολογία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη

3. Katsivela E., E. R. B. Moore, D. Maroukli, C. Strömp, D. Pieper and N. Kalogerakis, 2005, Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites, Biodegradation 16, 169-180

4. Καλογεράκης Ν., 2004, Σημειώσεις- Βιολογική Εξυγίανση Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

5. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky and Darnell, 2004, Molecular Cell Biology. Fifth Edition, W. H. Freeman and Company, New York

6. Jan B. van Beιlen, M. M. Marin, T. H. M. Smits, Martina Rothlisberger, A. G. Franchini, B. Witholt and F. Rojo, 2004, Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borcumensis*, Environmental Microbiology 6(3), 264-273

7. Sei K., Sugimoto Y., Mori K., Maki H., Kohno T., 2003, Monitoring of alkane-degrading bacteria in sea water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes, Environmental Microbiology 5(6), 517-522

8. Hara A., Baik Sang-ho, Syutsubo K., Misawa N., Smits T. H. M., Jan B. van Beilen and Harayama S., 2004, Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borcumensis* SK_2, Environmental Microbiology 6(3), 191-197

9. Jan B. van Beilen and Bernard Witholt, 2004, Alkane Degradation By Pseudomonads., In Pseudomonas Volume 3, Edited Juan Luis Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers

10. Castro P. and Huber M. E., 1999, Marine Biology

11. Smits T. H. M., Martina Rothlisberger, Bernard Witholt and Jan B. Beilen, 1999, Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains, Environmental Microbiology 1(4), 307-317

12. Jan B. van Beilen, Theo H. M. Smits, Lyle G. Whyte, Susanne Schorcht, Martina Röthlisberger, Thorsten Plaggemeier, Karl-Heinrich Engesser and Bernard Witholt., 2002, Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains, Environmental Microbiology 4 (11), 676-682

13. Mesarch, B. M., Nakatsu and Nies, L., 2000, Development of Catechol 2,3-Dioxygenase Spesific Primers For Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR, Applied Environ. Microbiol. 66 (2),678-683

14. Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press

15. Κολιαης Ι. Σ., 2001, Μικροβιολογία (Τρίτη Έκδοση), University studio Press, Θεσσαλονίκη

16. Katsivela E., Moore E. R. B. and Kalogerakis N., 2004, Monitoring of the Degradation Activities and the Diversity of the Microbial Community Degrading Refinery Waste sludge, Water, Air, and Soil Pollution Focus 4, 75–85,

17. Wacket L. P. and Hershberger C. D., 2001, Biocatalysis and Biodegradation Microbial Transformation of Organic Compounds

18. Maier R. M, 2000, Microorganisms and organic Pollutants, In Environmental Microbiology, Maier R. M, Charles P. Gerba, Ian L. Pepper, Academic Press

19. http://science.howstuffworks.com/oil-refining2.htm

20. Smits T. H. M., Bernard Witholt and Jan B. van Beilen, 2003, Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa,* Antonie van Leeuwenhoek 84, 193–200,

21. Gunjan Pandey and Rakesh K. Jain, 2002. Bacterial Chemotaxis toward Environmental Pollutants: Role in Bioremediation. Applied and Environmental Microbiology, 5789–5795

22. Junca H. and Pieper D. H., 2003, Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria, Journal of Microbiological Methods 55 697-708

23. Andrew P. Martin, 2002, Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities, Applied and Environmental Microbiology 68 (8), 3673–3682

24. Zviagintseva IS, Poglazova MN, Gotoeva MT and Beliaev SS., 2001, Effect of the media salinity on destruction of petroleum oils by nocardioform bacteria., Mikrobiologiia, 70(6), 759-764

25. Namio Kunihiro, Mitsuru Haruki, Kazufumi Takano, Masaaki Morikawa and Shigenori Kanaya, 2005, Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures Journal of Biotechnology 115, 129–136

26. Yukiko Nishiuchi, Tuneko Baba and Ikuya Yano, 2000, Mycolic acids from Rhodococcus, Gordonia, and Dietzia, Journal of Microbiological Methods 40, 1–9

27. Rainey F. A., S. Klatte, R. M. Kroppenstedt and E. Stackebrandt, 1995, Dietzia, a New Genus Including Dietzia maris comb. nov., Formerly Rhodococcus maris, International Journal Of Systematic Bacteriology 45 (1), 32–36

28. Abdelhaq Belhaj, Nicole Desnoues and Claudine Elmerich, 2002, Alkane biodegradation in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a polluted zone: identification of alkB and alkB-related genes, Research in Microbiology 153, 339–344

29. Natsuko Hamamura and Daniel J. Arp , 2000, Isolation and characterization of alkane-utilizing Nocardioides sp. strain CF8, FEMS Microbiology Letters 186, 21-26

30. Bassam Brant J., Gustavo Caetano-Anolles and Gresshoff P. M, 1991, Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels, Biochemistry 196, 80-83

31. Μήτσιος Ι. Κ., 1999, Εδαφολογία, Εκδόσεις Zymel, Αθήνα

32. Yumoto I.. Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y. and Matsuyama H., 2002, *Dietzia psychralcaliphola* sp. Nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 85-90

