

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Νικόλαος Δράκος

Καλαμάτα 2005

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Νικόλαος Δράκος

Εισηγητές: Δρ Ντούγιας Σπυρίδων
Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα

Καλαμάτα 2005

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ Ντούγια Σπυρίδωνα για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά την ανάθεση, την διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στο Δρ. Ζερβάκη Γεώργιο, Διευθυντή του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, για την διάθεση των αναλώσιμων και των εργαστηριακών χώρων, καθώς και στη Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα, Καθηγήτρια Εφαρμογών του ΤΕΙ Καλαμάτας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξάγω την παρούσα πτυχιακή εργασία στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τον αδερφό μου Γιάννη και την αδελφή μου Σταυρούλα για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά την διάρκεια των σπουδών μου στην Καλαμάτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν α) ο χαρακτηρισμός οκτώ στελεχών ζυμών και ενός στελέχους βακτηρίου με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων και φυλογενετικής ανάλυσης, και β) η μελέτη της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, που παρουσιάζουν υψηλή φυτοτοξική και αντιμικροβιακή δράση, με τη χρήση μικρού πληθυσμού, τα μέλη του οποίου απομονώθηκαν από υγρά και στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων και έχουν τη ικανότητα να αποδομούν τα απόβλητα αυτά.

Ο χαρακτηρισμός των στελεχών ζυμών και βακτηρίου στηρίχθηκε στην εύρεση της αλληλουχίας βάσεων του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2, που περιλαμβάνει το γονίδιο 5.8S rDNA και τις μη συντηρημένες περιοχές DNA ITS1 και ITS2, και του γονιδίου 16S rDNA, αντιστοίχως.

Βάσει της φυλογενετικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι I) τρεις απομονώσεις ζυμών (GAR-15, GAR-20 και GOLD-13) αποτελούν στελέχη του είδους *Filobasidium capsuligenum*, II) τέσσερις απομονώσεις ανήκουν στο γένος *Pichia*, με τα ζεύγη στελεχών GAR-12B και GAR-17, και GAR-21 και GAR-22, να παρουσιάζουν μικρή φυλογενετική συσχέτιση με τα *P. deserticola* και *P. fabianii* III) ένα στέλεχος ζύμης (FWW-9) ανήκει στο γένος *Rhodotorula* και IV) η βακτηριακή απομόνωση (FWW-12A) αποτελεί στέλεχος του είδους *Acetobacter tropicalis*. Πέντε από τις οκτώ απομονώσεις ζυμών τοποθετούνται σε τρεις νέες φυλογενετικές θέσεις, δύο στο γένος *Pichia* και μία στο γένος *Rhodotorula*, και φαίνεται ότι αποτελούν καινούργια είδη των γενών αυτών.

Κατά την μελέτη της μείωσης της τοξικότητας των ΥΑΕ με τη βοήθεια μικτού πληθυσμού μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε έντονος αποχρωματισμός των ΥΑΕ, μειώνοντας το χρώμα τους κατά 300%. Επίσης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση της βλαστικότητας δεν συνοδεύεται απαραίτητα και από μείωση του φαινολικού φορτίου, αφού στην περίπτωση της συνεργιστικής δράσης των μικροοργανισμών αυτών, όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου αλλά μικρή αύξηση αυτού. Τέλος, κατά τη δράση του μικτού πληθυσμού μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε κατακρήμνιση στερεού, στοιχείο σημαντικό για την μείωση του οργανικού φορτίου με την χρήση φυσικοχημικών μεθόδων.

Abstract

The aim of this project was I) the characterization of nine microbes (8 yeast and 1 bacterium), capable to bioremediate both soil and liquid wastes, which are produced from the olive oil extraction process and possessed high level of biotoxicity, and II) the bioremediation of olive mill wastewater (OMW) by using consortium of microbes, isolated from OMW and 'alpeorujo'.

Microbial identification was based on the sequence of the non-encoding regions ITS1 and ITS2, and the 5.8S rDNA gene (yeast identification) and the sequence of 16S rDNA gene (bacterial identification).

Based on phylogenetic analysis, three isolates were strains of *Filobasidium capsuligenum*, four isolates were related to the genus *Pichia*, and one isolate was associated with the genus *Rhodotorula*. The only bacterial isolate was placed in the spectrum of *Acetobacter tropicalis*. The five isolates, related to the genera *Pichia* and *Rhodotorula*, represent three novel phylogenetic linkages among these species.

After treatment of OMW with consortium of microbes, the liquid waste was decolorized significantly, reducing the color by 300%. Based on our results, no correlation between decrease in polyphenolic content and simultaneously increase in germination index was observed.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

bp: βάσεις DNA.

COD: Chemical Oxygen Demand (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο).

CTAB: Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide.

FWW: στερεό απόβλητο ελαιοπυρηνολύματος που παρελήφθη από την Κρήτη.

GAR: υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου που παρελήφθη από τους Γαργαλιάνους τον Ιανουάριο του 2004.

GOLD: υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου που παρελήφθη από τους Γαργαλιάνους τον Νοέμβρη του 2003.

OD_{600 nm}: απορρόφηση του φωτός στα 600 nm.

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

rpm: περιστροφή ανά λεπτό.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

TAE: Tris-HCl/Acetic acid/EDTA.

TE: Tris-HCl/EDTA.

YAE: υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	I
Περίληψη	II
Abstract.....	III
Συντομογραφίες.....	IV
Περιεχόμενα	V
Περιεχόμενα Πινάκων	VIII
Περιεχόμενα Εικόνων.....	IX
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.1. Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου.....	1
1.2. Είδη ελαιοτριβείων.	2
1.3. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών και στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	3
1.4. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).....	3
1.5. Αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση ζυμών και βακτηρίων.....	4
1.6. Χαρακτηρισμός στελεχών μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους.....	5
1.7. Το βασίλειο <i>Bacteria</i>	7
1.8. Το βασίλειο <i>Archaea</i>	8
1.9. Το Βασίλειο των μυκήτων (<i>Fungi</i>).....	9
1.9. Συστηματική κατάταξη ζυμών.....	9
1.10.1. Ζύμες εκβλάστησης (<i>budding yeasts</i>).....	10
1.10.2. Ζύμες διάσπασης-διαχωρισμού (<i>fission yeasts</i>).....	11
1.10.3. Μαύρες ζύμες (<i>black yeast</i>).....	12
1.10.4. Ζύμες του φύλλου <i>Basidiomycota</i> (<i>basidiomycetous yeasts</i>).....	13
1.11. Το γένος <i>Pichia</i> (Hansen, 1904).....	13
1.12. Το γένος <i>Rhodotorula</i> (Harison, 1927).....	13
1.13. Το γένος <i>Filobasidium</i> (Olive, 1968).....	14
1.14. Το γένος <i>Acetobacter</i> (Beijerinck, 1898).....	14
1.15. Βασικές αρχές βιοπληροφορικής.....	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. Δείγματα.....	17
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	17
2.2.1. Θρεπτικά υποστρώματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).....	17
2.2.2. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA).....	18
2.3. Διατήρηση απομονώσεων βακτηρίων και ζυμών.....	19
2.4. Εξαγωγή γονιδιακού DNA μικροοργανισμών.....	19
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	21
2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.....	24
2.7. Εισαγωγή DNA (προϊόν PCR) σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation).....	25
2.8. Γενετικός μετασηματισμός κυττάρων (transformation).....	25
2.9. Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA.....	27
2.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάση περιορισμού.....	28
2.11. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.....	29
2.12. Εύρεση της αλληλουχίας βάσεων τμημάτων DNA.....	31
2.13. Φυλογενετική ανάλυση.....	31
2.14. Πειραματικός σχεδιασμός αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με ‘μικτό πληθυσμό-consortium’ μικροοργανισμών.....	32
2.14.1. Μέτρηση βιομάζας.....	33
2.14.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών.....	33
2.14.3. Μέτρηση απορρόφησης (χρώμα).....	34
2.14.4. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας.....	34
2.14.5. Μέτρηση pH.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ.....	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
3.1. Χαρακτηρισμός μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους.....	36
3.2. Μελέτη της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με ‘μικτό πληθυσμό-consortium’ μικροοργανισμών.....	39
3.2.1. Βιομάζα.....	40
3.2.2. Αποχρωματισμός.....	41
3.2.3. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	42
3.2.4. Βλαστικότητα.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
4.1. Συζήτηση.....	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	49
Παράρτημα 1. Αλληλουχίες βάσεων των στελεχών βακτηρίου και ζυμών.....	49
Παράρτημα 2. Σύγκριση των αλληλουχιών βάσεων των απομονώσεων βακτηρίου και ζυμών.....	51
Παράρτημα 3. Φυλογενετικές αποστάσεις των στελεχών ζυμών.....	59
Παράρτημα 4. Φυλογενετικές αποστάσεις του στελέχους βακτηρίου FWW-12A.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	70
Διαδικτυακές Διευθύνσεις.....	70

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Γενικά χαρακτηριστικά απομονώσεων μικροοργανισμών.....	17
Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός της βιομάζας μυκήτων σε 25% v/v ΥΑΕ.....	40
Πίνακας 3.2. Προσδιορισμός του μυκηλίου κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.....	40
Πίνακας 3.3. Προσδιορισμός του χρώματος ($A_{525\text{ nm}}$) στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.....	41
Πίνακας 3.4. Προσδιορισμός του χρώματος ($A_{525\text{ nm}}$) κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.....	42
Πίνακας 3.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.....	42
Πίνακας 3.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.....	43
Πίνακας 3.7. Προσδιορισμός της βλαστικότητας στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.....	44
Πίνακας 3.8. Προσδιορισμός της βλαστικότητας (%) κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.....	44
Πίνακας 4.1. Φυλογενετική συσχέτιση των στελεχών βακτηρίου και ζυμών.....	48

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σχηματική παράσταση των γονιδίων 18S rDNA, 5.8S rDNA και 28S rDNA των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών.....	6
Εικόνα 1.2. Σχηματική παράσταση των γονιδίων 16S rDNA, 23S rDNA και 5S rDNA των προκαρυωτικών μικροοργανισμών.....	7
Εικόνα 1.3. Εκβλάστηση της ζύμης <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Εικόνα 1.4. Διάσπαση-διαχωρισμός κυττάρου του είδους <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
Εικόνα 1.5. Ανάπτυξη μαύρης ζύμης.....	12
Εικόνα 3.1. Γονιδιακό DNA των στελεχών βακτηρίου και ζυμών. Από αριστερά προς τα δεξιά: δείκτη μοριακών βαρών (100 bp), FWW-9, FWW-12A, GAR-12B, GOLD-13, GAR-15, GAR-17, GAR-20, GAR-21 και GAR-22.....	36
Εικόνα 3.2. Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rDNA και του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 στελεχών βακτηρίου και ζυμών αντίστοιχα. Από αριστερά προς τα δεξιά: μάρτυρας-τυφλό, FWW-9, GAR-12B, GOLD-13, GAR-15, GAR-17, GAR-20, GAR-21, GAR-22, δείκτη μοριακών βαρών (100 bp) και FWW-12A.....	37
Εικόνα 3.3. Δενδρόγραμμα των φυλογενετικών θέσεων των απομονώσεων ζυμών της παρούσας μελέτης. Φυλογενετικές αποστάσεις προσδιορίστηκαν με την μέθοδο του Kimura (1980) και το δενδρόγραμμα σχεδιάστηκε με την μέθοδο ‘neighbor-joining’ των Saitou και Nei (1987) βάση αναλύσεων 100 δένδρων, λαμβάνοντας υπόψη προσθήκες και διαγραφές βάσεων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο. Η αλληλουχία βάσεων του τμήματος DNA ITS1-5.8S-ITS2 του είδους <i>Ascochyta lentis</i> επιλέχτηκε τυχαία για την καθοδήγηση του δενδρογράμματος.....	38
Εικόνα 3.4. Δενδρόγραμμα της φυλογενετικής θέσης της βακτηριακής απομονώσεων FWW-12A. Φυλογενετικές αποστάσεις προσδιορίστηκαν με την μέθοδο των Jukes και Cantor (1969) και το δενδρόγραμμα σχεδιάστηκε με την μέθοδο των Saitou και Nei (1987) ‘neighbor-joining’ βάση αναλύσεων 100 δένδρων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο. Η αλληλουχία βάσεων του γονιδίου 16S rDNA του είδους <i>Oleomonas sagaranensis</i> επιλέχτηκε τυχαία για την καθοδήγηση του δενδρογράμματος.....	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1. Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου.

Στις χώρες της Μεσογείου είναι συγκεντρωμένο το 98% των ελαιόδεντρων της γης, αν και στα επόμενα χρόνια, χώρες όπως η Αυστραλία που επιχειρεί μαζική ανάπτυξη της ελαιοκομίας, αναμένεται να μειώσουν ελαφρά το ποσοστό αυτό. Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο, μετά την Ισπανία και την Ιταλία, με περισσότερα από 130 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, που παράγουν γύρω στους 350.000 τόνους ελαιολάδου ετησίως (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999).

