

# ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

**Βιολογική αφαίρεση φωσφόρου – Μοριακές τεχνικές**

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου (EBPR)
  - ❖ Στα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, ένα ποσοστό του περιεχόμενου, στο επεξεργαζόμενο απόβλητο, φωσφόρου, αξιοποιείται για την ανάπτυξη των μικροβιακών κυττάρων.
  - ❖ Το ποσοστό αφαίρεσης του φωσφόρου είναι σχετικά χαμηλό και κυμαίνεται μεταξύ 15 και 30%.
  - ❖ Η αλλαγή του νομοθετικού πλαισίου και η θέσπιση αυστηρότερων ορίων για τις εκπομπές φωσφόρου σε ευαίσθητους αποδέκτες οδήγησε στην αναζήτηση αποδοτικών διεργασιών αφαίρεσης φωσφορικών.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

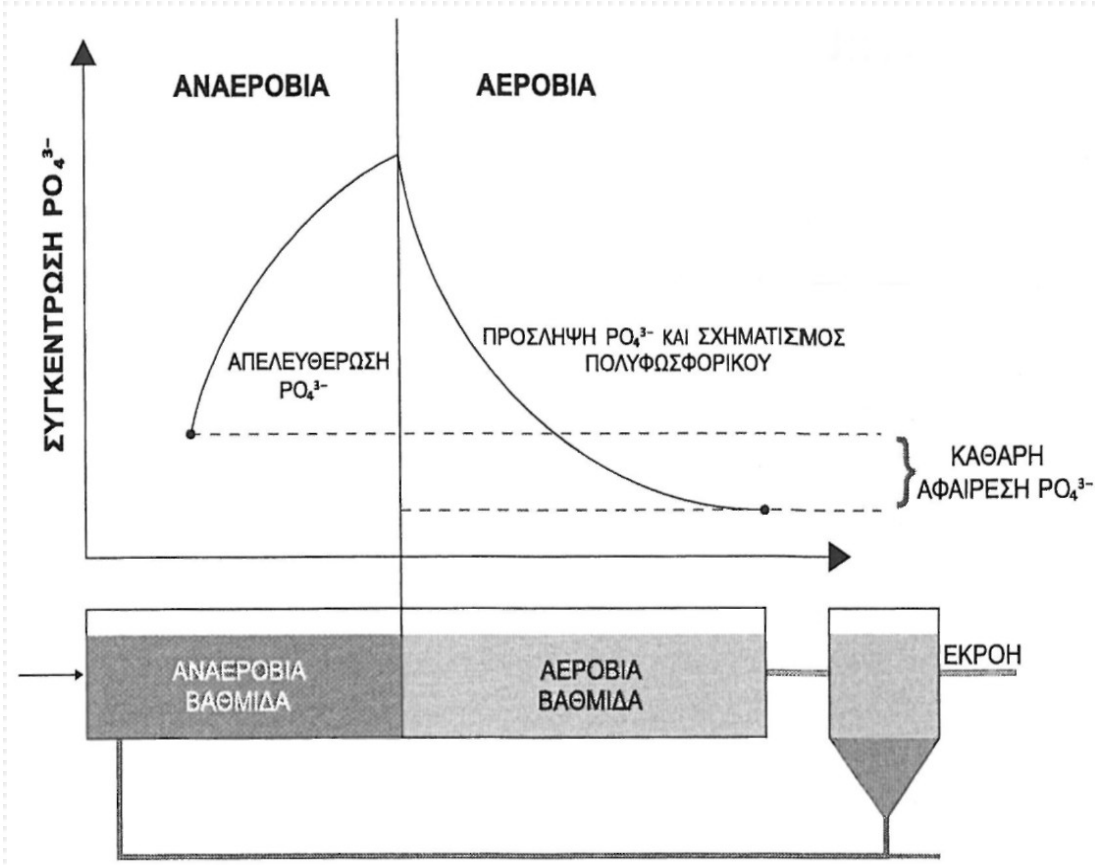
- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal

❖ Ορίζεται ως η διεργασία όπου κατά την επεξεργασία του υγρού αποβλήτου, οι μικροοργανισμοί της ενεργού ιλύος αφαιρούν από το απόβλητο μεγαλύτερες ποσότητες φωσφόρου από αυτές που θα ήταν απαραίτητες για το φυσιολογικό τους μεταβολισμό.

❖ Επιτελείται από μικροοργανισμούς που ονομάζονται Polyphosphate Accumulating Organisms (PAOs) ή πολύ-P Βακτήρια, λόγω της συσσώρευσης πολυφωσφορικού στα κύτταρα τους.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