33. Fast DNA SPIN KIT – BIO 101 protocol, La Jolla, CA, USA

34. Junca H. and Pieper D. H., 2004, Functional gene dinersity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries, Environmental Microbiology 6 (2), 95-110

35. Schweiger F. and Tebbe C., 1998, A New Approach To Utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis Appl Environ Microbiol. 64(12), 4870–4876

36. Yeates 2001

37. Marlowe E. M., Josephson K. L. and Pepper I. L., 2000, Nucleic Acid-Based Methods of Analysis, In Environmental Academic Press

38. www.promega.com

39. Dye Ex Handbook 05/2002, DyeEx 2.0 Spin Protocol For Dye-Terminator Removal

40. Woese Carl and Fox E. G., 1977, Phylogenetic Structure of the prokaryotic Domain : The primary kingdoms, evolution PROC. Natl. ACAD. Sci. USA 74 (11), 5088-5090.

41. Γεωργάτσου Ι. Γ., 2001, Εισαγωγή στη Βιοχημεία 5' Έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη

42. Chang Jo-Shu, Cheng-Liang Chou, Guang-Huey Lin, Shih-Yi Sheu and Wen-Ming Chen, 2005, Pseudoxanthomonas kaohsiungensis, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity, Systematic and Applied Microbiology

43. Koma D., Fumihiko Hasumi, Etsuo Yamamoto, Toshiya Ohta, Seon-Yong Chung and Motoki Kubo, 2001, Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *A. cinetobacter* sp. Journal of Bioscience and Bioengineering 91 (1), 94-96

44. L Yuste, Marıa Eugenia Corbella, Marıa Jesus Turiegano, Ulrich Karlson, Antonio Puyet and Fernando Rojo, 2000, Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing, FEMS Microbiology Ecology 32, 69-75

45. Whyte L. G., T. H. M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer, and J. B. van Beilen, 2002, Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus* Strains Q15 and NRRL B-16531, Applied And Environmental Microbiology 68 (12), 5933–5942

46. Freddie H. Sharkey, Ibrahim M. Banat and Roger Marchant, 2004, MINIREVIEW Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology Applied And Environmental Microbiology 70 (7) , 3795–3806

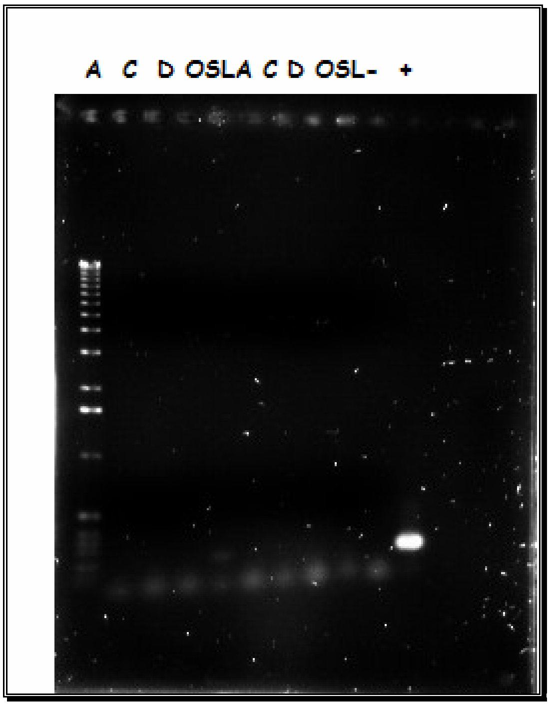
47. Osborn A. M. and D. Boltner, 2002, When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum, Plasmid 48, 202–212