Ο ελαιόκαρπος, μετά την συγκομιδή του, οδηγείται στο ελαιοτριβείο μέσα σε σακιά χωρητικότητας 50 ή 80 κιλών. Με την βοήθεια αναβατορίου, η ποσότητα του ελαιοκάρπου προωθείται αρχικά στο αποφυλλωτήριο, όπου απομακρύνονται τα ελαιόφυλλα. Στην συνέχεια, ο ελαιόκαρπος εκπλένεται με νερό, απομακρύνοντας τις σκόνες και τυχόν ακαθαρσίες. Ακολουθεί η σύνθλιψη του ελαιοκάρπου προκειμένου να μετατραπεί σε ομοιογενή πούλπα, γνωστή ως ελαιοζύμη, η οποία διοχετεύεται στον μαλακτήρα, όπου πραγματοποιείται μάλαξη αυτής. Έπειτα, η ελαιομάζα μεταφέρεται στο πρώτο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, όπου αραιώνεται με ζεστό νερό, και τροφοδοτείται χωρίς διακοπή στο περιστρεφόμενο τύμπανο του φυγοκεντρητή. Κατά την άσκηση φυγοκεντρικής δύναμης, το στερεό υπόλειμμα διαχωρίζεται από την υγρή φάση, και αποβάλλεται από τα ειδικά στόμια του φυγοκεντρικού διαχωριστήρα. Η υγρή φάση μεταφέρεται σε δεύτερο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, όπου γίνεται ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από την υδατική φάση, εξαιτίας της διαφοράς στα ειδικά βάρη λαδιού και φυτικών υδαταδιαλυτών υγρών και της διαφοράς πολικότητας (Μπαλατσούρας, 1997: Κυριτσάκης, 1989).

Δυστυχώς, αντίστοιχα με τις μεγάλες ποσότητες ελαιοκάρπου που οδηγούνται προς ελαιοποίηση, είναι και οι ποσότητες των υγρών αποβλήτων που παράγονται κατά τη διαδικασία έκθλιψής του. Με δεδομένη την αυξομείωση που παρουσιάζει η ελαιοπαραγωγή από χρονιά σε χρονιά, υπολογίζεται ότι στην Ελλάδα παράγονται κατά μέσο όρο 1.5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων και 400.000 τόνοι στερεών υπολειμμάτων-παραπροϊόντων ετησίως (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999).

1.2. Είδη ελαιοτριβείων.

Τα είδη ελαιοτριβείων είναι τρία, ήτοι τα κλασικού τύπου ελαιοτριβεία, τα ελαιοτριβεία φυγοκεντρικού τύπου και τα μεικτού τύπου ελαιοτριβεία. Στα ελαιοτριβεία κλασικού τύπου, ο διαχωρισμός του ελαιολάδου επιτυγχάνεται με την εφαρμογή υδραυλικής πίεσης. Με την άσκηση της πίεσεως, διαχωρίζεται η χυμώδης φάση της ελαιοζύμης από την στερεά. Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιόλαδου από την υδατική φάση και τα στερεά υπολείμματα πραγματοποιείται με φυγοκέντρωση σε κάθετο διαχωριστήρα (Μπαλατσούρας, 1997).

Η λειτουργία των ελαιουργείων φυγοκεντρικού τύπου βασίζεται στη διαφορά του ειδικού βάρους των συστατικών της ελαιοζύμης. Κατά το πέρασμα της ελαιοζύμης από το φυγοκεντρητή, οριζόντιας ή κάθετης διατάξεως, η λιπαρή και υδάτινη φάση διαχωρίζονται και παραλαμβάνονται ξεχωριστά. Η λειτουργία ελαιοτριβείων μεικτού τύπου βασίζεται τόσο στη διαφορετική συνάφεια που παρουσιάζουν τα συστατικά της ελαιοζύμης όσο και στο ειδικό βάρος αυτών (Κυριτσάκης, 1989).

Τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία διακρίνονται σε τριών και δυο φάσεων. Τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων εμφανίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '70, και διαχωρίζουν, μέσω μιας συνεχής διαδικασίας, το λάδι από το νερό και τον ελαιοπυρήνα. Με την εμφάνιση των τριφασικών ελαιοτριβείων, η χρησιμοποίηση παραδοσιακών συστημάτων ασυνεχούς λειτουργίας περιορίστηκε. Το κύριο πρόβλημα του τριφασικού συστήματος είναι η παραγωγή κατά τη διάρκεια της λειτουργίας των ελαιοτριβείων (Νοέμβριο με Φεβρουάριο) μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ), με συνέπεια την εισαγωγή και εφαρμογή ενός νέου συστήματος εξαγωγής ελαιολάδου στις αρχές της δεκαετίας του '90, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως διφασικό. Τα διφασικά ελαιοτριβεία, τα οποία έχουν τεθεί σε ευρεία λειτουργία τα τελευταία χρόνια, μειώνουν σημαντικά την παραγωγή υγρών αποβλήτων. Στα ελαιοτριβεία αυτά, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες νερού για την αραίωση της ελαιοζύμης (75-90% λιγότερο νερό), παράγοντας τελικά ελαιόλαδο και μικρές ποσότητες ελαιοπυρηνολύματος (πούλπα). Το κύριο πλεονέκτημα των διφασικών ελαιοτριβείων είναι ότι περιορίζουν τη χρήση ηλεκτρικής ενέργειας για την θέρμανση του νερού και μειώνουν την κατανάλωση του χρησιμοποιούμενου ύδατος (Alburquerque *et al.*, 2003).

1.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών και στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Κατά την διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου παράγονται τεράστιες ποσότητες παραπροϊόντων. Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ), τα οποία είναι γνωστά και ως «λιόζουμα» ή «κατσίγαρος», προέρχονται από το υδάτινο κλάσμα των χυμών του ελαιοκάρπου, και του νερού πλύσεως και μάλαξης. Το χρώμα τους είναι έντονο καφέ ή μαύρο, το pH τους κυμαίνεται μεταξύ 5 με 5.5, ενώ η οσμή τους καθίσταται δυσάρεστη, όταν ζυμωθούν (Fountoulakis *et al.* 2002; Lamia και Moktar, 2003). Τα ΥΑΕ είναι πλούσια σε οργανικές και ανόργανες ουσίες, και περιέχουν αιωρούμενα σωματίδια. Οι οργανικές ουσίες τους διακρίνονται σε άμεσα διασπώμενες (σάκχαρα, οργανικά οξέα-αμινοξέα) και σε δύσκολα διασπώμενα συστατικά, όπως είναι διάφορες φαινολικές ενώσεις και μεγαλομοριακά λιπαρά συστατικά (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 1999).

Αν και το διαφασικό σύστημα μειώνει κατά πολύ την παραγωγή υγρών αποβλήτων, εντούτοις παράγεται ένα ημιστερεό παραπροϊόν, το ελαιοπυρηνόλυμα, γνωστό στις ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου ως “alreogıjo”. Η περιεκτικότητά του σε υγρασία είναι υψηλή (60-70%) και έχει παχύρρευστη μάζα, η οποία παρουσιάζει δυσκολίες στην μεταφορά και στην διαχείριση της. Η περιεκτικότητά του “alreogıjo” σε ολικά σάκχαρα, λιπίδια και πολυφαινολικά είναι 2.3%, 4.3% και 2.7% αντίστοιχα (Giannoutsou *et al.*, 2004).

1.4. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).

Η βιοτοξικότητα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) οφείλεται εν μέρει στις φαινολικές ενώσεις, στις οποίες αποδίδεται η βιολογική και οικολογική υποβάθμιση περιοχών πλησίον των ελαιοτριβείων. Η σύσταση των ΥΑΕ μεταβάλλεται συνεχώς εξαιτίας της δυναμικής τους φύσης, που οφείλεται τόσο σε φυσικοχημικές μεταβολές, π.χ. αυτόοξειδωση φαινολικών συστατικών, όσο και στη μικροβιακή δραστηριότητα (Lamia και Moktar, 2003). Γενικά, οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για το έντονο σκοτεινό χρώμα των αποβλήτων ελαιοτριβείων, τη φυτοτοξική και την αντιμικροβιακή τους δράση (Ammar και Ben Rouina, 1999; Ntougias *et al.*, 2003; Chtourou *et al.*, 2004).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των υγρών απόβλητων ελαιοτριβείων οφείλονται ακόμη στην ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων οξέων μικρού μοριακού βάρους, στην υψηλή συγκέντρωση λιπαρών συστατικών, και στο υψηλό οργανικό φορτίο τους (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 2000). Επίσης, η άμεση εφαρμογή των ΥΑΕ στο χώμα φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην σταθερότητα της δομής του εδάφους (Tejada *et al.*, 1997). Μπορεί επίσης να

έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη βλάστηση σπόρων και στην ανάπτυξη φυτών, καθώς και στην μικροβιακή δραστηριότητα στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Διάφορες μελέτες έχουν εκθέσει τις φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές συνέπειες (λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων λιπαρών και φαινολικών συστατικών, και του υψηλού οργανικού φορτίου των ΥΑΕ) των παραπροϊόντων ελαιοτριβείων (Gonzalez *et al.*, 1990; Riffaldi *et al.*, 1993; Linares *et al.*, 2001).

1.5. Αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση ζυμών και βακτηρίων.

Διάφορα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση μικροοργανισμών, αποσκοπώντας στην μείωση των φαινολικών ενώσεων των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Αναφορικά, μικροοργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό είναι μεταξύ άλλων ο μύκητας *Pleurotus ostreatus*, οι ζύμες *Yarrowia lipolytica* και *Candida tropicalis*, καθώς και το βακτήριο *Lactobacillus plantarum*.

Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, τα ΥΑΕ ευνοούν την ανάπτυξη αζωτοβακτηρίων (Chatjipavlidis *et al.*, 1996). Στην μελέτη αυτή, ΥΑΕ τα οποία είχαν προκατεργαστεί με H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον και μεταφερθεί σε αεριζόμενο βιοαντιδραστήρα, εμβολιάστηκαν με στέλεχος του είδους *Azotobacter vinelandii*. Από την επίδραση του μικροοργανισμού αυτού παρατηρήθηκε μείωση των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ, και σύνθεση υψηλών ποσοτήτων αυξητικών παραγόντων (π.χ. αυξίνες) και μικροβιακών πολυσακχαριτών. Η εφαρμογή των επεξεργασμένων αυτών ΥΑΕ στο έδαφος επίσης προκάλεσε αναστολή της δράσεως των φυτοπαθογόνων εδάφους *Pythium* και *Phytophthora* (Chatjipavlidis *et al.*, 1996).

Κατά τον εμβολιασμό ΥΑΕ (10% v/v, pH 6) με το βακτήριο *Lactobacillus plantarum* παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 46%, του χρώματος κατά 58% και του COD κατά 55% (Lamia και Moktar, 2003).

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* προκάλεσε σε δείγματα ΥΑΕ μείωση του COD από 146 g l^{-1} σε 90 g l^{-1} μέσα σε διάστημα 12 h, ενώ με το πέρας 24 h το COD μειώθηκε επιπλέον σε 30 g l^{-1} (Scioli και Vollaro, 1997), όμως το ποσοστό ΥΑΕ, που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή, δεν αναφέρεται.

Για την αποικοδόμηση των ΥΑΕ έχει χρησιμοποιηθεί και η ζύμη *Candida tropicalis*, η οποία μετά από επώαση 24 h στους 40°C μείωσε το COD κατά 70%, τις πολυφαινόλες κατά 55% και τις μονοφαινόλες κατά 70% αντιστοίχως (Ettayebi *et al.*, 2003), εντούτοις το μέσο ανάπτυξης περιείχε μικρό ποσοστό ΥΑΕ (μικρότερο του 15%).

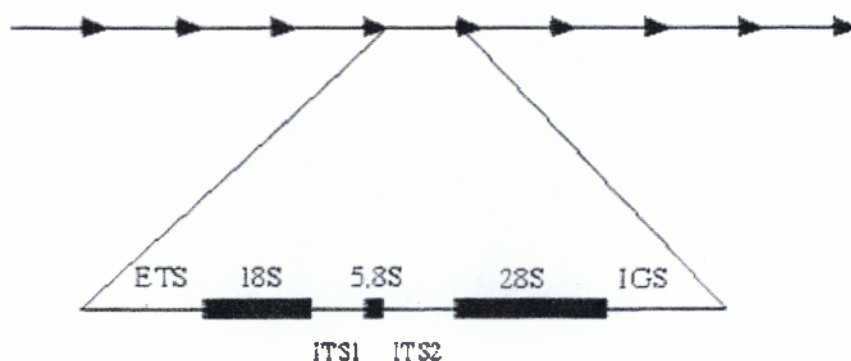
Οι ζύμες *Candida crusei*, *Saccharomyces chevalerie* και *Saccharomyces rouxii* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία των ΥΑΕ, λόγω της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών (Gharsallah, 1993), προκαλώντας μείωση του COD κατά 40-50%. Ικανοποιητικά αποτελέσματα παρουσίασε η ζύμη *Saccharomyces rouxii*, της οποίας η ανάπτυξη δεν παρεμποδιζόταν σε ΥΑΕ.

1.6. Χαρακτηρισμός στελεχών μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους.