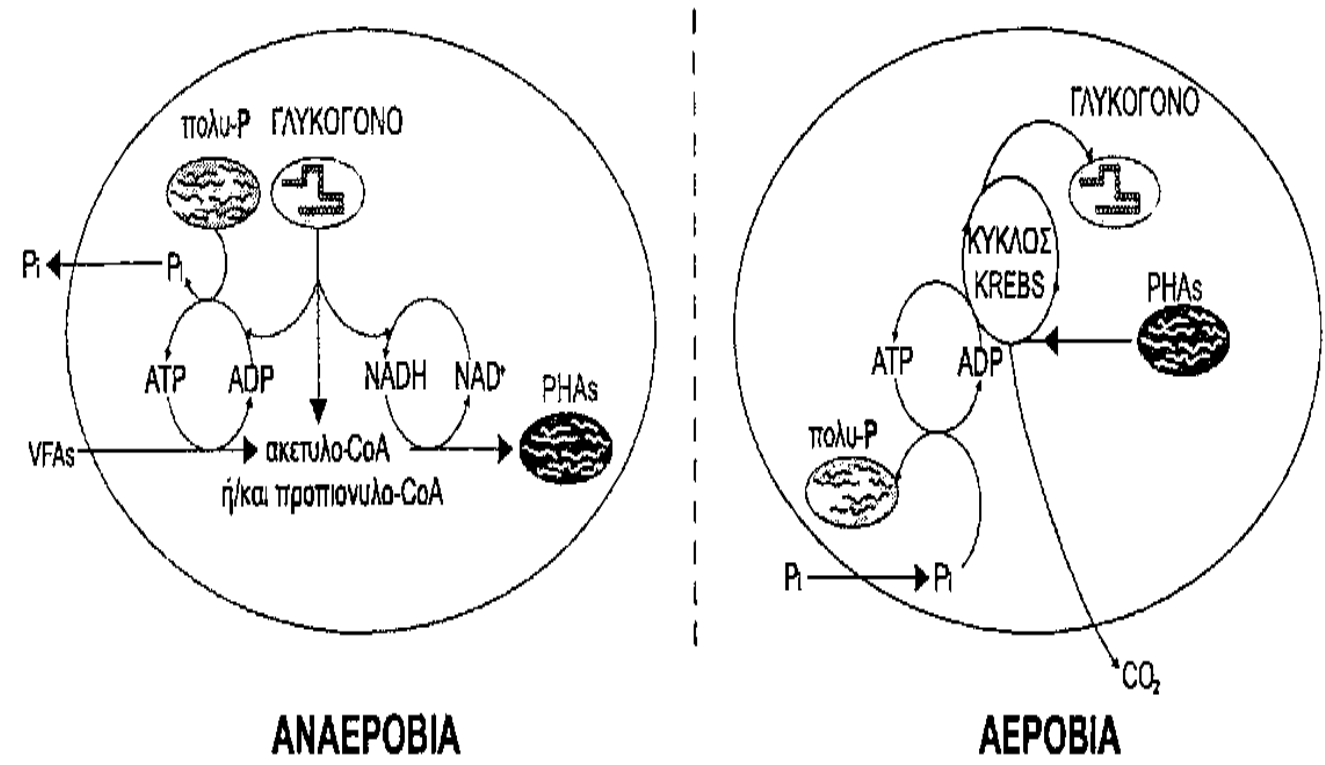
- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal



Αναερόβια απελευθέρωση και αερόβια δέσμευση φωσφορικού κατά την εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal



Βιοχημικός μηχανισμός της εκτεταμένης βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal

- ❖ Βακτήρια, υπό αναερόβιες συνθήκες, παρουσία επαρκών ποσοτήτων ευκόλως βιοαποδομήσιμων οργανικών ενώσεων (πτητικά λιπαρά οξέα), σχηματίζουν πολυ-υδροξυαλκανοϊκά οξέα (PHAs)

- ❖ Παράλληλα διασπούν τις πολυφωσφορικές ενώσεις, απελευθερώνοντας φωσφορικά και γλυκογόνο

- ❖ Υπό αερόβιες ή ανοξικές συνθήκες αποθηκεύουν, ως ενδοκυτταρικό πολυφωσφορικό, περισσότερο φώσφορο από αυτό που χρειάζονται για την ανάπτυξη και τη συντήρησή τους

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal
  - ❖ Αερόβια ή ανοξικά, τα ενδοκυτταρικά PHAs χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ενώ το γλυκογόνο αναπληρώνεται.
  - ❖ Υπό αερόβιες ή ανοξικές συνθήκες, σχηματίζεται και αποθηκεύεται πολύ περισσότερο πολυφωσφορικό, σε σχέση με αυτό που υδρολύεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες,
  - ❖ Έτσι, επιτυγχάνεται καθαρή αφαίρεση φωσφόρου μέσω της απόρριψης περίσσειας ιλύος από την αερόβια ή ανοξική βαθμίδα.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal

❖ Η υδρόλυση του πολυφωσφορικού αναερόβια αναστέλλεται σε συγκεντρώσεις νιτρικών μεγαλύτερες από 2 και 1 mg/l για οξειποιημένο ή μη υγρό απόβλητο αντίστοιχα.

❖ Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, η βιολογική αφαίρεση φωσφόρου σε συστήματα ενεργού ιλύος στην πράξη εφαρμόζεται υποχρεωτικά σε συνδυασμό με τις βιολογικές διεργασίες αφαίρεσης αζώτου, μέσω νιτροποίησης-απονιτροποίησης.