48. Nogales et al., 1999,

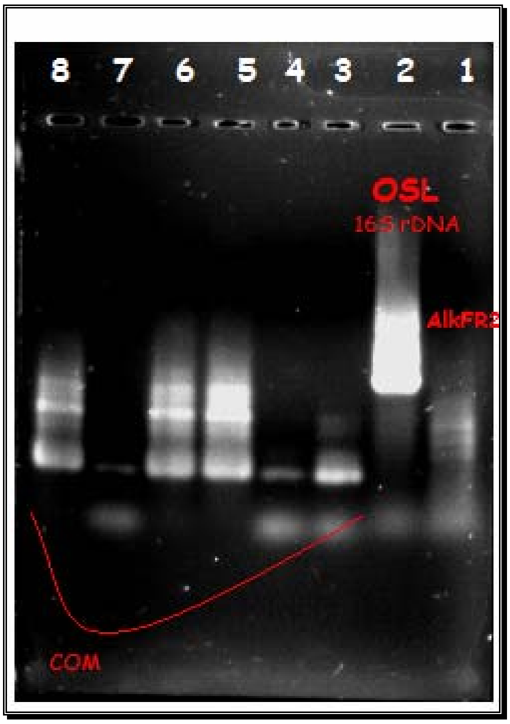
49. Hoore et al., 1996,

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

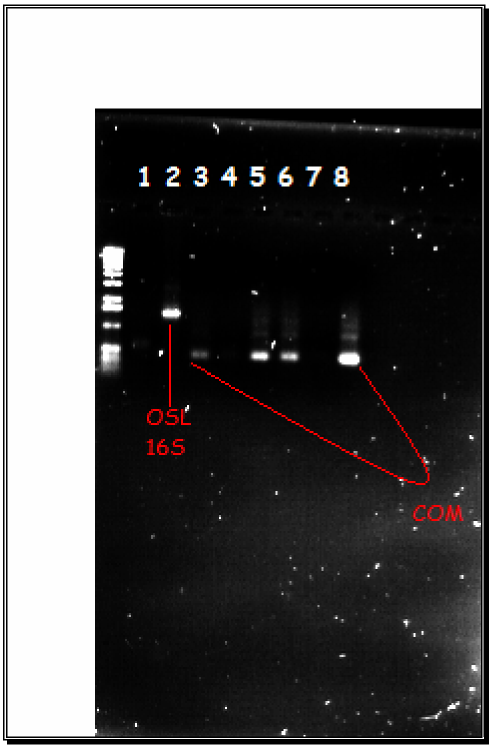
ΕΙΚΟΝΕΣ



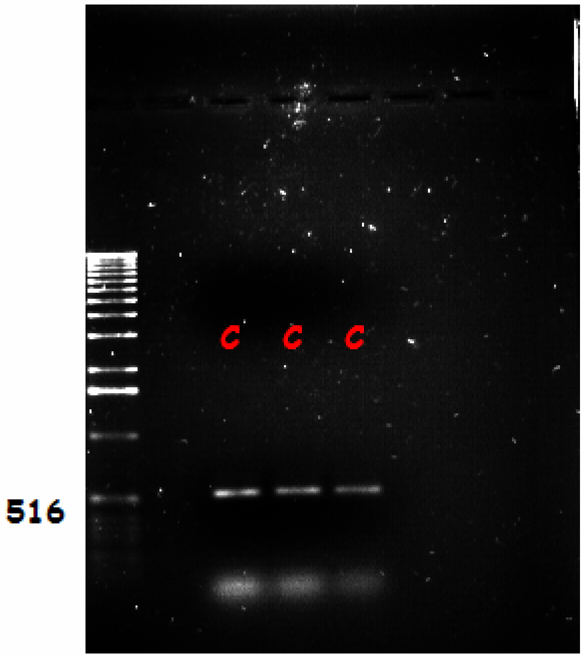
Εικόνα 0-I C23 DO



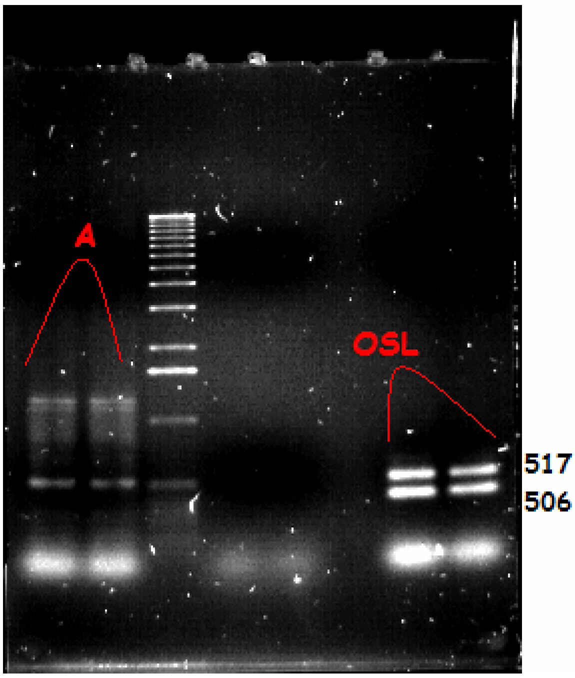
Εικόνα 0-II Pure – gel purification. (Από αριστερά προς τα δεξιά: OSL_2 COM - 8, D_2 COM – 7, A_2 COM – 6, OSL_1 COM – 5, D_1 COM – 4, C_1 COM – 3, OSL_2 16S – 2, $AlkFR_2$ - 1)



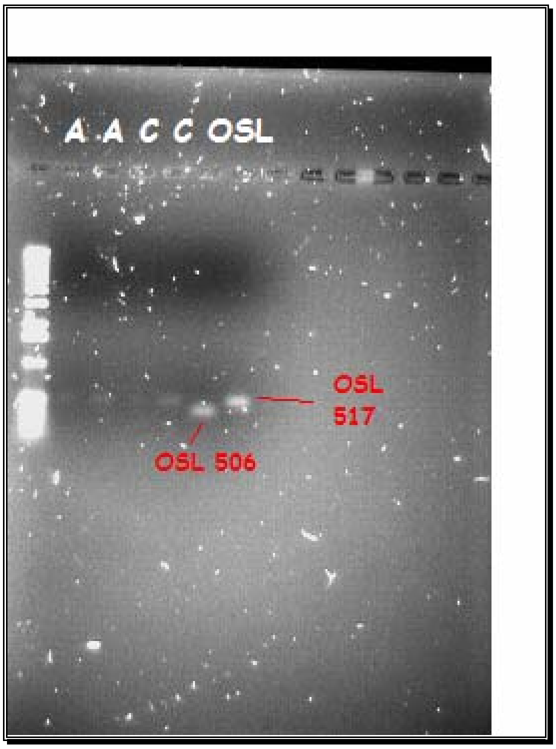
Εικόνα 0-III(Από αριστερά προς τα δεξιά: (AlkFR$_2$ - 1, OSL$_2$ 16S – 2, C$_1$ COM – 3, D$_1$ COM – 4, OSL$_1$ COM – 5, A$_2$ COM – 6, , D$_2$ COM – 7, OSL$_2$ COM - 8)