Οι μοριακές τεχνικές αρχικά χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, εντούτοις τα τελευταία χρόνια οι τεχνικές αυτές έχουν υιοθετηθεί και από άλλους επιστημονικούς τομείς, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ταξινόμηση των μικροοργανισμών, στην μικροβιακή οικολογία και στην διάγνωση παθογόνων μικροοργανισμών. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ο υβριδισμός τμημάτων DNA είναι τα κύρια εργαλεία της μοριακής βιολογίας που έδωσαν ώθηση στην εξέλιξη των επιστημονικών αυτών πεδίων (Owen και Pitcher, 1985: Goodfellow και O'Donnell, 1993). Μέχρι πρόσφατα, η ταξινόμηση των μικροοργανισμών στηριζόταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Cowan και Steel, 1965: Alexopoulos και Mims, 1979). Οι διαφορές στον μεταβολισμό διαφόρων ενώσεων, στην ανθεκτικότητα παρουσία διαφόρων περιοριστικών παραγόντων, στο είδος των ενζύμων και στην ενζυμική δράση, καθώς και διαφορές στη λειτουργία και στην δομή των κυτταρικών μεμβρανών ήταν απαραίτητες για την διάκριση των ειδών των μικροοργανισμών, εντούτοις καμία πληροφόρηση δεν δινόταν για την εξελικτική πορεία των ειδών (Bowden, 1993: Bills *et al.*, 2003: Ciapini *et al.*, 2002). Εισαγωγή φυλογενετικών χαρακτηριστικών στην ταξινόμηση των ειδών, όπως ο προσδιορισμός του ποσοστού G+C στο γονιδίωμα, η γενετική συσχέτιση (DNA-DNA υβριδισμός), ο γενετικός πολυμορφισμός, η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων, και η εξέλιξη της βιοπληροφορικής έχει οδηγήσει σε ικανοποιητική κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών και στη μελέτη της εξέλιξης των βιολογικών ειδών (De Ley, 1970: Longan, 1994: Vanechoute, 1996: Thorn, 1997: Frisvad *et al.*, 1998).

Σύνθετες φαινόμενα είναι η παρατήρηση αντιστοιχίας μεταξύ γενετικών και φαινοτυπικών – φυσιολογικών χαρακτηριστικών, π.χ. μελέτη γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό πτητικών μεταβολιτών στο μέσο ανάπτυξης, ή μελέτη εξειδικευμένων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ύπαρξη χαρακτηριστικών βλαστικών δομών και για τη σπορογένεση, ή μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνθεση και στην έκφραση του ριβοσωμικού RNA.

Το γενετικό ανάγλυφο των μικροοργανισμών και η χαρακτηριστική αλληλουχία βάσεων των γονιδίων rDNA, συσχετίζονται άμεσα με την ιδιαίτερη μορφολογία και φυσιολογία του κάθε μικροβιακού είδους. Στην περίπτωση των ευκαρυωτικών οργανισμών, το rDNA είναι ένα επαναλαμβανόμενο πολυγονιδιακό σύστημα, αντίγραφα του οποίου μπορούν να τοποθετούνται και σε διαφορετικές χρωματοσωμικές θέσεις (πλέον της μίας) (Zoldos *et al.*, 1999). Το ευκαρυωτικό ριβόσωμα αποτελείται από τρεις υποομάδες, συνήθως την 5.8S, την 18S-γνωστή ως μικρή υποομάδα (small subunit-SSU)- και την 28S υποομάδα - γνωστή ως μεγάλη υποομάδα (large subunit-LSU) (Krawiec και Riley, 1990). Τα τμήματα μεταξύ των υποομάδων 18S και 5.8S rDNA και μεταξύ 5.8S και 28S rDNA αποτελούν περιοχές του χρωματώματος που παρουσιάζουν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα και καλούνται ως ITS1 (internal transcribed spacer 1) και ITS2 (internal transcribed spacer 2). Τα τμήματα DNA που διαχωρίζουν την μεγάλη και τη μικρή υποομάδα καλούνται ETS (external transcribed spacer) και IGS (intergenic spacer), τα οποία επίσης εξελίσσονται ραγδαία (Εικόνα 1.1). Στην περίπτωση των προκαρυωτικών μικροοργανισμών, το rDNA αποτελείται επίσης από τρεις υποομάδες, την 5S, την 16S (μικρή υποομάδα-small subunit-SSU)- και την 23S υποομάδα (μεγάλη υποομάδα-large subunit-LSU), οι οποίες ακολουθούν τη σειρά 5' 16S-23S-5S-3' και αποτελούν συντηρημένες περιοχές (Garcia-Martinez *et al.*, 1999: Krawiec και Riley, 1990). Τα τμήματα μεταξύ των υποομάδων 16S και 23S και μεταξύ 23S και 5S rDNA παρουσιάζουν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα, αν και το τμήμα DNA μεταξύ 23S και 5S rDNA είναι πολύ μικρό. Το τμήμα DNA μεταξύ των υποομάδων 16S και 23S καλείται άλλοτε ως ITS (internal transcribed spacer) και άλλοτε ως ISR (intergenic spacer region), και χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.1. Σχηματική παράσταση των γονιδίων 18S rDNA, 5.8S rDNA και 28S rDNA των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών.



Εικόνα 1.2. Σχηματική παράσταση των γονιδίων 16S rDNA, 23S rDNA και 5S rDNA των προκαρυωτικών μικροοργανισμών.

Ορισμένα τμήματα DNA είναι συντηρημένα, σε αντίθεση με άλλα τμήματα, τα οποία διαφοροποιούνται από είδος σε είδος (Hills και Dixon, 1991). Η εύρεση των αλληλουχιών βάσεων, είτε της μικρής (16S και 18S για βακτήρια και μύκητες αντίστοιχα) είτε της μεγάλης υποομάδας (23S και 28S για βακτήρια και μύκητες αντίστοιχα) (Εικόνες 1.1 και 1.2), επιτρέπει την ταξινόμηση των οργανισμών και την μελέτη της εξέλιξης αυτών.

Η μελέτη του γονιδίου rDNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη συστηματική μελέτη ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων συντηρημένων τμημάτων DNA (μικρό βαθμό μετάλλαξης), μας επιτρέπει συνήθως τον χαρακτηρισμό ανωτέρων ταξινομικών ομάδων όπως γένη και οικογένειες, ενώ η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων περιοχών που εξελίσσονται ραγδαίως, συμβάλουν στον προσδιορισμό κατώτερων ταξινομικών κατηγοριών, όπως στελέχη και είδη (Bayer *et al.*, 1996). Συνήθως, η μελέτη συντηρημένων τμημάτων DNA στην συστηματική βακτηρίων είναι ικανοποιητική για την κατάταξη των προκαρυωτικών αυτών μικροοργανισμών σε επίπεδο είδους, ενώ η εύρεση συντηρημένων τμημάτων DNA μυκήτων συντελεί στον χαρακτηρισμό ανώτερων ταξινομικών κατηγοριών, κυρίως σε επίπεδο γένους. Τα γονίδια αυτά παρουσιάζουν μικρή εξέλιξη από είδος σε είδος (Hills και Dixon, 1991). Μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν μεγάλη φυλογενετική ομοιότητα χαρακτηρίζονται από μικρές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία βάσεων των γονιδίων rDNA. Εκτός των γονιδίων rDNA, γονίδια που εμπλέκονται στην σύνθεση συγκεκριμένων ενζύμων, είναι επίσης συντηρημένα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φυλογενετικές μελέτες.

1.7. Το βασίλειο *Bacteria*.

Το βασίλειο *Bacteria* αποτελείται από 13 διακριτές φυλογενετικές ομάδες, βάσει της εύρεσης της αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου 16S rDNA και περιλαμβάνει τα θερμογόνα βακτήρια (*Thermotoga*), τα γένη *Deinococcus* και *Thermus*, τις σπειροχαίτες (*Spirochaetes*),

τα πράσινα θειοβακτήρια (green-sulphur bacteria), τα κυτοφάγα (*Cytophaga*) και τα φλαβοβακτήρια (*Flavobacteria*), τα μέλη της *Planctomyces*, τα χλαμύδια, τα *Mollicutes*, τα χαμηλού ποσοστού Gram θετικά βακτήρια (*Firmicutes*), ακτινομύκητες, κυανοβακτήρια, τα μέλη της κλάσεως *Proteobacteria* (συμπεριλαμβανομένων των υποκατηγοριών αυτής) και πράσινα βακτήρια-green non-sulphur bacteria (μη θειούχα-μη κυανοβακτήρια) (Longan, 1994: NCBI database). Τα βακτήρια είναι ευρέως διαδεδομένα και βρίσκονται σε ποικίλα περιβάλλοντα και στις πέντε ηπείρους, όπως σε κλινικά δείγματα, σε φυτά, σε ζώα, σε κομπόστ, σε αστικά λύματα, στο έδαφος, στους υδροφόρους οριζόντες, στην θάλασσα κ.α. (Longan, 1994: Ntougias, 1999).

1.8. Το βασίλειο *Archaea*.

Τα *Archaea* είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ανακαλύφθηκαν το 1978 (Woese *et al.*, 1978) και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα βακτήρια, τόσο γενετικές όσο και φυσιολογικές, π.χ. η ύπαρξη αιθερικών δεσμών και ομάδων ισοπρενίων στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών των αρχαιοβακτηρίων. Τα άρχαια ζουν σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και αλατότητας, καθώς και σε υψηλές συγκεντρώσεις ορισμένων ουσιών, όπου και προκαλούν μεθανογένεση. Τα άρχαια διακρίνονται σε δυο υποβασίλεια, το υποβασίλειο *Crenarcheota* που περιλαμβάνει υπερθεμόφιλα και θερμοοξεόφιλα αρχαιοβακτήρια, και το υποβασίλειο *Euryarchaeota* που περιλαμβάνει αλόφιλους και αλοβασεόφιλους μικροοργανισμούς, καθώς και αρχαιοβακτήρια που προκαλούν μεθανογένεση (Winker και Woese, 1995). Κατά την ανακάλυψη των αρχαιοβακτηρίων, υπήρχε η θεώρηση ότι πρόκειται για την ύπαρξη αρχέγονης ζωής, εντούτοις με την βοήθεια μοριακών μεθόδων και την κατασκευή του «δέντρου της ζωής-tree of life» αποδείχθηκε ότι τα άρχαια εξελικτικά τοποθετούνται μεταξύ των βακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών (Woese και Wolfe, 1985). Σύνηθες περιβάλλον των αρχαιοβακτηρίων είναι αλκαλικές-αλμυρές λίμνες και πηγές, θερμές πηγές και πίδακες, καθώς και ηφαιστιογενείς περιοχές και ηφαίστεια. Τέτοια μέρη συναντώνται σε χώρες όπως είναι η Κένυα, η Αίγυπτος, η Ιορδανία, η Κίνα, το Ισραήλ (Νεκρά θάλασσα), καθώς και ηφαιστιογενείς περιοχές της Καραϊβικής.

1.9. Το Βασίλειο των μυκήτων (Fungi).

Μέχρι πρόσφατα, οι μύκητες είχαν κατηγοριοποιηθεί, βάσει της ανάπτυξης και της μορφολογίας του μυκηλίου τους. Παρόλα αυτά, η αποκλειστική μελέτη της μυκηλιακής ανάπτυξης καθιστούσε ανεπαρκή την συστηματική κατάταξη μιας τόσο διαφοροποιημένης ομάδας μικροοργανισμών. Το 1988, η λεγόμενη κατώτεροι μύκητες (lower fungi) διαχωρίστηκαν και κατατάχτηκαν μεταξύ των Βασιλείων Protozoa και Chromista. Τα μέλη του φύλου Mycomycota (π.χ. τα γένη *Muscilago* και *Physarium*) και του φύλου Plasmodiophoromycota (π.χ. το γένος *Plasmodiophora*) κατατάχτηκαν στο Βασίλειο των πρωτόζωων. Τα μέλη της τάξεως Oomycetes ενώθηκαν με τα μέλη του Βασιλείου Chromista που περιλαμβάνει μικροοργανισμούς όπως καφέ άλγη (brown alge) και διάτομα. Το Βασίλειο των Fungi περιλάμβανε τους υπόλοιπους γνωστούς ως τότε μύκητες, οι οποίοι έχουν πρόσφατα καταταχτεί σε 5 ξεχωριστά φύλα, τα φύλα Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia και Zygomycota (Palm, 2001; Prillinger *et al.*, 2002; NCBI database). Η ως τώρα συστηματική κατάταξη των μυκήτων προβάλλει ρευστή, με αποτέλεσμα πιθανή μελλοντική αλλαγή διάφορων ομάδων μικροοργανισμών μεταξύ των κυρίων κατηγοριών μυκήτων.

1.10. Συστηματική κατάταξη ζυμών.

Οι ζύμες ορίζονται ως μονοκύτταροι μύκητες των φύλων Ascomycota και Basidiomycota, ενώ κάτω από προϋποθέσεις έχουν βρεθεί στελέχη ζυμομυκήτων που παρουσιάζουν μονοκυτταρικές δομές (ορισμένα στελέχη του γένους *Mucor* είναι δίμορφα και μπορούν να εμφανιστούν με την μορφή ζύμης, εξαρτώμενα από το λόγο O₂/CO₂). Ο αριθμός των γνωστών ζυμών πιθανολογείται ότι αντιστοιχεί στο 1% των ειδών που βρίσκονται στην φύση (Cambell και Duffus, 1988: Broach *et al.*, 1991).

Οι ζύμες πολλαπλασιάζονται συνήθως είτε με εκβλάστηση (budding) όπως στην περίπτωση του γένους *Saccharomyces* ή με διάσπαση (fission) όπως στην περίπτωση στελεχών του γένους *Schizosaccharomyces*, ενώ κάτω από προϋποθέσεις μπορούν να αναπτυχθούν με την μορφή μυκηλίου. Κατά την εγγενή αναπαραγωγή, οι περισσότερες ζύμες σχηματίζουν ασκούς οι οποίοι περιέχουν έως οκτώ απλοειδή ασκοσπόρια (Cambell και Duffus, 1988: Broach *et al.*, 1991: Hall και Linder, 1993).