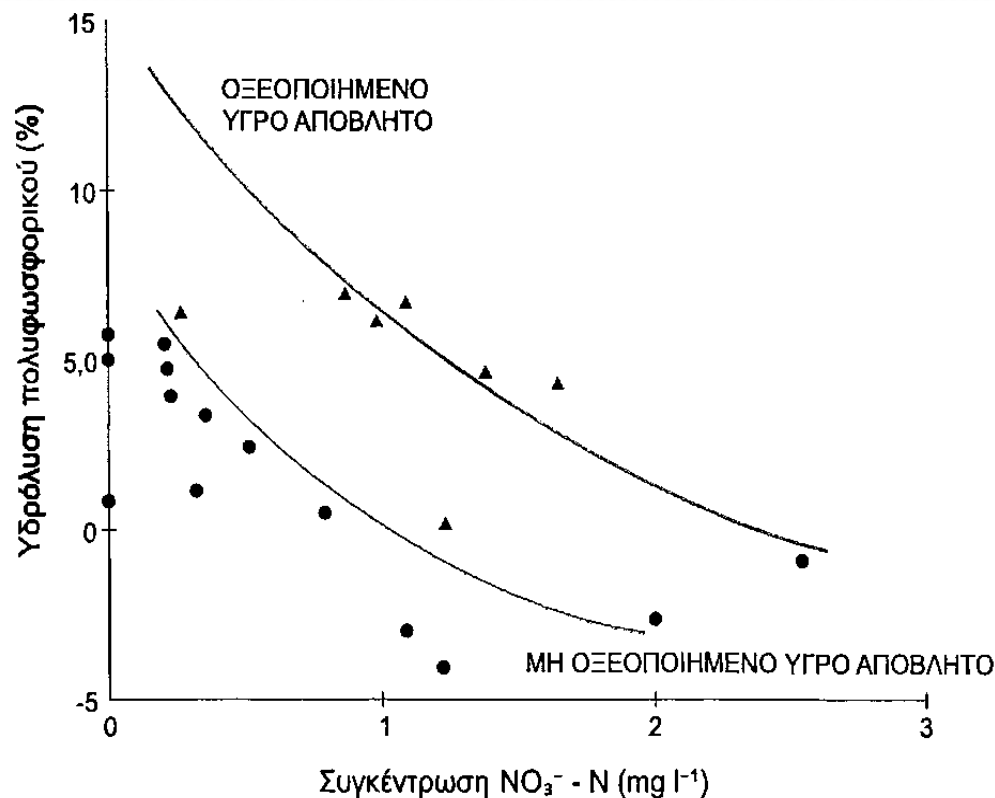


# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal
  - ❖ Διαπιστώθηκε μέσω μοριακών τεχνικών ότι τα πολύ-P βακτήρια ανήκουν στην κλάση *β-Proteobacteria*
  - ❖ Προσφάτως δόθηκε στα πολύ-P βακτήρια η ονομασία *Candidatus Accumulibacter phosphatis*
  - ❖ Βάσει φυλογενετικών μελετών, διακρίνονται δύο "τύποι" *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Type I και II) που περιλαμβάνουν περαιτέρω διακριτούς «υποτύπους»
  - ❖ Βιολογική αφαίρεση φωσφόρου φαίνεται να επιτελούν ορισμένα στελέχη του γένους *Tetrasphaera*

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal



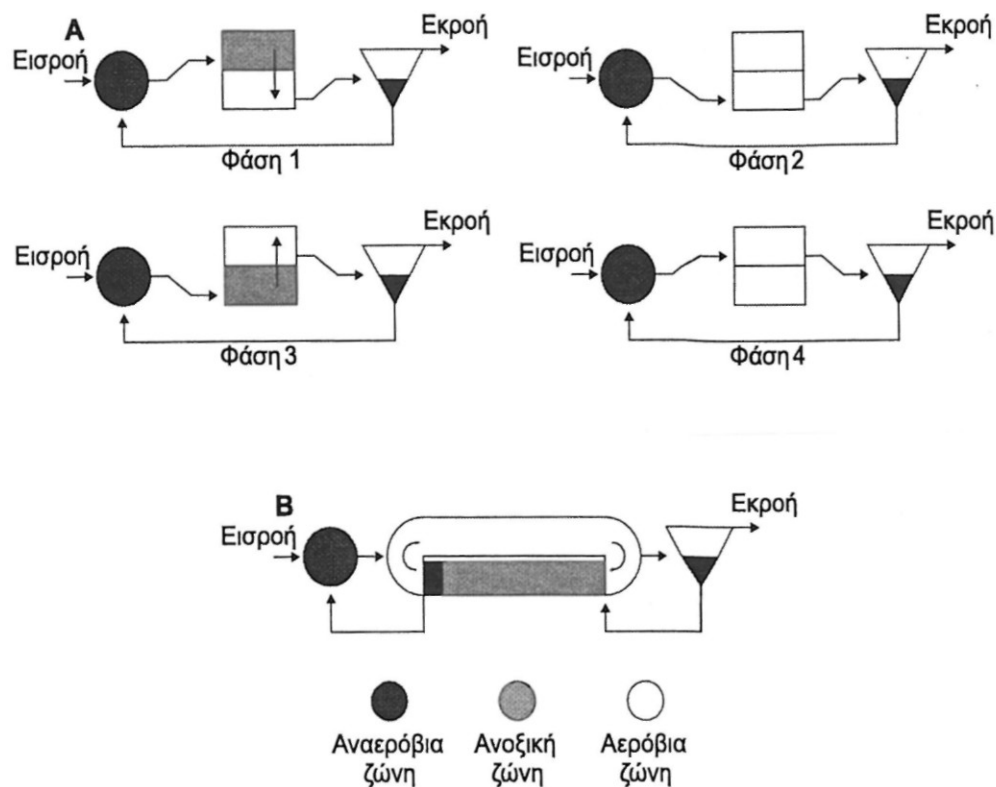
Επίδραση της συγκέντρωσης νιτρικών κατά τον αποπολυμερισμό πολυφωσφορικού σε οξεοποιημένο και μη-οξεοποιημένο υγρό απόβλητο.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal
  - ❖ Μέχρι στιγμής δεν έχει καταστεί εφικτή η απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια στελεχών PAOs
  - ❖ Πολλές φορές παρατηρείται αστάθεια σε συστήματα εκτεταμένης Βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου, οφειλόμενη στην επικράτηση μίας κατηγορίας βακτηρίων που είναι ανταγωνιστικοί προς τους PAOs
  - ❖ Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται κατά αναλογία Glycogen Accumulating Organisms (GAOs) ή G-βακτήρια