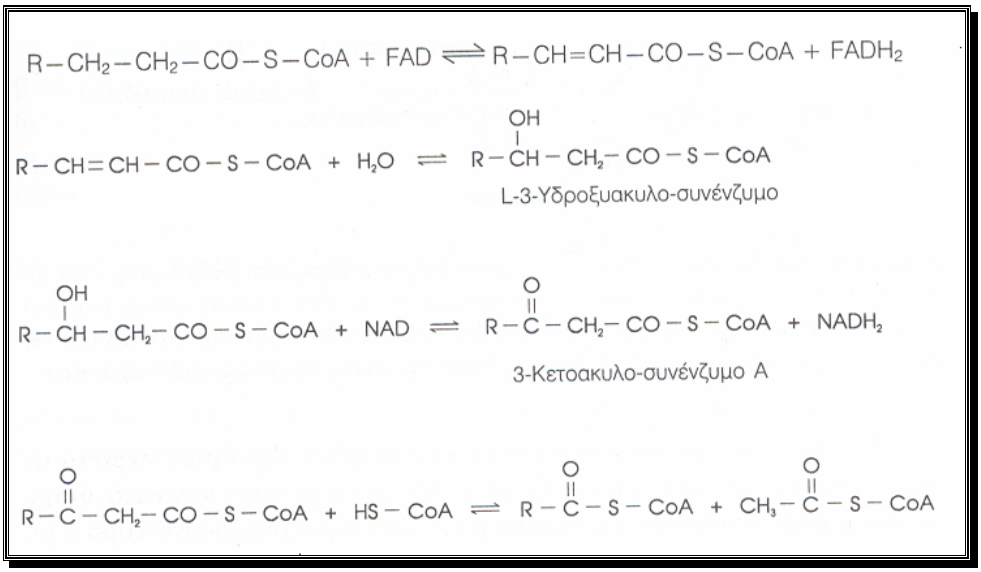
Εικόνα 0-IV C 23 O ΔΕΙΓΜΑ C- GEL PURIFICATION



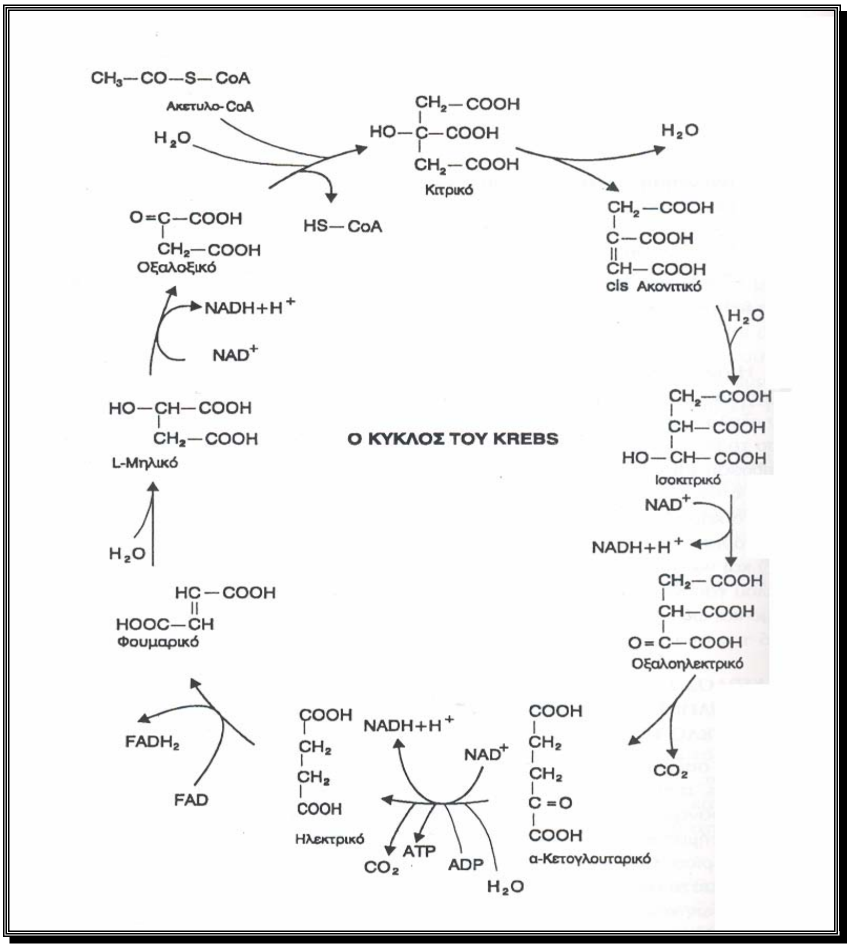
Εικόνα 0-V C23 O ΔΕΙΓΜΑΤΑ A ΚΑΙ OSL - GEL PUEIFICATION



Εικόνα 0-VI C23 O - AFTER GEL PURIFICATION



Εικόνα 0-7 β οξείδωση λιπαρών οξέων (41)



Εικόνα 0-8 Ο κύκλος του Krebs(41)