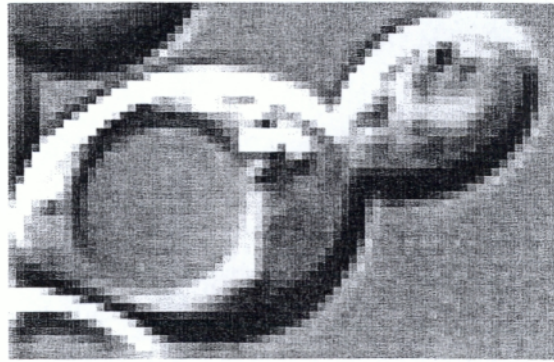
Η μελέτη των ζυμών παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον τόσο στις ζυμώσεις όσο και στις αγροτικές καλλιέργειες. Σημαντικό ρόλο παίζει η ταυτοποίηση και μελέτη ζυμών στην

κλινική μικροβιολογία, αφού ορισμένα στελέχη ζυμών είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση διαφόρων παθήσεων στον άνθρωπο ή στα ζώα. Οι πιο γνωστές με εμπορική σημασία ζύμες είναι τα είδη του γένους *Saccharomyces* και ιδιαίτερα στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Οι ζύμες αυτές χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παραγωγή οινοπνεύματος και οινοπνευματωδών ποτών, π.χ. στην παραγωγή ζύθου, στην αρτοποιία ως διογκωτικοί παράγοντες, και σε εξειδικευμένες περιπτώσεις ζυμώσεων. Οι ζύμες συχνά χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα βιταμινών και διατροφής διότι το 50% της βιομάζας τους αποτελείται από πρωτεΐνες, και περιέχουν αυξημένες ποσότητες βιταμινών, κυρίως βιταμίνες του συμπλέγματος Β, νιασίνη και φολικό οξύ (Campbell και Duffus, 1988: Broach *et al.*, 1991).

Οι ζύμες απαντώνται σε ποικίλα μέρη, όπως στα φύλλα και τα λουλούδια των φυτών, στο χώμα και σε αλμυρά νερά. Οι ζύμες ζουν επίσης στο δέρμα και στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων όπου συμβιώνουν ή παρασιτούν. Μία συνήθη προσβολή από ζύμη προκαλείται από τον ζυμόμορφο μύκητα (yeast-like fungus) *Candida albicans*, η οποία ονομάζεται «καντιτίαση» (candidiasis). Έτσι στελέχη του γένους *Candida* είναι υπεύθυνα για γυναικολογικές επιμολύνσεις, καθώς επίσης για μολύνσεις του στόματος και του λαιμού (Campbell και Duffus, 1988: Broach *et al.*, 1991).

1.10.1. Ζύμες εκβλάστησης (budding yeasts).

Οι ζύμες της τάξεως Saccharomycetales είναι οι λεγόμενες ζύμες εκβλάστησης (budding yeasts). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μέλη των οικογενειών Ascoideaceae, Cephaloascaceae, Dipodascaceae (η οποία περιλαμβάνει γένη όπως τα *Dipodascus*, *Galactomyces* και *Yarrowia*), Endomycetaceae, Lipomycetaceae, Metschnikowiaceae, Phaffomycetaceae, Saccharomycetaceae (η οποία περιλαμβάνει γένη όπως τα *Kluyveromyces*, *Pichia* και *Saccharomyces*), Saccharomycodaceae, Saccharomycopsidaceae, καθώς και η κατηγορία των μιτοσπορικών μελών της τάξεως Saccharomycetales (mitosporic Saccharomycetales) η οποία περιλαμβάνει και το γένος *Candida* (Campbell και Duffus, 1988: NCBI database).

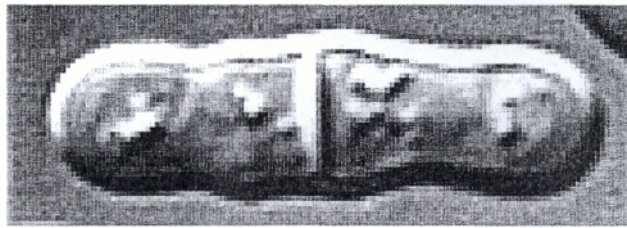


Εικόνα 1.3. Εκβλάστηση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των ζυμών της κατηγορίας αυτής είναι η ικανότητα τους να μεταβολίζουν σάκχαρα, παράγοντας αιθανόλη. Οι ζύμες της τάξης *Saccharomycetales* (budding yeasts) είναι οι γνωστές σε όλους μας, ζύμες, για αυτό και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως αληθινές ζύμες (true yeasts) (Campell και Duffus, 1988: Broach *et al.*, 1991).

1.10.2. Ζύμες διάσπασης-διαχωρισμού (fission yeasts).

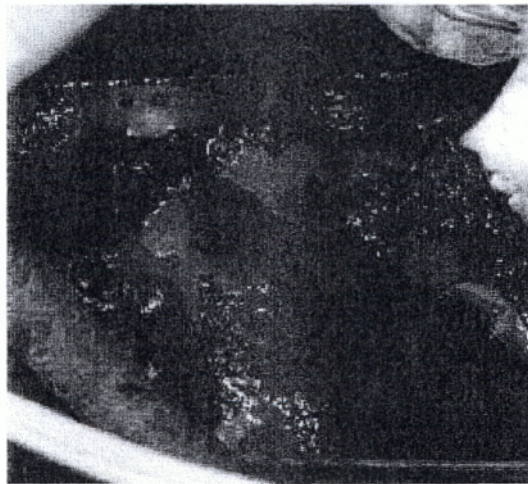
Στην κατηγορία των ζυμών που πολλαπλασιάζονται με διάσπαση-διαχωρισμό (fission yeasts) ανήκουν τα μέλη της οικογένειας *Schizosaccharomycetaceae*, τάξη *Schizosaccharomycetes*, και ιδιαίτερα το είδος *Schizosaccharomyces pombe* (Campell και Duffus, 1988: Hall και Linder, 1993). Το είδος *Schizosaccharomyces pombe* αποτελεί μοντέλο μικροοργανισμού στην μοριακή βιολογία και στην βιολογία του κυττάρου. Είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός που σχηματίζει ραβδοειδή κύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός του πραγματοποιείται με κυτταρική διάσπαση σχηματίζοντας δυο κύτταρα – απογόνους ίσου μεγέθους. Η πρώτη ζύμη της κατηγορίας αυτής (fission yeast) απομονώθηκε το 1893 από τον Linder από μύρα παραχθήσα στην ανατολική Αφρική. Η λέξη *pombe* σημαίνει στα Σουαχίλη ζύθος. Για την μελέτη της κυτταρικής διάσπασης στελεχών του είδους *Schizosaccharomyces pombe*, ο Paul Nurse και οι συνεργάτες του κέρδισαν το βραβείο Nobel στη φυσιολογία για το έτος 2001.



Εικόνα 1.4. Διάσπαση-διαχωρισμός κυττάρου του είδους *Schizosaccharomyces pombe*.

1.10.3. Μαύρες ζύμες (black yeast).

Είναι μέλη κυρίως της τάξεως Chaetothyriales (Ascomycota), που περιλαμβάνει τα γένη *Ceratomyrium* (Chaetothyricaceae), *Berlesiella*, *Capronia*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Melanchlenus*, *Phacococcomyces*, *Ramichloridium*, *Rhinocladicilla* (Herpotrichiellaceae), *Phacoannecllomyces*, *Phaeococcus*, *Sarcinomyces*, *Taeniolella*, *Xylohypha* (mitosporic Chaetothyriales), *Cyphellophora* και *Glyphium* (Chaetothyriales incertae sedis) (Untereiner *et al.*, 1995: NCBI database). Στις μαύρες ζύμες ανήκει και το γένος *Aureobasidium* (Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis) (de Hoog και Yurlowa, 1994).



Εικόνα 1.5. Ανάπτυξη μαύρης ζύμης.

Οι μαύρες ζύμες αναπτύσσονται αργά και οφείλουν το όνομα τους στο έντονο μαύρο χρώμα τους. Συναντώνται σε διάφορα περιβάλλοντα αλλά κυρίως παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον. Προκαλούν μυκητιάσεις (μολύνσεις ανθρώπων και ζώων από μύκητες, κυρίως

δερματοπάθειες ή σηψαιμίες) όπως χρωμοβλαστομυκητιάσεις και εγκεφαλοπάθειες (de Hoog *et al.*, 1995).

1.10.4. Ζύμες του φύλλου Basidiomycota (basidiomycetous yeasts).

Οι ζύμες του φύλλου Basidiomycota ανήκουν στις τάξεις Ustilaginomycetes, Urediniomycetes και Hymenomycetes (Fell *et al.*, 2000; Hamamoto *et al.*, 2002). Η διάκριση των μελών, αυτής της κατηγορίας ζυμών, βασίστηκε στην μελέτη της μορφολογίας, την σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και σε ανάλυση του γονιδίου rDNA. Από την μελέτη του γονιδίου rDNA, τα στελέχη ζυμών της κλάσεως Urediniomycetes κατανέμονται στα γένη *Microbotryum*, *Sporidiobolus*, *Agaricostibum* και *Erythrobasidium*, ενώ τα στελέχη ζυμών της κλάσεως Hymenomycetes κατανέμονται σε γένη των τάξεων Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales και Cystofilobasidiales. Στην περίπτωση της κλάσεως Ustilaginomycetes, τα στελέχη ζυμών κατατάσσονται σε γένη των τάξεων Ustilaginales, Microstromatales και Malasseziales.

1.11. Το γένος *Pichia* (Hansen, 1904).

Το γένος *Pichia* ανήκει στο Βασίλειο Fungi, φύλο Ascomycota, κλάση Hemiascomycetes, τάξη Saccharomycetales, οικογένεια Endomycetaceae. Το γένος *Pichia* ανήκει στις ζύμες, και μέλη αυτού, όπως το είδος *Pichia ohmeri*, συχνά χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων για την παρασκευή προϊόντων ζυμώσεων που περιέχουν πίκλες και φρούτα. Στην κλινική μικροβιολογία μερικά είδη *Pichia* χαρακτηρίζονται ως πιθανά παθογόνα (Bergman *et al.*, 1998). Το γένος *Pichia* αποτελείται από πολλά είδη με πιο γνωστά τα *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, *P. norvegensis* και *P. ohmeri*. Τα στελέχη του γένους *Pichia* μακροσκοπικά ομοιάζουν με αυτά του γένους *Candida*. Το γένος *Pichia* διαφοροποιείται από το γένος *Candida* στο γεγονός ότι κάτω από προϋποθέσεις παράγει ασκοσπόρια (Alexopoulos και Mims, 1979).

1.12. Το γένος *Rhodotorula* (Harrison, 1927).

Το γένος *Rhodotorula* ανήκει στο Βασίλειο Fungi, φύλο Basidiomycota, κλάση Urediniomycetes. Το γένος αυτό είναι παραφυλετικό και συμπεριλαμβάνεται στις ζύμες. Απαντάται σε περιβαλλοντικά, π.χ. στον αέρα, στο χώμα, σε λίμνες και σε ωκεανούς, (Lopez-

Archilla *et al.*, 2004) και κλινικά (Khiehn *et al.*, 1992) δείγματα, καθώς και σε τρόφιμα, π.χ. σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Welthagen και Viljoen, 1999). Μπορεί να αποικίσει φυτά, ανθρώπινα μέρη, καθώς και άλλα θηλαστικά. Κάτω από προϋποθέσεις, ορισμένα στελέχη του γένους *Rhodotorula* δρουν ως παθογόνα του ανθρώπου. Στελέχη του γένους αυτού παρουσιάζουν γρήγορη ανάπτυξη και σχηματίζουν μαλακές αποικίες. Οι αποικίες αυτές είναι ή κρεμώδεις ή ροζ ή πορτοκαλί ή κίτρινες ή έχουν το χρώμα του κόκκινου κοραλλιού. Το γένος *Rhodotorula* περιλαμβάνει ένα μεγάλο πλήθος ειδών, όπως για παράδειγμα τα είδη *R. glutinis* και *R. rubra*. Όλα τα είδη του γένους *Rhodotorula* παράγουν ουρεάση και δεν ζυμώνουν υδατάνθρακες. Σχηματίζουν βλαστοκονίδια τα οποία είναι μοναδιαία, ενώ ψευδοϋφές δεν παρατηρούνται στα στελέχη του είδους αυτού. Τα μέλη του γένους *Rhodotorula* διαφοροποιούνται από αυτά του γένους *Cryptococcus* στο ότι δεν αφομοιώνουν ινοσιτόλη. Επίσης, το γένος αυτό διαφοροποιείται από το γένος *Candida* στο γεγονός ότι τα στελέχη του παράγουν ροζ ή κόκκινες αποικίες και δε σχηματίζουν ψευδοϋφές (Alexopoulos και Mims, 1979).

1.13. Το γένος *Filobasidium* (Olive, 1968).