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

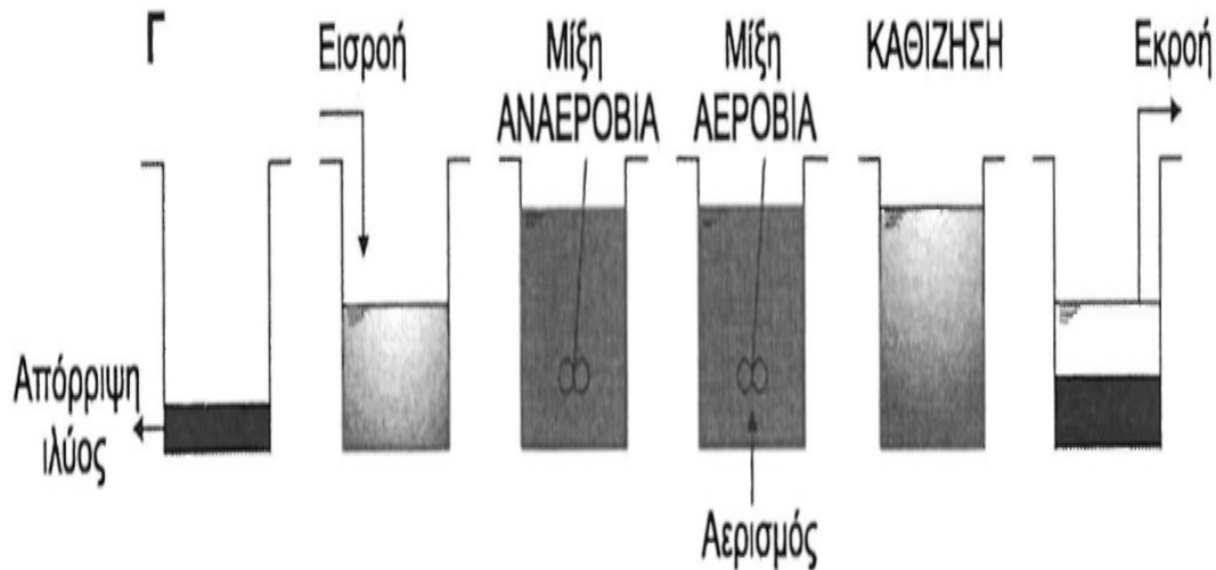
- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal



Κυκλικές μέθοδοι για τη βιολογική αφαίρεση N και P  
A) BIODENIPHO B) οξειδωτική τάφρος

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- EBPR-Enhanced Biological Phosphorus Removal



Κυκλικές μέθοδοι για τη βιολογική αφαίρεση N και P  
Γ) SBR

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

---

- Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)
  - Η τεχνική FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) χρησιμοποιείται στην ανίχνευση και απαρίθμηση κατηγοριών μικροοργανισμών.
  - Με τη μέθοδο αυτή, μετά από κατάλληλη προετοιμασία των υπό εξέταση κυττάρων που επιτρέπει τη διέλευση φθορίζουσών ανιχνευτών, το DNA τους αποδιατάσσεται και ακολουθεί προσθήκη φθορίζοντος ανιχνευτή (επισημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο).

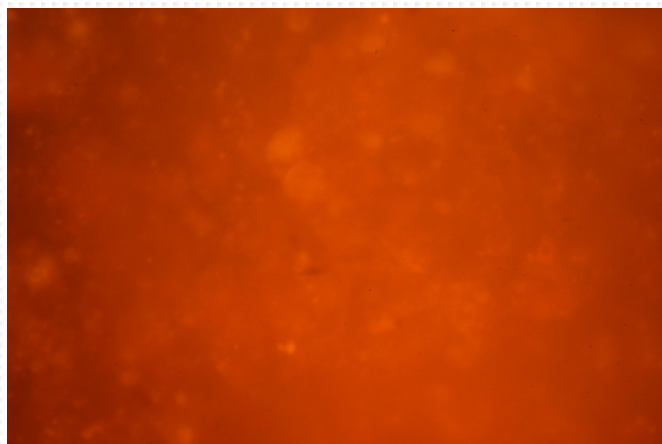
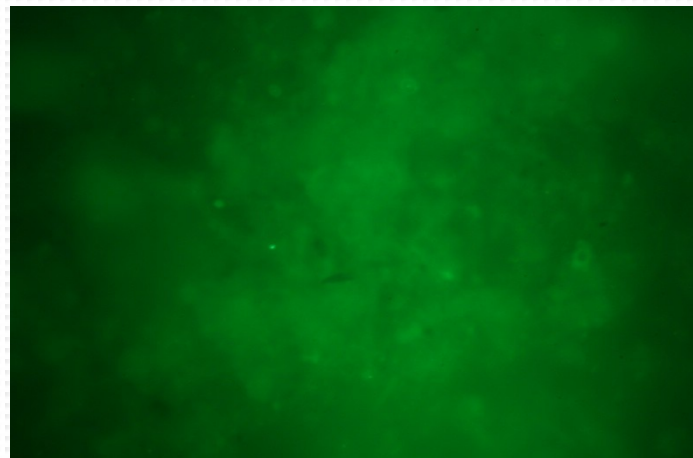
# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

---

- Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)
  - Ο ανιχνευτής που είναι εξειδικευμένος για μία κατηγορία μικροοργανισμών ή κυττάρων υβριδίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος αυτών. Η αλληλουχία των θέσεων αυτών είναι συμπληρωματική προς την αλληλουχία του ανιχνευτή.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)