Πίνακας 0.I A Συστατικά λαδιών μηχανής αυτοκινήτου (43)

Component	Ratio (%)
Saturated fraction	90.9
Normal paraffin	15.5
Cyclic paraffin	75.4
Aromatic fraction	9.1
Naphthalene	1.7
Fluorene	1.2
Benzene	1.1
Dibenzofuran	1.0
Dinaphthenebenzene	0.8
Dibenzanthracene	0.6
Naphthobenzothiophene	0.3
Perylene	0.2
Benzothiophene	0.2
Chrysene	0.1
Unknown	1.9

ΠΙΝΑΚΑΣ 0-Ι Β

ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ (πηγή 20)

HISTORY OF REFINING

Year	Process name	Purpose	By-products, etc.
1862	Atmospheric distillation	Produce kerosene	Naphtha, tar, etc.
1870	Vacuum distillation	Lubricants (original) Cracking feedstocks (1930's)	Asphalt, residual coker feedstocks
1913	Thermal cracking	Increase gasoline	Residual, bunker fuel
1916	Sweetening	reduce sulfur & odor	Sulfur
1930	Thermal reforming	Improve octane number	Residual
1932	Hydrogenation	Remove sulfur	Sulfur
1932	Coking	Produce gasoline basestocks	Coke
1933	Solvent extraction	Improve lubricant viscosity index	Aromatics
1935	Solvent dewaxing	Improve pour point	Waxes
1935	Cat. polymerization	Improve gasoline yield & octane number	Petrochemical feedstocks
1937	Catalytic cracking	Higher octane gasoline	Petrochemical feedstocks
1939	Visbreaking	reduce viscosity	Increased distillate,tar
1940	Alkylation	Increase gasoline octane & yield	High-octane aviation gasoline
1940	Isomerization	Produce alkylation feedstock	Naphtha
1942	Fluid catalytic cracking	Increase gasoline yield & octane	Petrochemical feedstocks
1950	Deasphalting	Increase cracking feedstock	Asphalt
1952	Catalytic reforming	Convert low-quality naphtha	Aromatics
1954	Hydrodesulfurization	Remove sulfur	Sulfur
1956	Inhibitor sweetening	Remove mercaptan	Disulfides
1957	Catalytic isomerization	Convert to molecules with high octane number	Alkylation feedstocks
1960	Hydrocracking	Improve quality and reduce sulfur	Alkylation feedstocks
1974	Catalytic dewaxing	Improve pour point	Wax
1975	Residual hydrocracking	Increase gasoline yield from residual	Heavy residuals

Πίνακας 0.ΙΙ Οικογένειες Καταβολικών ενζύμων (17)

Oxidoreductases

B-class cytochrome P450 monooxygenases

Cytochrome P450-cam, camphor 5-monooxygenase; *Pseudomonas putida* G786
Cytochrome P450-BM-I, fatty acid monooxygenase; *Bacillus megaterium*
Cytochrome P450-soy; *Streptomyces griseus*
Cytochrome P450-nor, nitric acid reductase; *Fusarium oxysporum*
Cytochrome P450-terp, terpene morLooxygenase; *Pseudomonas* sp.
Cytochrome P450-lin, linalool 8-monooxygenase; *Pseudomonas incognito*

Aromatic-ring hydroxylases (flavoprotein monooxygenase)
4-Hydroxybenzoate hydroxylase; *Pseudomonas fiuorescens*

2/4-Dichlorophenol 6-monooxygenase; *Streptomyces purpurascens* :

Pentachlorophenol-4-monooxygenase; *Flavobacterium* sp. 1 f; Salicylate hydroxylase; P. *putida*

Phenol hydroxylase; *Trichosporon cutaneum*a

Fungal lignin peroxidase family , Lignin peroxidase; *Arthromyces ramosus* ' Lignin peroxidase; *Phanerochaete chrysosporium*

Lignin peroxidase; *Trametes versicolor*

Ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit
Naphthalene 1/2-dioxygenase alpha subunit; *Pseudomonas* sF. strain NCIB98I6
Toluene 1/2-dioxygenase alpha subunit; P. *putida* PI
Biphenyl dioxygenase alpha subunit; *Pseudomonas* sF.
Toluate 1/2-dioxygenase alpha subunit; P. *putida* mt-2
Benzoate 1/2-dioxygenase alpha subunit; *Pseudomonas arvilla* C-I '

Binuclear-iron monooxygenases
Methane monooxygenase; *Methylosinus trichosporium* OB3B
Toluene *2-monooxygenase;Burkholderia cepacia* G4
Toluene 4-monooxygenase; *Pseudomonas mendocina* KRI
Alkene monooxygenase; *Xanthobacter* sF. strain Py2

ortho-ring **cleavage dioxygenase family**
Catecholl/2-dioxygenase; P. *putida* mt-2
Chlorocatecholl/2-dioxygenase; *Pseudomonas* sp. strain P5I
Protocatechuate 3/4-dioxygenase; *Pseudomonas aeruginosa*

meta-ring **cleavage dioxygenase family**

Catechol 2/3-dioxygenase, P. *putida*
2/3-Dihydroxybiphenyl-I/2-dioxygenase; *Burkholderia* sp. strain LB400
3/4-Dihydroxyphenylacetate 2/3-dioxygenase; *Arthrobacter globiformis* CM-2

Alcohol dehydrogenase superfamily signature

3-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase; *Pseudomonas testosteroni*
5-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase; *Streptomyces* sp.
7-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase; *Eubacterium* sp.
cis-I/2-Dihydro-I/2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase; *Pseudomonas* sp.
cis-2/3-Dihydrobiphenyl-2/3-diol dehydrogenase; *Pseudomonas* sp. strain KKSIO2
Halohydrin hydrogen-halide-lyase; *Corynebacterium* sp.