Το γένος *Filobasidium* ανήκει στο Βασίλειο Fungi, φύλο Basidiomycota, κλάση Tremellomycetidae, τάξη Filobasidiales, οικογένεια Filobasidiaceae (Olive, 1968). Το γένος αυτό συμπεριλαμβάνεται στις ζύμες και απαντάται σε φυτικά υπολείμματα, τρόφιμα και κλινικά δείγματα (Nassereddin και Yaman, 2005; Hall *et al.*, 2003). Στο γένος *Filobasidium* ανήκουν τα είδη *Filobasidium capsuligenum* (Fell *et al.*, 1972), *F. elegans* (Fell *et al.*, 2000), *F. foriforne* (Olive, 1968), *F. globisporum* (Fell *et al.*, 2000) και *F. uniguttulatum* (Kwon-Chung, 1977).

1.14. Το γένος *Acetobacter* (Beijerinck, 1898).

Το γένος *Acetobacter* ανήκει στο Βασίλειο Bacteria, φύλο Proteobacteria, κλάση α-Proteobacteria, τάξη Rhodospirillales, οικογένεια Acetobacteraceae (De Ley και Frateur, 1974). Τα είδη του γένους *Acetobacter* είναι τα ακόλουθα: *Acetobacter cerevisiae* (Cleenwerck *et al.*, 2002), *A. cibinongensis* (Lisdiyanti *et al.*, 2001), *A. estunensis* (Lisdiyanti *et al.*, 2000), *A. indonesiensis* (Lisdiyanti *et al.*, 2000), *A. lovaniensis* (Lisdiyanti *et al.*, 2000), *A. malorum* (Cleenwerck *et al.*, 2002), *A. orientalis* (Lisdiyanti *et al.*, 2001), *A. orleanensis* (Lisdiyanti *et al.*, 2000), *A. pasteurianus* (Buchanan και Gibbons, 1974), *A. peroxydans*

(Buchanan και Gibbons, 1974), *A. pomorum* (Sokollek *et al.*, 1998), *A. aceti* (De Ley και Frateur, 1974), *A. syzygii* (Lisdiyanti *et al.*, 2001) και *A. tropicalis* (Lisdiyanti *et al.*, 2000). Στελέχη του γένους *Acetobacter* έχουν απομονωθεί από λουλούδια, φρούτα και επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και από την παραγωγή όξους και από άλλες ζυμωτικές διεργασίες. Όλα τα μέλη του γένους *Acetobacter* παράγουν οξικό οξύ από την οξείδωση της αιθανόλης (οξικά βακτήρια).

Τα στελέχη του γένους *Acetobacter* είναι αρνητικά κατά Gram, αυστηρώς αερόβια, με το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Είναι χημειοετερότροφα, οξειδάση αρνητικά, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25 με 30°C και βέλτιστο pH μεταξύ 5 με 6. Δεν υδρολύουν τη ζελατίνη, δεν ανάγουν τα νιτρικά προς νιτρώδη, και δεν σχηματίζουν ινδόλη. Το άθροισμα του ποσοστού G+C στο DNA κυμαίνεται μεταξύ 51 έως 65% (Buchanan και Gibbons, 1974).

1.15. Βασικές αρχές βιοπληροφορικής.

Μεγάλη ώθηση στην επιστήμη της βιολογίας και της ιατρικής δόθηκε από την ανάπτυξη της επιστήμης των ηλεκτρονικών υπολογιστών και του προγραμματισμού. Ο κλάδος της βιολογίας που ασχολείται τόσο με την μαθηματική ανάλυση και στατιστική όσο και με την οργάνωση βάσεων πληροφορικής, μορφοποίηση και διάθεση βιολογικών δεδομένων-πειραματικών αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονική μορφή ονομάζεται βιοπληροφορική. Η βιοπληροφορική μας επιτρέπει τόσο την σύγκριση-φυλογενετική ανάλυση μικροοργανισμών και οργανισμών στην μικροβιακή-πληθυσμιακή οικολογία και στην συστηματική κατάταξη μικροοργανισμών και οργανισμών όσο και στην μελέτη του χρωματοσώματος και στην έκφραση περιοχών αυτού π.χ. μελέτη των πρωτογενών και δευτερογενών μορίων, της έκφρασης γονιδίων και κατασκευής φυλογενετικών δένδρων (Logan, 1994).

Στην φυλογενετική ανάλυση στελεχών μικροοργανισμών κατασκευάζεται αρχικά ένας πίνακας (data matrix) στον οποίο παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά (είτε φυσιολογικά είτε γενετικά) του κάθε μικροοργανισμού με σκοπό την πραγμάτωση αριθμητικής και φυλογενετικής ανάλυσης αντιστοίχως. Στην συνέχεια με την βοήθεια στατιστικών μοντέλων και φυλογενετικών θεωριών υπολογίζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή η διαφοροποίηση ή το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ειδών, όπου ο βαθμός εξέλιξης-διαφοροποίησης προσδιορίζεται με διάφορους αλγόριθμους που λαμβάνουν υπόψη υποκαταστάσεις, διαγραφές ή προσθήκες νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, ο βαθμός

διαφοροποίησης μεταξύ των ειδών απεικονίζεται με την βοήθεια σχεδιαστικού προγράμματος ως δένδρογράμματα ή παρουσιάζονται οι διαφοροποιήσεις αυτών σε πίνακα.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο δύο παραμέτρων του Kimura (1980) που λαμβάνει υπόψη ξεχωριστά γενετικές μεταλλάξεις και κενά (gaps) και περιγράφεται μαθηματικά από τον ακόλουθο αλγόριθμο:

$$d_{AB} = -0.5 \ln[(1-2P-Q) \text{SORT}(1-2Q)]$$

όπου SORT είναι η τετραγωνική ρίζα, P το κλάσμα των βάσεων νουκλεοτιδίων που έχουν υποστεί γενετική μεταλλαγή και Q το ποσοστό των κενών που προκύπτουν από την σύγκριση-ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών βάσεων, και d_{AB} η φυλογενετική απόσταση.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος των Jukes και Cantor (1969), που είναι ένα από τα πρώτα μοντέλα για την εκτίμηση φυλογενετικών αποστάσεων. Το μοντέλο αυτό βασίζεται στην υπόθεση ότι όλες οι αντικαταστάσεις βάσεων είναι ανεξάρτητες και ισοδύναμες, και ότι συμβαίνουν τυχαία και για τα τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων, χωρίς να πραγματοποιείται εισαγωγή ή διαγραφή αυτών.

Βάσει των παραπάνω παραδοχών, η φυλογενετική απόσταση μεταξύ δυο αλληλουχιών βάσεων A και B δίδεται από την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$d_{AB} = -3/4 \ln [1-(4/3)f_{AB}]$$

όπου το f_{AB} εκφράζει τον αριθμό των διαφορετικών βάσεων μεταξύ των δυο αλληλουχιών A και B, και d_{AB} είναι η φυλογενετική απόσταση που προκύπτει από την σύγκριση των αλληλουχιών βάσεων A και B.

Η μέθοδος Jukes και Cantor καλείται και ως μοντέλο μιας παραμέτρου, και είναι η απλούστερη, και ίσως η πιο χρησιμοποιημένη, μέθοδο για τον υπολογισμό φυλογενετικών αποστάσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα.

Εννέα μικροβιακά στελέχη, που απομονώθηκαν στο Ινστιτούτο Ελαιάς και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας από δύο δείγματα υγρών και ενός δείγματος στερεού απόβλητων ελαιοτριβείων, μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Εκ των εννέα απομονώσεων, ένα στέλεχος άνηκε στο βασιλείο των βακτηρίων, ενώ τα υπόλοιπα άνηκαν στο βασιλείο των μυκήτων. Η ονομασία και το είδος των μικροοργανισμών αυτών, καθώς και το όνομα, η προέλευση, το είδος και η ημερομηνία παραλαβής των δειγμάτων, εκ των οποίων απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί αυτοί, δίδονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Γενικά χαρακτηριστικά απομονώσεων μικροοργανισμών.

Στέλεχος	Μικροοργανισμός	Δείγμα	Είδος Δείγματος	Προέλευση Δείγματος	Ημερομηνία Παραλαβής
FWW-9	Ζύμη	FWW	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/2/2004
FWW-12A	Βακτήριο	FWW	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/2/2004
GAR-12B	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
GOLD-13	Ζύμη	GOLD	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	1/11/2004
GAR-15	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
GAR-17	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
GAR-20	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
GAR-21	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
GAR-22	Ζύμη	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα.

2.2.1. Θρεπτικά υποστρώματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).

Υλικά και Όργανα

- ΥΑΕ
- Απιονισμένο νερό
- CaO
- Άγαρ

- Τουλουπάνι
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Κωνικές φιάλες των 250 ml
- Ποτήρι ζέσεως των 100 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml
- Πιπέτα Pasteur
- Πεχάμετρο
- Αυτόκαυστο

Πειραματική Πορεία

Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, των οποίων το pH αρχικά ρυθμίστηκε στην τιμή 6 με διάλυμα CaO, διηθήθηκαν, και το αιώρημα αποτέλεσε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα συγκεντρώσεως 100% v/v. Θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεων 10% ή 25% v/v παρασκευάστηκαν κατόπιν κατάλληλης αραιώσης. Προσθήκη 1.7% w/v άγαρ πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων. Η αποστείρωση των θρεπτικών υποστρωμάτων επιτεύχθηκε στον αυτόκαυστο υπό πίεση 2.1 Atm για 20 min.

Όλα τα υγρά απόβλητα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη διατηρούνταν, προ αναλύσεως, στους 3°C, ενώ κατά την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων, κατάλληλη ποσότητα ΥΑΕ αφήνονταν να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Στερεά θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 25% v/v σε ΥΑΕ χρησιμοποιούνταν για τη διατήρηση των μικροβιακών στελεχών, ενώ θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 10% v/v σε ΥΑΕ χρησιμοποιούνταν στην εξαγωγή γονιδιακού DNA από στελέχη που αδυνατούσαν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα.

2.2.2. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA).

Υλικά και Όργανα

- Potato Dextrose Broth (Scharlau)
- Απιονισμένο νερό
- Άγαρ
- Υδρόφιλο βαμβάκι

- Κωνικές φιάλες των 500 και 1000 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 και 500 ml
- Ζυγός ακριβείας
- Αυτόκαυστο

Πειραματική Πορεία

Η παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 2.4 g Potato Dextrose Broth (Scharlau) σε 100 ml απιονισμένου ύδατος (2.4% w/v). Με προσθήκη 1.7% w/v άγαρ, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar (PDA). Η αποστείρωση των θρεπτικών αυτών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε στον αυτόκαυστο για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm.

2.3. Διατήρηση απομονώσεων βακτηρίων και ζυμών.

Η ανακαλλιέργεια των μικροβιακών απομονώσεων πραγματοποιούνταν σε μηνιαία βάση με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών, αφού τόσο το στέλεχος βακτηρίου όσο και τα στελέχη ζυμών ανήκουν στους μονοκύτταρους μικροοργανισμούς.

Διατήρηση των μικροβιακών απομονώσεων σε αποστειρωμένους βιδωτούς σωλήνες που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα συγκεντρώσεως 25% v/v σε ΥΑΕ, πραγματοποιούνταν κάθε τρίμηνο.

2.4. Εξαγωγή χρωμοσωμικού DNA μικροοργανισμών.

Όργανα

- Μικρές σπάτουλες
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακροϋγχια μικροπιπετών (tips)
- Δυο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65°C και 37°C αντίστοιχα
- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Φυγόκεντρος (Biofuge 28RS, Hiraeus instruments)

- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA: pH 8)
- 10% (w/v) SDS
- προνάση (20 mg ml⁻¹)
- 5 M NaCl
- CTAB/NaCl
- Φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v/v), (LIFE TECHNOLOGIES)
- 3 M Οξικό νάτριο (CH₃COONa), pH 4.8
- Ισοπροπανόλη [CH₃CH(OH)CH₃]
- 70% (v/v) αιθανόλη (CH₃CH₂OH)
- RNάση (10 μM)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃)
- 100% (v/v) αιθανόλη (CH₃CH₂OH)

Πειραματική πορεία

Εξαιτίας της αδυναμίας πολλών εκ των απομονωμένων μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε εμπειρικό υπόστρωμα, βιομάζα των προς ανάλυση μικροβιακών στελεχών μεταφέρθηκε από το τρυβλίο σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (eppendorfs) με την βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας. Σε κάθε μικροσωλήνα προστέθηκαν 567 μl TE (pH 8), 30 μl 10% w/v SDS και 3 μl προνάσης (20 mg ml⁻¹). Ακολούθησε επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h. αποσκοπώντας στην λύση των κυττάρων. Με το πέρας της μίας ώρας, προστέθηκαν 100 μl 5 M NaCl και 80 μl CTAB/NaCl, για να επιτευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών και η απομάκρυνση διαφόρων πολυσακχαριτών. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε επώαση του δείγματος στους 65°C για 20 min και ακολούθησε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v), ανακινώντας το δείγμα ισχυρά, αποσκοπώντας στην απενεργοποίηση των ενζύμων και τον καθαρισμό της υδατικής φάσης από τις πρωτεΐνες. Το δείγμα

φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε καθαρούς μικροσωλήνες φυγοκέντρισης. Η άνω πορεία εκχύλισης επαναλήφθηκε, απομακρύνοντας τυχόν πρωτεΐνες και υπολείμματα φαινόλης. Μετά την εκ νέου ανάκτηση της υδατικής φάσης, το DNA κατακρημνίστηκε με την προσθήκη 0.6 όγκων (vol) παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20°C για 30 min, φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 20 min, η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.4 ml αιθανόλης (70%, v/v). Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και το DNA αναδιαλύθηκε σε 0.2 ml ύδατος.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 10 μl RNάση (10 μM), τα οποία μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min. Τα δείγματα εκχειλίστηκαν με ίση ποσότητα φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v) απενεργοποιώντας και απομακρύνοντας την RNάση. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 10 min, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε καινούργιους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (eppendorfs), το οποίο και εκχειλίστηκε με ίση ποσότητα χλωροφορμίου, απομακρύνοντας τυχόν υπολείμματα φαινόλης. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 10 min, συλλέγοντας το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το DNA κατακρημνίστηκε στους -20°C για μία μέρα, με προσθήκη 3 όγκων (vol) παγωμένης αιθανόλης 100% (v/v) και 0.1 όγκων 3 M CH_3COONa . Το δείγμα αυτό φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.5 ml 70% (v/v) αιθανόλης, η οποία, μετά από φυγοκέντριση υπό τις ίδιες συνθήκες, απομακρύνθηκε. Τελικά, το DNA αναδιαλύθηκε σε 50 μl TE και αποθηκεύτηκε στους -20°C .