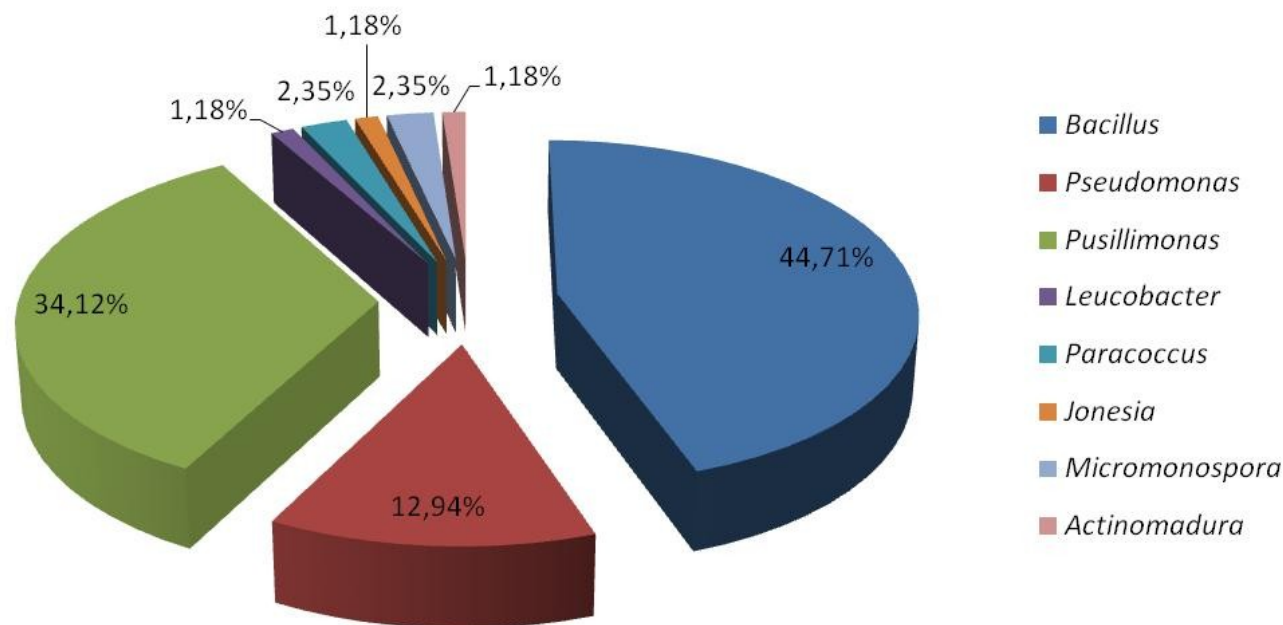


Απεικόνιση μικροβιακού πληθυσμού με την μέθοδο FISH



# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)



# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)

Στην προκειμένη περίπτωση η πλειονότητα των στελεχών που αναλύθηκαν ανήκουν στα γένη

- ❖ *Bacillus* (οικογένεια *Bacillaceae*),
- ❖ *Pseudomonas* (οικογένεια *Pseudomonadaceae*)
- ❖ *Raenalcaligenes/Pusillimonas* (οικογ. *Alcaligenaceae*).

Τα είδη αυτά μικροοργανισμών σχετίζονται με την αποδόμηση δυσκόλως αποδομήσιμων οργανικών υποστρωμάτων και συστατικών.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

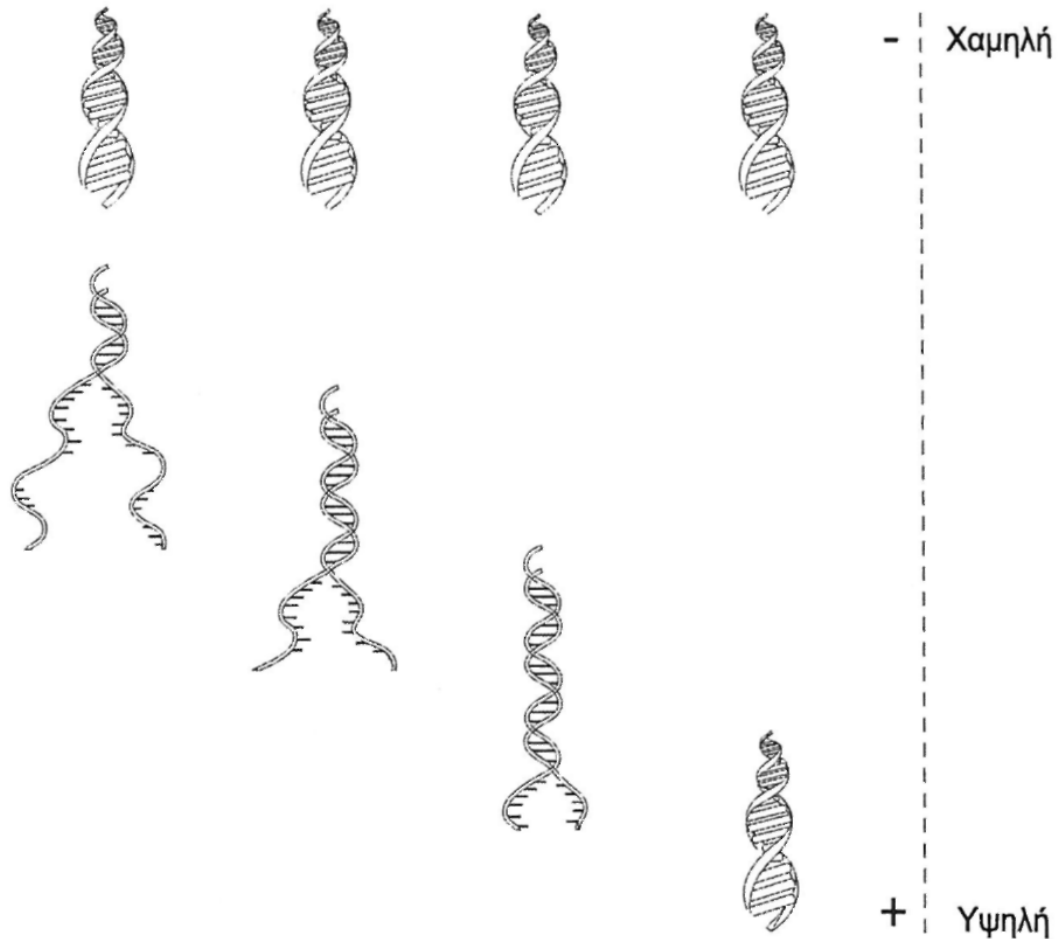
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό κλίση αποδιατακτικού παράγοντα ή θερμοκρασίας (ανάλυση DGGE ή TGGE)
  - ❖ Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό τμημάτων DNA ίδιου μήκους, αλλά διαφορετικής σύστασης βάσεων.
  - ❖ Μετά την εξαγωγή του γενωμικού DNA ενός περιβαλλοντικού δείγματος, πραγματοποιείται ενίσχυση του υπό εξέταση τμήματος DNA, π.χ. των γονιδίων 16S rRNA, με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- DGGE ή TGGE
  - ❖ Ο διαχωρισμός των ενισχυμένων τμημάτων DNA που προκύπτουν από την PCR λαμβάνει χώρα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία μίας διαβάθμισης ενός αποδιατακτικού μέσου, δηλαδή μέσω μίας διαβάθμισης συγκεντρώσεων ουρίας και φορμαμιδίου (ανάλυση DGGE) ή μίας διαβάθμισης θερμοκρασίας (ανάλυση TGGE).
  - ❖ Η διαφοροποίηση του ποσοστού γουανίνης-κυτοσίνης (%GC) των ενισχυόμενων τμημάτων προκαλεί διαφορετικού βαθμού αποδιάταξη δίκλωνων μορίων DNA.