Transrerases

Glutathione transferase family

Dichloromethane dehalogenase; *Methylophilus* sp. strain DMll Tetrachlorohydroquinone reductase; *Flavobacterium* sp.

Arylglycerol beta-aryletherase; *Sphingomonas paucimobilis*

Hydrolases

Amidohydrolase superfamily
Atrazine chlorohydrolase; *Pseudomonas* sp. strain ADP

Hydroxyatrazine N-ethylaminohydrolase; *Pseudomonas* sp. strain ADP N-Isopropylammelide isopropylaminohydrolase; *Pseudomonas* sp. strain ADP Phosphotriesterase; *Pseudomonas diminuta* .

Urease; *Klebsiella aerogenes*

Alpha-beta hydrolase fold

Haloalkane dehalogenase; *Xanthobacter autotrophicus*
Haloacetate dehalogenase H-l; *Pseudomonas* sp. strain YL
Epoxide hydrolase; *Agrobacterium radiobacter* ADI
Carboxylesterase; P. *fluorescens*
Polyhydroxybutyrate depolymerase; *Alcaligenes faecalis*
2-Hydroxymuconic semialdehyde hydrolase; P. *putida*

Lyases and isomerases

Enolase/ enoyl-CoA superfamily
Muconate cycloisomerase; P. *putida*

Chloromuconate cycloisomerase; *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) Dichloromuconate cycloisomerase; *Xanthobacter flavus* 14pl

Mandelate racemase; P. *putida*

D-Glucarate dehydratase; P. *putida*

4-Chlorobenzoyl-CoA dehalogenase; *Pseudomonas* sp. strain CBS3 Feruloyl-CoA hydratase/lyase; *Pseudomonas* sp. 2-Ketocyclohexanecarboxyl-CoA hydrolase; *Rhodopseudomonas palustris*

Ligases

Acyl-adenylate/thioester-forming enzyme family

4-chlorobenzoate-CoA ligase; *Pseudomonas* sp. strain CBS3 2-Aminobenzoate-CoA ligase; *Pseudomonas* sp. strain KB 740