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Όργανα – Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5 ml (eppendorfs)
- Αυτόματες μικροπιπέτες
- Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0.2 ml (PCR tube)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Στατό
- Μηχανή PCR (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H_2O

- 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer) (δημιουργεί άριστες συνθήκες για τη δράση του ένζυμου πολυμεράση)
- 50 mM MgCl₂ (δρα ως καταλύτης της ενζυμικής αντίδρασης πολυμερισμού)
- 40 mM διαλύματος δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 10 mM έκαστο δεοξυνουκλεοτίδιο (40 mM dNTPs: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)
- Εκκινητές:
50 μM A-for (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3')
- 50 μM C-rev (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')
- DyNazyme EXT DNA πολυμεράση, 1 U/μl, Finnzyme OY, Finland

Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA του στελέχους βακτηρίου.

Για την πραγμάτωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης στην περίπτωση του στελέχους βακτηρίου, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

- 39 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- 5 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer)
- 2 μl MgCl₂ (50 mM)
- 1 μl διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)
- 0.5 μl εκκινητή A-for (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3')
- 0.5 μl εκκινητή C-rev (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')
- 1 μl ενζύμου πολυμεράσης
- 1 μl DNA (≈ 50 ng)

Προς διευκόλυνση, πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλύματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Master-mix, 6 δειγμάτων), χρησιμοποιώντας εξαπλάσιες ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων εκτός του DNA των δειγμάτων που προστέθηκε σε κάθε σωλήνα αντιδράσεως πολυμερισμού (0.2 ml PCR tube) ξεχωριστά. Σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε παρασκευή 'τυφλού δείγματος-μαρτύρα' που περιείχε την ίδια σύσταση με τα προς ανάλυση δείγματα, εκτός της προσθήκης του DNA.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα πολυμερισμού (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK). Οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες:

1. Στάδιο: 2 min στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
2. Στάδιο: 35 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:
 - 30 sec στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
 - 30 sec στους 55°C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών)
 - 1 min και 15 sec στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)
3. Στάδιο: 10 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

Με το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

Ενίσχυση τμήματος DNA που περιλαμβάνει την περιοχή ITS1, το γονίδιο 5.8S rDNA, την περιοχή ITS2, καθώς και μικρά τμήματα της μεγάλης και της μικρής υποομάδας του γονιδίου rDNA.

Για την πραγμάτωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης στην περίπτωση των στελεχών ζυμών, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

- 38 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- 5 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer)
- 3 μl MgCl₂ (50 mM)
- 1 μl διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)
- 0.5 μl εκκινητή ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')
- 0.5 μl εκκινητή ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3')
- 1 μl ενζύμου πολυμεράσης
- 1 μl DNA (≈ 50 ng)

Στην περίπτωση των στελεχών GAR-21 και GAR-22, ο εκκινητής ITS-4 αντικαταστάθηκε από τον εκκινητή pITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3').

Πραγματοποιήθηκε επίσης παρασκευή διαλύματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Master-mix, 6 δειγμάτων), ενώ προσθήκη 'τυφλού δείγματος-μαρτύρα' πραγματοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα πολυμερισμού (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK). Οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες:

1. Στάδιο: 4 min στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
2. Στάδιο: 35 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:
 - 30 sec στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
 - 30 sec στους 53°C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινήτων)
 - 1 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)
3. Στάδιο: 10 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

Με το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες των 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακροϋγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5ml (Eppendorfs)
- QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Γερμανία)
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O

Πειραματική πορεία

Αρχικά, το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης καθαρίστηκε με τη βοήθεια του QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Γερμανία). Το προϊόν PCR αναμείχθηκε με πενταπλάσιο όγκο διαλύματος PB (Qiagen), προστέθηκε σε μικροκολώνα των 2 ml (Qiagen) και φυγοκεντρήθηκε στις 13 000 rpm για 1 min. Μετά την απομάκρυνση του υγρού από την μικροκολώνα, προστέθηκαν στο πάνω μέρος αυτής 0.75 ml διαλύματος

PE (Qiagen) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 1 min. Μετά την εκ νέου απομάκρυνση του υγρού, η φυγοκέντριση επαναλήφθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, προστέθηκαν 30 μl υπερκάθαρου αποστειρωμένου ύδατος στο πάνω μέρος της κολώνας, αφέθηκαν για 5 min, και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση βάσει των παραπάνω συνθηκών. Τα 30 μl ύδατος, τα οποία και επαναδιάλυαν το DNA, ανακτήθηκαν για να αναλυθούν περαιτέρω.

2.7. Εισαγωγή DNA (προϊόν PCR) σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation).

Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες των 2 και 10 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0.2 ml (PCR tube)
- Σύστημα (kit) pGEM-T Easy (Promega, WI, USA)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O

Πειραματική πορεία

Για κάθε στέλεχος βακτηρίου και ζύμης πραγματοποιήθηκε προσθήκη του γονιδίου 16S rDNA και του τμήματος DNA, ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 (περιοχή ITS-1, συντηρημένο γονίδιο 5.8S rDNA και περιοχή ITS-2) αντιστοίχως, στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega, WI, USA). Αναλυτικά, 5 μl 2x ρυθμιστικού διαλύματος αντιδράσεως της λιγάσης (Ligation buffer, Promega) αναμίχθηκαν με 3.7 μl καθαρισμένου προϊόντος PCR, 0.3 μl πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) και 1 μl λιγάσης (6 με 10 U-Promega, WI, USA). Η εισαγωγή του ένθετου DNA στο πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε με παραμονή του παραπάνω δείγματος στους 8°C για 12 h.

2.8. Γενετική μετασχηματισμός κυττάρων (transformation).

Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες των 10, 100 και 200 μl.

- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Πιπέτες Pasteur ή Γυάλινη ράβδος
- Δυο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 37°C και 42°C αντίστοιχα
- Επωαστικός θάλαμος στους 37°C
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Κωνικές φιάλες των 500 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml
- Ζυγός ακριβείας
- 'Ικανά κύτταρα- competent cells' *E. coli*, στέλεχος DH5a
- Αμπικιλίνη
- X-gal (2% w/v) και IPTG (100 mM)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- Άγαρ
- NaCl
- Πεπτόνη
- Εκχύλισμα Ζύμης

Πειραματική πορεία

Η εισαγωγή πλασμιδίου σε 'ικανά κύτταρα- competent cells' *E. coli* (στέλεχος DH5a), πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση 'ικανών κυττάρων' στο πάγο μέχρι την ρευστοποίηση αυτών, προσθήκη του πλασμιδίου στα 'ικανά' αυτά κύτταρα, τοποθέτηση του μίγματος αυτού στον πάγο για 30 min, και εισαγωγή του σε υδατόλουτρο στους 42°C για 1 min (heat shock). Ακολούθησε προσθήκη 0.2 ml LB (1% w/v πεπτόνη, 1% w/v NaCl και 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης) και επώαση των μεταμορφωμένων κυττάρων στους 37°C για 1 h. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε επιστροφή των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB (1% w/v πεπτόνη, 1% w/v NaCl, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης και 1.7% άγαρ) που περιείχε 100 μg/ml αμπικιλίνη, αφού είχε ήδη προηγηθεί προσθήκη 50 μl X-gal (2% w/v) και 10 μl IPTG (100 mM). Μετά από επώαση, τα γενετικώς μετασχηματισμένα κύτταρα σχημάτιζαν λευκές αποικίες.

2.9. Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA.

Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες των 10 και 200 μ l.
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Βρασμένο νερό
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)
- Υδατόλουτρο στους 37°C
- Διάλυμα λύσης [(50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 5% v/v Triton X 100, 8% w/v σακχαρόζη: pH 8)+2 μ l 0.5 mg/ml λυσοζύμης ανά δείγμα]
- 100% (v/v) αιθανόλη (CH₃CH₂OH)
- Φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v/v), (LIFE TECHNOLOGIES)
- 3 M Οξικό νάτριο (CH₃COONa), pH 4.8
- Ισοπροπανόλη [CH₃CH(OH)CH₃]
- 70% (v/v) αιθανόλη (CH₃CH₂OH)
- RNάση (10 μ M)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃)

Πειραματική πορεία

Γενετικώς μεταμορφωμένα κύτταρα *E. coli* (λευκές αποικίες) αναπτύσσονταν για 14 με 18 ώρες σε 10 ml LB. Ποσότητα κυττάρων μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα (eppendorfs), και το δείγμα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 1 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, προστέθηκαν 0.15 ml διαλύματος λύσης και ακολούθησε έντονη ανάδευση και θέρμανση του δείγματος μέχρι βρασμού για 45 sec. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης (eppendorfs), και προστέθηκαν 0.18 ml ισοπροπανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min, απομάκρυνση υπερκειμένου, και προσθήκη 0.4 ml 70% v/v αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση

εκ νέου (υπό τις ίδιες συνθήκες), η αιθανόλη απομακρύνθηκε και το δείγμα αφέθηκε να στεγνώσει και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 0.2 ml ύδατος.

Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε δείγμα 3 μl RNάση (10 μM), το οποίο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min. Το κάθε δείγμα εκχειλίστηκε με ίση ποσότητα φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v) απενεργοποιώντας και απομακρύνοντας την RNάση. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 10 min, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε κενούς μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (ependorfs), το οποίο και εκχειλίστηκε με ίση ποσότητα χλωροφορμίου, απομακρύνοντας τυχών υπολείμματα φαινόλης. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 10 min. συλλέγοντας το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το DNA κατακρημνίστηκε στους -20°C για μία μέρα, με προσθήκη 3 όγκων (vol) παγωμένης αιθανόλης 100% (v/v) και 0.1 όγκων 3 M CH₃COONa. Το δείγμα αυτό φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.5 ml 70% (v/v) αιθανόλης, η οποία μετά από φυγοκέντριση υπό τις ίδιες συνθήκες απομακρύνθηκε. Τελικά, το DNA αναδιαλύθηκε σε 50 μl ύδατος. Ποσότητα αυτού (10 μl) χρησιμοποιήθηκε για πέψη με την ενδονουκλεάση *EcoR* I, με σκοπό την επιβεβαίωση του μεγέθους του ένθετου DNA (εισαγωγή κατάλληλου προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα). Η υπόλοιπη ποσότητα στάλθηκε (μετά την επιβεβαίωση) στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ηράκλειο Κρήτης) με σκοπό την εύρεση της αλληλουχίας βάσεων των τμημάτων DNA.

2.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάση περιορισμού.

Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες των 2, 10 και 100 μl.
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Υδατόλουτρο στους 37°C
- Πλασμιδιακό DNA
- 10x ρυθμιστικού διαλύματος (10x Buffer *EcoR* I, IMBB, Ηράκλειο Κρήτης).
- Ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoR* I (10 U/μl)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O

Πειραματική πορεία

Τα προς πέψη δείγματα παρασκευάστηκαν με την προσθήκη των ακόλουθων ουσιών – ενζύμων.

- 10 μl πλασμιδιακού DNA
- 2.5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (10x Buffer *EcoR* I, IMBB, Ηράκλειο Κρήτης).
- 1.5μl *EcoR* I (10U/μl): $\frac{\text{GAATTC}}{\text{CTTAAG}}$
- 11 μl αποστειρωμένου ύδατος

Η πέψη των ενισχυμένων τμημάτων πραγματοποιήθηκε με την παραμονή του ανώτερου μίγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 h. Μετά το πέρας της πέψης, τα δείγματα (25 μl) αναμείχθηκαν με 5 μl διαλύματος φορτώσεως και ηλεκτροφορήθηκαν σε 1.5 % (w/v) πηκτή αγαρόζης με ταχύτητα 5 V/cm. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της πέψης χρωματίστηκαν παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 mg/l) και αποχρωματίστηκαν σε αραιό διάλυμα θεικού μαγνησίου (1 μM), και τέλος φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως.

2.11. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.