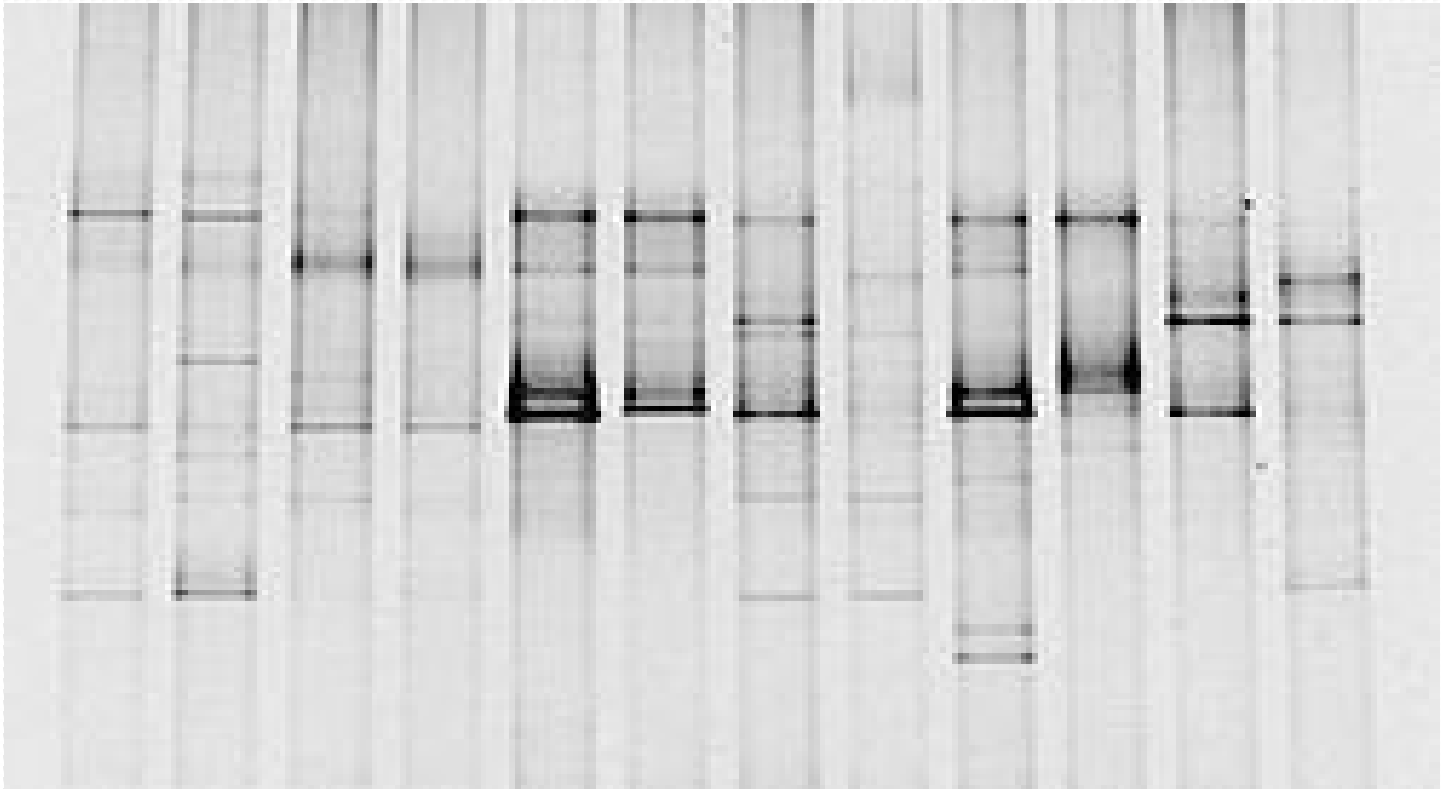
# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- DGGE ή TGGE



# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- DGGE ή TGGE



# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Βιβλιοθήκη κλώνων

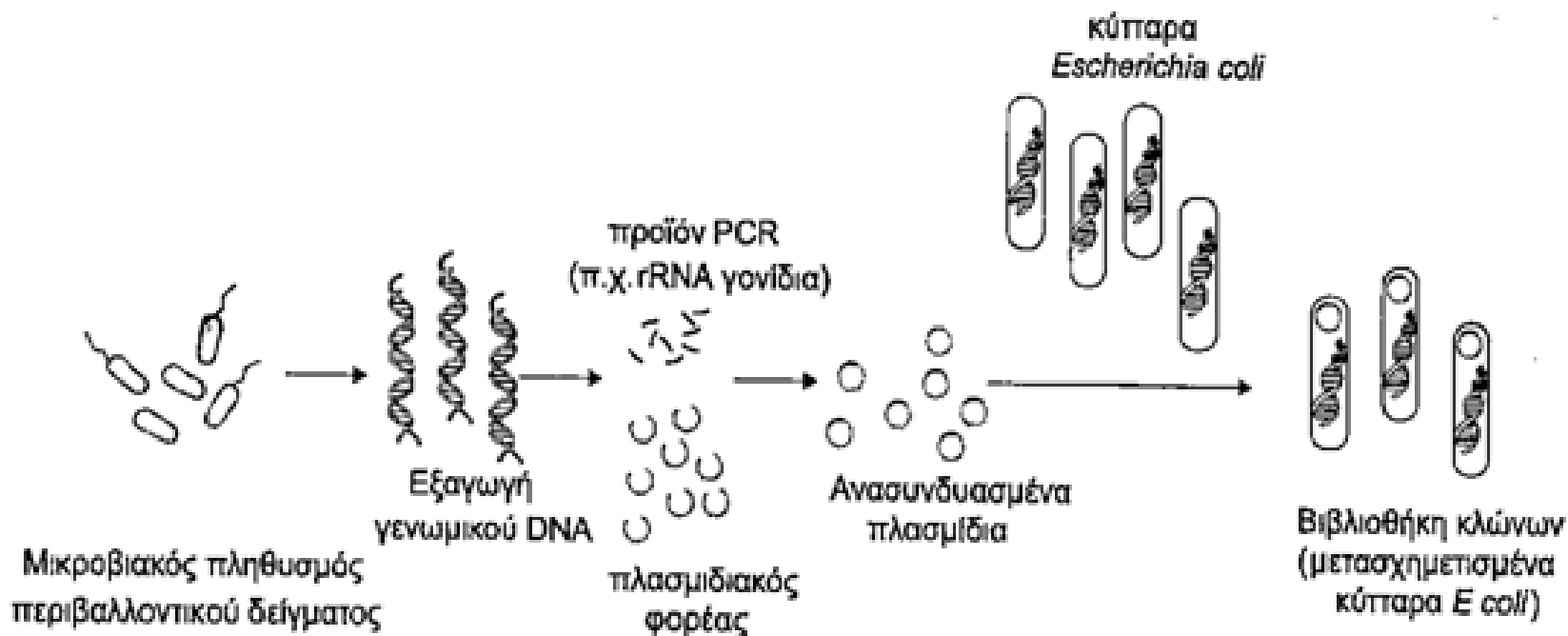
- ❖ Για την κατασκευή γονιδιακών βιβλιοθηκών, αρχικά πραγματοποιείται εξαγωγή γενωμικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα και ενίσχυση ενός συγκεκριμένου γονιδίου με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

- ❖ Ακολουθεί προσθήκη του προϊόντος της PCR σε πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *Escherichia coli*.

- ❖ Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο φυλογενετικός προσδιορισμός του μικτού πληθυσμού ενός περιβαλλοντικού δείγματος.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Βιβλιοθήκη κλώνων



Κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης.



# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Μέθοδος Pyrosequencing

- Ο τρόπος αυτός αλληλούχισης βασίζεται στην ενεργότητα της DNA πολυμεράσης και των ενζύμων

- ❖ σουλφουρυλάση του ATP,

- ❖ λουσιφεράση

- ❖ απυράση,

παρουσία φωσφοθεικής αδενοσίνης (adenosine 5'phosphosulfate-APS) και λουσιφερίνης.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