Πίνακας 0.III

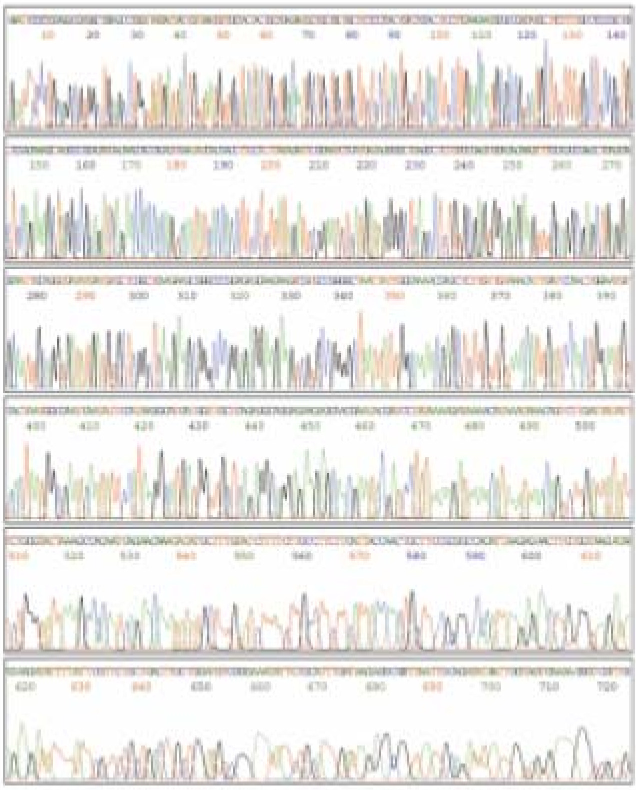
ΙΔΙΟΤΗΤΑ	**ΒΕΛΤΙΣΤΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ**
ΣΥΣΤΑΣΗ ΒΑΣΕΩΝ	Το περιεχόμενο των βάσεων θα πρέπει να είναι μεταξύ 40-60% με μια ισότιμη διασπορά και των τεσσάρων βάσεων κατά το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου (π.χ. όχι πολυπουρίνες ή πολυπυριμιδίνες και όχι επαναλαμβανόμενα δι-νουκλεοτίδια
ΜΗΚΟΣ	Η περιοχή των εκκινητών που είναι συμπληρωματική με την αλυσίδα των βάσεων θα πρέπει να είναι 18-25 νουκλεοτίδια. Τα μέλη των ζευγών δεν θα πρέπει να διαφέρουν σε μήκος περισσότερο από 3 βάσεις.
ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟ-ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	Δεν θα πρέπει να υπάρχουν αντεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή αυτοσυμπληρωματικές αλληλουχίες μεγαλύτερες των τριών βάσεων. Αλληλουχίες αυτού του τύπου τείνουν να σχηματίζουν hairpin δομές, οι οποίες αν είναι σταθερές στις συνθήκες της PCR, μπορούν να εμποδίσουν αποτελεσματικά τον υβριδισμό του ολιγονουκλεοτιδίου με το DNA στόχο.
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΕΝΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	Οι 3’ τελικές αλληλουχίες ενός εκκινητή δεν θα πρέπει να δεσμεύονται σε οποιοδήποτε σημείο με τον άλλο εκκινητή. Επειδή οι εκκινητές βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ακόμη και ασθενής συμπληρωματικότητα μεταξύ τους οδηγεί σε σχηματισμό υβριδίων με αποτέλεσμα τη σύνθεση και πολλαπλασιασμό εκκινητών-διμερή. Αν αυτά τα διμερή σχηματιστούν νωρίς στην PCR, μπορούν να ανταγωνιστούν για την πολυμεράση, τους εκκινητές και νουκλεοτίδια, και έτσι μπορεί να καταπιεστεί ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου. Ο σχηματισμός των διμερών εκκινητών μπορεί να μειωθεί με προσεκτικό σχεδιασμό εκκινητών, με τη χρήση hot start ή touch down PCR, και/ή με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων πολυμερασών. Όταν χρησιμοποιείται περισσότερο του ενός ζεύγους εκκινητών σε μια αντίδραση, πρέπει να ελέγχεται ότι κανένα από τα 3’ άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων δεν έχει ανιχνεύσιμη συμπληρωματικότητα με κανένα άλλο εκκινητή στην αντίδραση.
(TM) ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΗΣ	Υπολογίζοντας τις τιμές της θερμοκρασίας των μελών ενός ζεύγους εκκινητών, αυτές δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 5^0 C. H Tm του προϊόντος δεν πρέπει να διαφέρει από την Tm του ζεύγους των εκκινητών περισσότερο από 10^0 C. Αυτή η ιδιότητα εξασφαλίζει την αποτελεσματική αποδιάταξη του πολλαπλασιασμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο PCR.
3’ ΑΚΡΑ	Η φύση των 3’ άκρων των εκκινητών είναι ουσιώδης. Αν είναι δυνατόν η 3’ βάση κάθε εκκινητή θα πρέπει να είναι G/C. Αν και εκκινητές με ……NNCG ή ……..NNGC αλληλουχία στο 3’ άκρο δεν συνιστάται εξαιτίας ασυνήθιστα υψηλού ΔG του τελικού GC προάγει τον σχηματισμό των hairpin δομών και μπορεί να παράγει διμερή εκκινητών.
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ, PROMOTERS ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ & ΑΛΛΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΣΤΟ 5’ ΑΚΡΟ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	Χρήσιμες ακολουθίες μη συμπληρωματικών με το DNA στόχο συχνά προστίθεται στο 5’ άκρο του εκκινητή. Γενικά η παρουσία τέτοιων ακολουθιών δεν επηρεάζει σημαντικά τη τον υβριδισμό του ολιγονουκλεοτιδίου με το DNA στόχο. Αυτές οι επιπρόσθετες ακολουθίες περιλαμβάνουν προαγωγείς βακτηριοφάγων και GC clamps. Οι περιοχές των σημείων περιορισμού είναι ειδική περίπτωση. Επειδή η αποτελεσματικότητα της τομής των σημείων περιορισμού που βρίσκονται στο 5’ άκρο του μορίου είναι φτωχή, ο εκκινητής θα πρέπει να επιμηκύνεται με τουλάχιστον τρία νουκλεοτίδια πέρα από τις ακολουθίες αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού.
ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΘΕΣΕΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ	Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, η τοποθέτηση των θέσεων εκκίνησης μπορεί να περιορίζεται από την τοποθεσία μεταλλάξεων, θέσεων περιορισμού, μικροδορυφόροι, περιοχές κωδικοποίησης, ή αντιδρώντα στοιχεία. Όταν σχεδιάζει κανείς εκκινητές για χρήση σε cDNA templates, είναι καλύτερο να μην χρησιμοποιηθούν αντίστροφοι και κανονικοί εκκινητές που δεσμεύουν ακολουθίες σε διαφορετικά εξώνια. Αυτό επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προϊόντων που προέρχονται από cDNA και contaminating genomic DNA, εύκολα διαχωρίζεται.

Πίνακας 0. IV

SEQUENCE CODES	
Modification	**Code**
Amine	AMN
Biotin	BIO
Rhodamine	RHD
Fluorescein	FLO
Phosphate	PHO
HEX	HEX
TET	TET
FAM	FAM
PURIFICATION/ 3 LETTER CODES	
Modification	**Code**
Desalted	DSL
Cartridge	COP (unmodified)
Cartridge	CTO (5' modified)
HPLC	HPL
PAGE	PAG
SCALES OF SYNTHESIS*	
Modification	**Code**
50 nmoles	50N
200 nmoles	200N
1 μmole	1U
10 μmoles	10U

Modification	Code
Deoxyuracil	U
Deoxyinosine	I
A-Phosphorothioate	F
C-Phosphorothioate	O
G-Phosphorothioate	E
T-Phosphorothioate	Z
A+C+G+T	N
A+C+G	V
A+T+G	D
T+C+G	B
A+T+C	H
A+T	W
C+G	S
T+G	K
A+C	M
C+T	Y
A+G	R
TUBE/PLATE FORMAT	
Modification	**Code**
Tubes	T
Plates	P

* Amount of CPG at start of synthesis. Product yield will be less.