Υλικά και Όργανα

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: Ηλεκτροφορητικό δοχείο, υποδοχέας πηκτής αγαρόζης, χτένες δημιουργίας πηγαδιών, (HORIZON 58, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL και HORIZON 11.14, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL)
- Τροφοδοτικό: (Power PAC 300, BIO-RAD, USA)
- Συσκευή υπεριώδους φωτός: (Consort TFX-20M)
- Αυτόματες μικροπιπέτες: (GILSON, FRANCE)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ζυγό: KERN 572-35 (Kern & Sohn GmbH, Germany)
- Φούρνος μικροκυμάτων

- Σύστημα φωτογράφησης πηκτών αγαρόζης: (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA)
- Αγαρόζη, (Electrophoresis Grade Agarose, Life Technologies GIBCO BTL UK)
- 50x TAE pH 8: (242 g Tris-HCl, 57.1 ml π. CH₃COOH και 0.5 M EDTA)
- 1x TAE (20 ml 50x TAE σε 1 l απιονισμένο νερού)
- Διάλυμα φορτώσεως (loading dye), χρωστική: [144 g (20 M) γλυκίνη-0.25% (w/v) Bromophenol blue (μπλε της βρωμοφαινόλης-30.25 g/l (0.25 M) Tris-0.25% (w/v) cyanol-1% w/v SDS-40% (w/v) σακχαρόζη]
- Διάλυμα θεικού μαγνησίου 1 mM MgSO₄
- 5 mg/ml αρχικού διαλύματος, 0.5 mg/l τελική συγκέντρωση (CH₃CH₂Br)
- 4 μl δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (DNA ladder): [100bp DNA ladder (130 ng/μl αρχική συγκέντρωση, 110 ng/μl τελική συγκέντρωση παρουσία διαλύματος φορτώσεως), TaKaRa, SHUZO CO, LTD, Shiga, Japan]

Πειραματική πορεία

Επιλέγεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καθώς και ο υποδοχέας της πηκτής, χωρητικότητας 50 ml για την Horizon 58 και 120 ml για την Horizon 11.14. Το γονιδιακό DNA των μικροοργανισμών και τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτοφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, ενώ τα προϊόντα της πέψης των ενισχυμένων τμημάτων με την νουκλεάση περιορισμού *EcoR* I αναλύθηκαν σε 1.5% w/v πηκτή αγαρόζης.

Παρασκευάστηκε πηκτή 50 ml (1% w/v σε αγαρόζη) ή 120 ml (1.5 % w/v σε αγαρόζη). Το παρασκεύασμα τοποθετήθηκε στον φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει και να αποκτήσει θερμοκρασία περίπου ίση με 50°C.

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε ο υποδοχέας σε οριζόντια θέση (χωρίς κλίση), σφραγίστηκαν οι ανοιχτές πλευρές του και εφαρμόστηκε η ειδική χτένα στην κατάλληλη θέση. Το περιεχόμενο της κωνικής, εισήχθηκε στον υποδοχέα, απομακρύνοντας τυχόν φυσαλίδες. Η πηκτή αγαρόζης σταθεροποιήθηκε, η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώθηκε με διάλυμα TAE ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή και η χτένα απομακρύνθηκε.

Στην συνέχεια, προετοιμάστηκαν τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση με μίξη 8 μl ενισχυμένου τμήματος DNA και 5 μl διαλύματος φόρτωσης. Στα προϊόντα της πέψης με

ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoR* I πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 25 μl δείγματος με 5 μl διαλύματος φορτώσεως.

Τα δείγματα μαζί με μάρτυρα και δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (100 bp Ladder), τοποθετήθηκαν προσεκτικά με μικροπιπέτα σε κάθε μια από τις θέσεις ηλεκτροφόρησης ('πηγάδια') και ηλεκτροφορήθηκαν υπό σταθερή τάση 5 V/cm. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή χρωματίστηκε σε διάλυμα 0.5 mg/l βρωμιούχου αιθιδίου (CH₃CH₂Br) για 30 ή 50 min ανάλογα με την περιεκτικότητα της (1% w/v και 1.5 % w/v αντίστοιχα) και αποχρωματίστηκε σε αραιό διάλυμα θειικού μαγνησίου.

Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως, παρουσία ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA).

2.12. Εύρεση της αλληλουχίας βάσεων τμημάτων DNA.

Αρχικά, πλασμιδιακό DNA εξήχθη από τρεις κλώνους που περιείχαν το κατάλληλο τμήμα DNA, που προήλθε από ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA των στελεχών βακτηρίου ή ζυμών της παρούσας μελέτης. Η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ηράκλειο Κρήτης), χρησιμοποιώντας τους επισημασμένους εκκινητές (Fluorescence-labelled primers) SP6 (5'-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') και T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'). Στην περίπτωση του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οι επισημασμένοι εκκινητές 5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3' και 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'. Η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αναλυτή LI-COR Long ReadIR2 4200 (LI-COR, USA).

2.13. Φυλογενετική ανάλυση.

Οι αλληλουχίες των βάσεων DNA είχαν αναλυθεί με την βοήθεια του προγράμματος (DNASTAR Inc., Madison, USA). Η φυλογενετική συσχέτιση των αλληλουχιών βάσεων των μικροοργανισμών της παρούσας μελέτης με τις αλληλουχίες βάσεων γνωστών μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής βάσης δεδομένων NCBI, χρησιμοποιώντας το φυλογενετικό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Οι αλληλουχίες βάσεων των γενετικά συγγενών γνωστών μικροοργανισμών συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω φυλογενετική

ανάλυση. Συσχέτιση των αλληλουχιών βάσεων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του διαδικτυακού προγράμματος “ClustalW Submission Form” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν βάση του προγράμματος TREECON for Windows (Version 1.3b). Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τις μεθόδους Jukes και Cantor (1969) και Kimura (1980) για το βακτήριο και τις ζύμες αντιστοίχως. Η διαμόρφωση του φυλογενετικού δέντρου βασίστηκε στην μέθοδο “neighbor-joining” (Saitou και Nei, 1987) με τη στήριξη αυτοδύναμης ανάλυσης 100 δέντρων (bootstrap analysis).

2.14. Πειραματικός σχεδιασμός αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με ‘μικτό πληθυσμό-consortium’ μικροοργανισμών.

Δυο βασικοί χειρισμοί χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με ‘μικτό πληθυσμό-consortium’ μικροοργανισμών.

Στον πρώτο χειρισμό πραγματοποιήθηκε αρχικά εμβολιασμός των ΥΑΕ με το βακτηριακό στέλεχος FWW-12A (με επώαση του βακτηρίου αυτού για μία εβδομάδα), και κατόπιν πραγματοποιήθηκε προσθήκη δώδεκα εμβολίων σε ΥΑΕ (0.5 ml το καθένα), που προήλθαν από την ανάπτυξη, επί τριών εβδομάδων, δώδεκα στελεχών μυκήτων και ζυμών. Τα στελέχη αυτά είναι οι ζύμες FWW-9, GAR-15, GAR-21 και GAR-17, καθώς και οι μύκητες FGAR-2, FFWW-14, FFWW-18B, FGOLD-20, FGAR-23A, FGAR-25, FGOLD-25 και FFWW-25, τα οποία σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας βρέθηκε ότι έχουν την ικανότητα να αποδομούν, το καθένα ξεχωριστά, τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Μετά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των επεξεργασμένων (με βακτήριο) ΥΑΕ με τα δώδεκα παραπάνω στελέχη, πραγματοποιήθηκε επώαση για άλλες τρεις εβδομάδες. Συνοπτικά, στον πρώτο χειρισμό, πραγματοποιήθηκε επώαση των ΥΑΕ με το στέλεχος βακτηρίου, και κατόπιν ταυτόχρονος εμβολιασμός του υλικού αυτού από δώδεκα στελέχη μυκήτων και ζυμών επί τρεις εβδομάδες.

Στον δεύτερο χειρισμό πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος εμβολιασμός του υλικού αυτού από τα δώδεκα αυτά στελέχη μυκήτων και ζυμών επί τρεις εβδομάδες, χωρίς προηγούμενη επώαση των ΥΑΕ με τη χρήση του βακτηρίου FWW-12A.

Σε κάθε ένα από τους παραπάνω χειρισμούς χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις (n=4) παρουσία μάρτυρα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βιομάζας, του χρώματος, των φαινολικών συστατικών, της βλαστικότητας και του pH σε όλες τις παραπάνω επεμβάσεις-χειρισμούς.

2.14.1. Μέτρηση βιομάζας.

Η μέτρηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με διήθηση του μυκηλίου σε ηθμό (του οποίου το ξηρό βάρος είχε προηγουμένως προσδιοριστεί), ξήρανση αυτού στους 70°C για δύο μέρες, ζύγιση του ξηραμένου ηθμού-μυκηλίου και υπολογισμό του ξηρού βάρους μυκηλίου με αφαίρεση του βάρους του ηθμού από την ένδειξη της ζυγαριάς.

2.14.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών.

Υλικά και Όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα, κατεργασμένα και μη, υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (MERCK)
- 20% w/v Na₂CO₃
- Συριγγικό οξύ
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- Σιφόνιο των 20 ml
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)

Πειραματική πορεία

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων έλαβε χώρα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.*, 1994). Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 1% v/v του προς ανάλυση δείγματος (πυκνά δείγματα είχαν αρχικά αραιωθεί καταλλήλως), 5% v/v αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και 15% v/v διαλύματος Na₂CO₃ αρχικής συγκεντρώσεως 20% w/v, συμπληρώνοντας το υπόλοιπο της ογκομετρικής φιάλης με απιονισμένο νερό και αναμιγνύοντας το περιεχόμενο αυτής σε χρόνο μικρότερου των 8 min. Το δείγμα αυτό αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Κατόπιν, μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 760 nm. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα

συριγγικού οξέος γνωστής συγκεντρώσεως (οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ήταν 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 µg συριγγικού οξέος/ml) με σκοπό την δημιουργία καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της ποσότητας φαινολικών στα προς ανάλυση δείγματα.

2.14.3. Μέτρηση απορρόφησης (χρώμα).

Υλικά και Όργανα

- Δείγματα (ΥΑΕ)
- Απονισμένο νερό-Υδροβολέας
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5 ml (Eppendorfs)
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Κυψελίδες

Πειραματική πορεία

Για την μέτρηση της απορρόφησης, κατάλληλη ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος εισήχθη σε μικροσωλήνες (eppendorfs). Ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος στις 11000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για χρονικό διάστημα 3 min, και στο υπερκείμενο αυτού, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 525 nm. Στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 v/v, ΥΑΕ:H₂O, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της απορρόφησης και η ρύθμιση του οργάνου.

2.14.4. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας.

Υλικά και Όργανα

- Διηθητικό χαρτί
- Δείγματα (ΥΑΕ)

- Σπόροι κάρδαμου (*Lepidium sativum* L)
- Πόσιμο νερό
- Τρυβλία Petri
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών

Πειραματική πορεία

Η μέτρηση της βλαστικότητας των σπόρων καρδάμου (*Lepidium sativum*, L) πραγματοποιήθηκε βάση του πρωτοκόλλου του Zucconi *et al.* (1981). Βάση αυτού, τρία διηθητικά χαρτιά προστέθηκαν καταλλήλως στο εσωτερικό ενός τρυβλίου Petri, και στην επιφάνεια αυτών τοποθετήθηκαν 25 σπόροι καρδάμου, οι οποίοι διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος κατάλληλης αραιώσης (YAE). Κατόπιν τα κλειστά τρυβλία τυλίχτηκαν με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί έτσι ώστε να διατηρεί την υγρασία του. Οι σπόροι αφήθηκαν να βλαστήσουν στους 25°C για τρεις μέρες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τον μάρτυρά (ταυτόχρονα) με την διαφοροποίηση ότι η ποσότητα του δείγματος αντικαταστάθηκε με αντίστοιχη ποσότητα πόσιμου νερού. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα. Με το πέρας των τριών ημερών, μετρήθηκε ο αριθμός εκβλαστημένων σπορίων καθώς και το μήκος της ρίζας τους. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 v/v, YAE:H₂O.

Ο δείκτης βλαστικότητας επί τοις εκατό (% GI) δίδεται ως ακολούθως:

$$\% \text{ GI} = (\text{Βλαστικότητα σπόρων δείγματος} / \text{Βλαστικότητα σπόρων μάρτυρα}) \times (\text{μήκος ριζών των σπορίων που βλάστησαν} / \text{μήκος ριζών των σπορίων του μάρτυρα}) \times 100.$$

2.14.5. Μέτρηση pH.

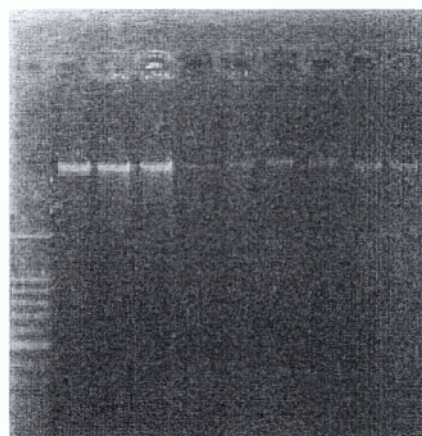
Η μέτρηση του pH των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση ενός Scott Gerate TR156 πεχάμετρου, αφού προηγουμένως το όργανο αυτό ρυθμιζονταν με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων (sds-France) pH 4, 7, και 10, ανάλογα με την τιμή του pH του προς ανάλυση δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

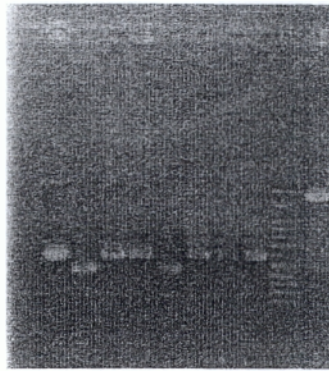
3.1. Χαρακτηρισμός μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους.