---

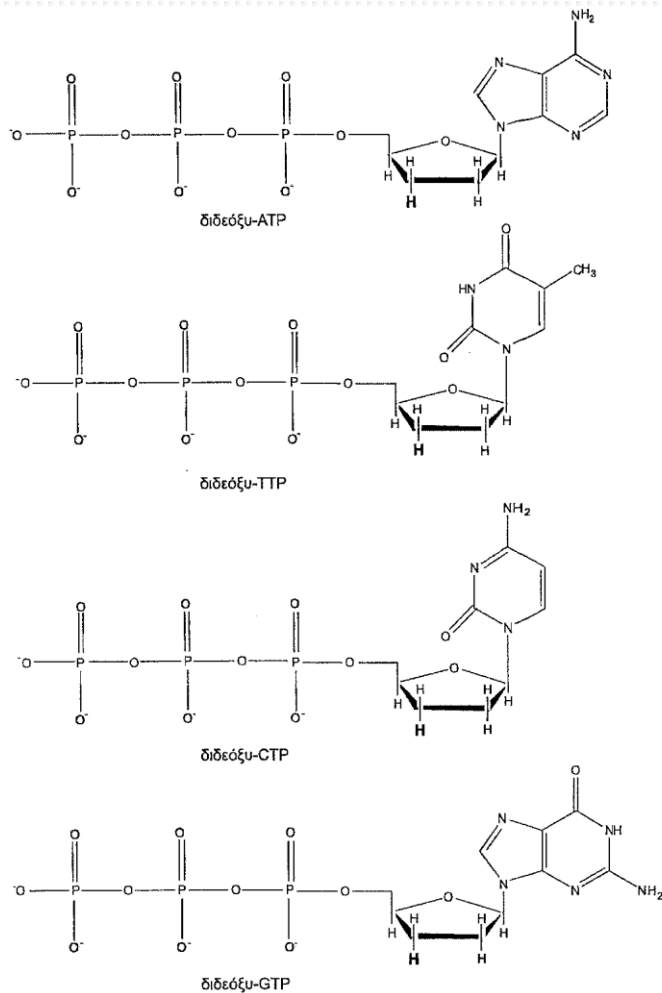
- Μέθοδος Pyrosequencing

❖ Με τη μέθοδο αυτή, το υπό εξέταση δείγμα DNA είναι ακινητοποιημένο, ενώ διαλύματα των τεσσάρων ειδών νουκλεοτιδίων (βάσεων) προστίθενται διαδοχικά. Ακολούθως απομακρύνεται η αδέσμευτη ποσότητα νουκλεοτιδίων πριν την προσθήκη των επόμενων διαλυμάτων.

❖ Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται το συμπληρωματικό DNA με προσθήκη μίας βάσεως, γνωστής κάθε φορά.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

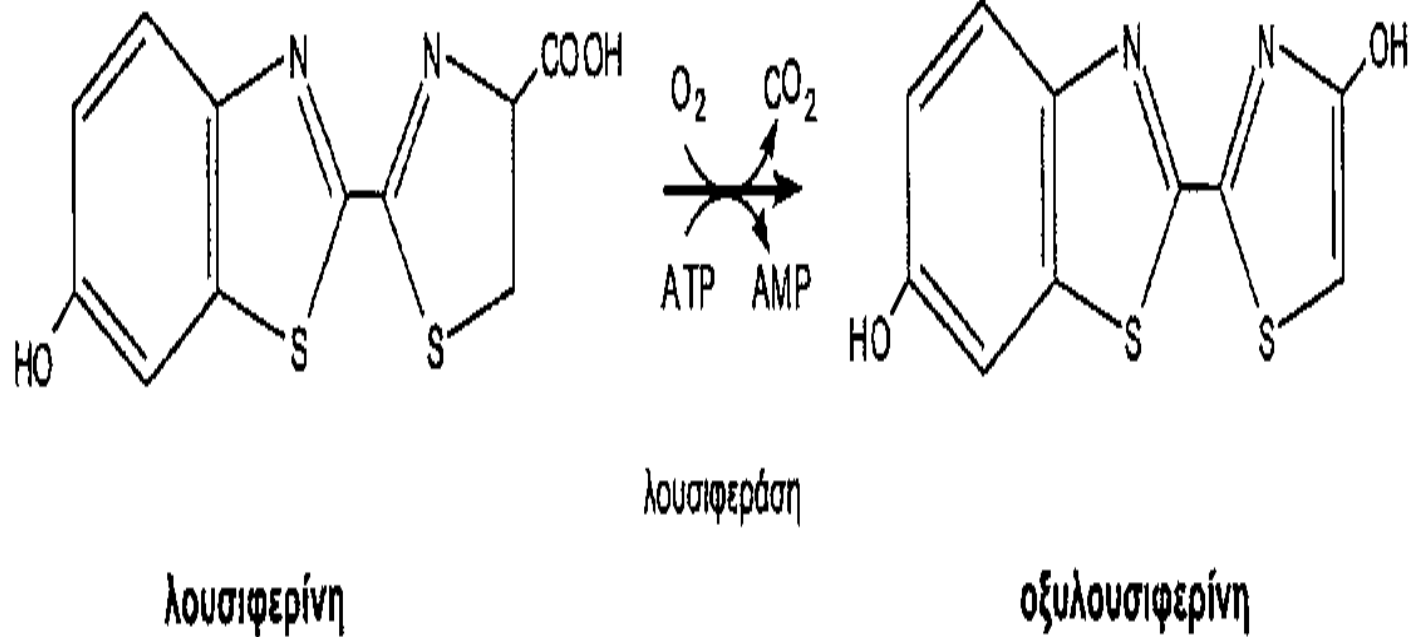
- Μέθοδος Pyrosequencing



Διδεόξυ-NTPs

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Μέθοδος Pyrosequencing



Μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)
  - ❖ Έχει δώσει σημαντική ώθηση στην τεχνολογία του DNA
  - ❖ Πραγματοποιείται εξολοκλήρου in vitro χωρίς την παρουσία ζώντων κυττάρων.
  - ❖ Ένα εκμαγείο DNA πολλαπλασιάζεται σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής με τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση.
  - ❖ Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που πρόκειται να αντιγράψει από ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), τα οποία υβριδίζονται με τα άκρα του επιθυμητού εκμαγείου DNA.

# Περιβαλλοντική μικροβιολογία

- Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