Εικόνα 0. IX

DETECTION BY CULTURE INDEPENDENT METHODS OF A PREDOMINATING *Dietzia*-LIKE SPECIES AND OF ALKANE HYDROXYLASE SEQUENCES SIMILAR TO THE *A. borkumensis* AlkB1 GENE IN A COASTAL PETROLEUM WASTE SLUDGE

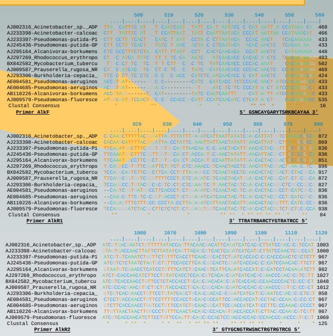
Maria Patoni[1], Dietmar H. Pieper[2], Eleftheria Katsivela[3], Nicolas Kalogerakis[1], Howard Junca[2]

1 Laboratory of Biochemical Engineering & Environmental Biotechnology, Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechneioupolis, GR-73100 Chania, Greece
2German Research Centre for Biotechnology (GBF), Division of Microbiology, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig, Germany
3Technological Educational Institute of Crete, Department of Natural Resources and Environment, Romanou 3, Halepa, GR- 73133 Chania, Crete, Greece

In order to determine the sequence composition of a functional gene family crucial for hydrocarbon degradation in this sludge, a new degenerate primer set was developed aiming to detect members of the integral membrane alkane hydroxylase gene family. The primer set was designed based on a multi-alignment of 13 complete coding DNA sequences of different variants of integral membrane alkane hydroxylase genes reported in the databases.

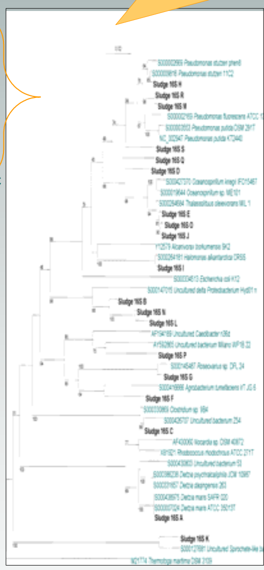
Nucleic acids extracted from a petroleum waste sludge sampled from landfarming sites of Motor Oil Hellas in Korinthos, Greece, were analysed by culture independent techniques to assess the microbial community structure.

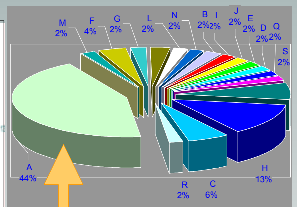
A PCR clone library of 16S rRNA gene fragments was constructed from sludge DNA amplifications. Inserts were randomly sequenced to determine the phylogenetic composition and abundant taxons. The analysis showed a variety of sequences closely related to those found in cultured representatives of different genera inside the Class γ-Proteobacteria (Orders Pseudomonadales and Oceanospirillales), some others related to Gram(+) bacteria but only one sequence type belonging to Actinobacteria.



PCR conditions were optimised to increase amplification efficiency and specificity

1st step
94 °C - 4'
2nd step
35 cycles
94 °C - 45'',
45.1 °C - 45''
72 °C - 1'
3rd step
72 °C - 8'
Preservation at 4 °C

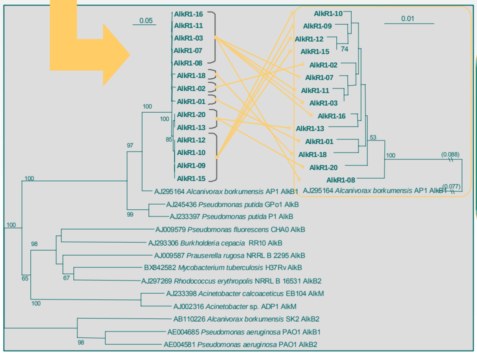




This sequence type comprised 44 % of the total amount of sequenced clones and clearly indicates strains closely related to *Dietzia* spp. to be predominant in the studied ecosystem.

and amplicons of the expected 435 bp size were obtained from the sludge DNA.

Sequencing of a PCR clone library constructed with this 435 bp size amplicon proved that this primer set was amplifying specifically gene fragments similar to alkane hydroxylase genes.



In the environment under study, polymorphic variants closely related to the AlkB1 gene recently observed in the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 were found, suggesting its possible implication in the already documented alkane biodegradation in the coastal landfarming bioremediation process.

Acknowledements:

Programme of Scientific and Technology Cooperation (WTZ) of the International Office of the German for Education and Research (BMBF) (Project GRC 01/066)

European Commission to Biotool Project Cons. (Contract No. 003998 – GOCE)

Εικόνα 0 X Poster – Παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο 3rd European Bioremediation Confereence, Chania – Crete – Greece, Ιούλιος 4-7, 2005