Από τα οχτώ στελέχη ζυμών και το ένα στέλεχος βακτηρίου απομονώθηκε γονιδιακό DNA, του οποίου η ποιότητα και ποσότητα εξαρτιόταν από την φύση του κάθε στελέχους (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Γονιδιακό DNA των στελεχών βακτηρίου και ζυμών. Από αριστερά προς τα δεξιά: δείκτη μοριακών βαρών (100 bp), FWW-9, FWW-12A, GAR-12B, GOLD-13, GAR-15, GAR-17, GAR-20, GAR-21 και GAR-22.

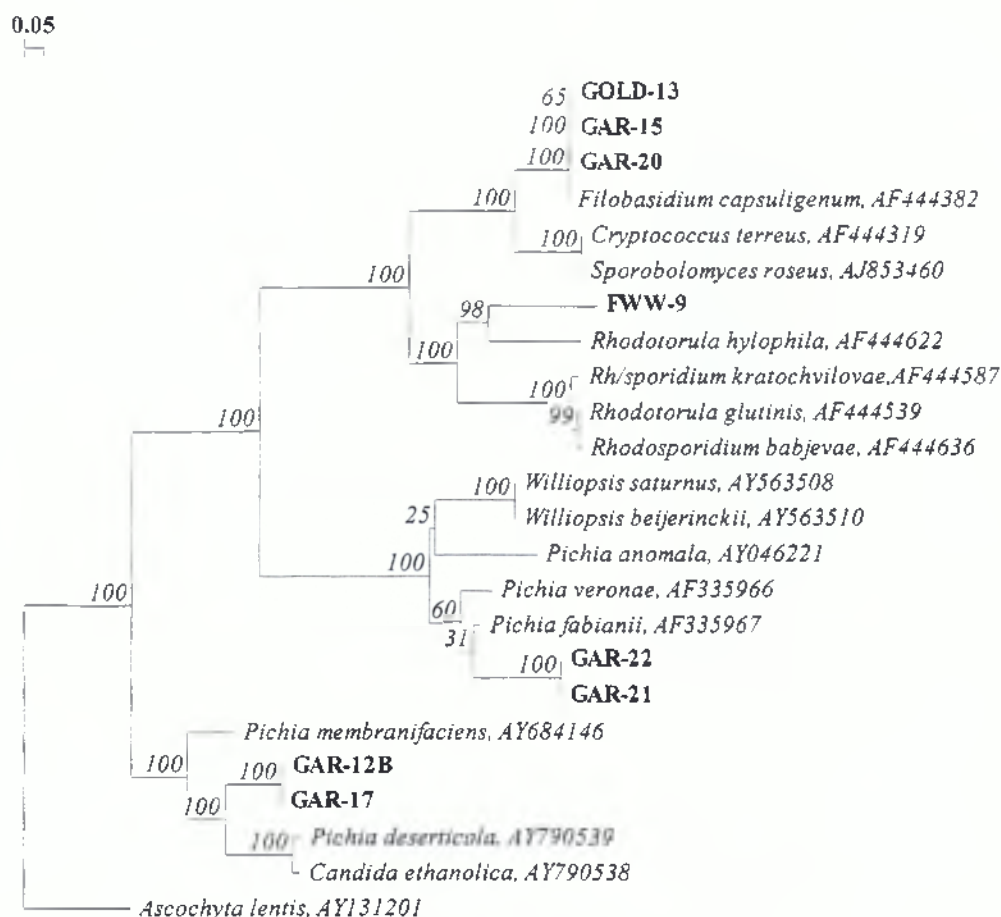
Πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για τα στελέχη αυτά, με την οποία ενισχύθηκε το τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (582 bp για τα στελέχη FWW-9, GAR-15, GAR-21 και GOLD-13, 581 bp για τα στελέχη GAR-20 και GAR-22, και 427 bp για τα στελέχη GAR-12B και GAR-17) για τις ζύμες και το γονίδιο 16S rDNA για το βακτήριο FWW-12A (1446 bp) αντίστοιχα (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rDNA και του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 στελεχών βακτηρίου και ζυμών αντίστοιχα. Από αριστερά προς τα δεξιά: μάρτυρας-τυφλό, FWW-9, GAR-12B, GOLD-13, GAR-15, GAR-17, GAR-20, GAR-21, GAR-22, δείκτη μοριακών βαρών (100 bp) και FWW-12A.

Μετά την εισαγωγή των τμημάτων αυτών DNA στο πλασμιδιακό φορέα T-easy (T-easy vector, Promega, USA) και της γενετικής μεταμορφώσεως των κυττάρων *E. coli*, πραγματοποιήθηκε η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων όλων των ενισχυμένων αυτών τμημάτων DNA. Οι αλληλουχίες των βάσεων DNA των εννέα αυτών απομονώσεων και η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 1 και 2. Οι εννέα απομονώσεις της παρούσας εργασίας συγκρίθηκαν φυλογενετικά με τους ήδη γνωστούς μικροοργανισμούς, με την βοήθεια του ηλεκτρονικού προγράμματος BLAST. Οι απομονώσεις GAR-12B και GAR-17 παρουσίαζαν μεγάλη φυλογενετική ομοιότητα (99.5 % ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2) και συσχετιζόνταν με το γένος *Pichia* (οικογένεια Saccharomycetaceae, τάξη Saccharomycetales, κλάση Saccharomycetes, υποφύλο Saccharomycotina, φύλο Ascomycota), και ιδιαίτερα με το στέλεχος *P. deserticola* (81.6% και 82.2% ομοιότητες με τα στελέχη GAR-12B και GAR-17 αντίστοιχως) (Εικόνα 3.3). Οι απομονώσεις GAR-21 και GAR-22, οι οποίες επίσης άνηκαν στο γένος *Pichia*, δεν παρουσίαζαν διαφοροποίηση στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2, ενώ είχαν 87.1% και 85.4% ομοιότητα με τα είδη *P. fabiani* και *P. veronae* αντίστοιχα (Εικόνα 3.3). Οι απομονώσεις GAR-15, GAR-20 και GOLD-13 άνηκαν στο γένος *Filobasidium* (οικογένεια Filobasidiaceae, τάξη Filobasidiales, κλάση Heterobasidiomycetes, φύλο Basidiomycota) παρουσιάζοντας υψηλή φυλογενετική ομοιότητα με το είδος *F. capsuligenum* στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (99.7% ομοιότητα με τα στελέχη GAR-15 και GOLD-13, καθώς και 99.5% ομοιότητα με το στέλεχος GAR-20) (Εικόνα 3.3). Οι απομονώσεις GAR-15 και GOLD-13 δεν εμφάνιζαν καμία διαφορά βάσεων στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2,

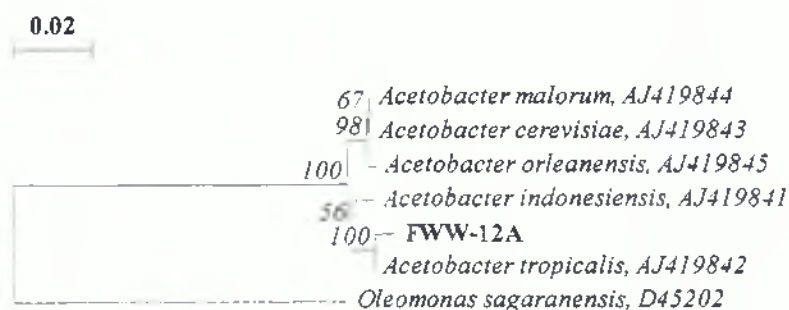
ενώ η απομόνωση GAR-20 έδειξε μικρή διαφοροποίηση (κατά 0.2%). Η απομόνωση FWW-9 συσχετίζονταν γενετικά με το γένος *Rhodotorula*, και ιδιαίτερα με τα είδος *R. hyliphila* (κλάση Urediniomycetes, φύλο Basidiomycota) (72.9% ομοιότητα) (Εικόνα 3.3). Οι φυλογενετικές αποστάσεις των στελεχών ζυμών παρουσιάζονται στο Παράρτημα 3.



Εικόνα 3.3. Δενδρόγραμμα των φυλογενετικών θέσεων των απομονώσεων ζυμών της παρούσας μελέτης. Φυλογενετικές αποστάσεις προσδιορίστηκαν με την μέθοδο του Kimura (1980) και το δενδρόγραμμα σχεδιάστηκε με την μέθοδο ‘neighbor-joining’ των Saitou και Nei (1987) βάση αναλύσεων 100 δένδρων, λαμβάνοντας υπόψη προσθήκες και διαγραφές βάσεων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο. Η αλληλουχία βάσεων του τμήματος DNA ITS1-5.8S-ITS2 του είδους *Ascochyta lentis* επιλέχθηκε τυχαία για την καθοδήγηση του δενδρογράμματος.

Το βακτήριο FWW-12A άνηκε στο γένος *Acetobacter* (οικογένεια *Acetobacteraceae*, τάξη *Rhodospirillales*, υποκλάση *α-Proteobacteria*, κλάση *Proteobacteria*), παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη φυλογενετική ομοιότητα στο γονίδιο 16S rDNA με το είδος *Acetobacter*

tropicalis (99.6% ομοιότητα) (Εικόνα 3.4). Οι φυλογενετικές αποστάσεις του στελέχους βακτηρίου FWW-12A παρουσιάζονται στο Παράρτημα 4.



Εικόνα 3.4. Δενδρόγραμμα της φυλογενετικής θέσης της βακτηριακής απομονώσεως FWW-12A. Φυλογενετικές αποστάσεις προσδιορίστηκαν με την μέθοδο των Jukes και Cantor (1969) και το δενδρόγραμμα σχεδιάστηκε με την μέθοδο των Saitou και Nei (1987) 'neighbor-joining' βάση αναλύσεων 100 δένδρων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο. Η αλληλουχία βάσεων του γονιδίου 16S rDNA του είδους *Oleomonas sagaranensis* επιλέχθηκε τυχαία για την καθοδήγηση του δενδρογράμματος.

3.2. Μελέτη της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με 'μικτό πληθυσμό-consortium' μικροοργανισμών.

Δυο βασικοί χειρισμοί χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αποικοδομήσεως υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με 'μικτό πληθυσμό-consortium' μικροοργανισμών. Στον πρώτο χειρισμό πραγματοποιήθηκε επώαση των ΥΑΕ με το στέλεχος βακτηρίου, και κατόπιν ταυτόχρονος εμβολιασμός του υλικού αυτού από δώδεκα στελέχη μυκήτων και ζυμών επί τρεις εβδομάδες. Στον δεύτερο χειρισμό πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος εμβολιασμός του υλικού αυτού από δώδεκα στελέχη μυκήτων και ζυμών επί τρεις εβδομάδες, χωρίς προηγούμενη επώαση των ΥΑΕ με τη χρήση του βακτηρίου FWW-12A (Οράτε Υλικά και Μέθοδοι, Κεφάλαιο 2). Τα στελέχη αυτά είναι οι ζύμες FWW-9, GAR-15, GAR-21 και GAR-17, καθώς και οι μύκητες FGAR-2, FFWW-14, FFWW-18B, FGOLD-20, FGAR-23A, FGAR-25, FGOLD-25 και FFWW-25, τα οποία σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Ελαιίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας βρέθηκε ότι έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν, το καθένα ξεχωριστά, τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Τα ΥΑΕ που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από καινούρια παραλαβή

(Φεβρουάριος 2005), και παρουσιάζαν αυξημένη φυτοτοξικότητα σε σχέση με το υλικό της προγενέστερης μελέτης.

3.2.1. Βιομάζα.

Στην περίπτωση των οχτώ στελεχών μυκήτων προσδιορίστηκε η βιομάζα τους, προ της ταυτόχρονης προσθήκης αυτών σε ΥΑΕ (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός της βιομάζας μυκήτων σε 25% v/v ΥΑΕ.

Στέλεχος	Βιομάζα μυκήτων (g)
FFWW-14	0.26
FFWW-18B	0.11
FFWW-25	0.94
FGAR-2	0.28
FGAR-23A	0.27
FGAR-25	0.24
FGold-20	0.26
FGold-25	0.28

Κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μυκηλίου που προέκυψε από την ανάπτυξη του 'μικτού πληθυσμού-consortium' μικροοργανισμών κατά τους δυο χειρισμούς (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Προσδιορισμός του μυκηλίου κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.

Χειρισμός	Βιομάζα (g)
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	0.27 ± 0.02
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	0.29 ± 0.03

n= 4.

Όπως παρατηρείται, η βιομάζα του μυκηλίου είναι παρόμοια και στους δυο χειρισμούς, με ελαφρώς μεγαλύτερη τιμή στην περίπτωση του χειρισμού που δεν πραγματοποιήθηκε επώαση με το βακτήριο. Όσον αφορά την αρχική βιομάζα στελεχών μυκήτων, η βιομάζα του στελέχους FFWW-25 ήταν σχεδόν τριπλάσια από αυτήν των υπολοίπων στελεχών μυκήτων. Προφανώς, ο ανταγωνισμός των μικροοργανισμών δεν επέτρεψε το σχηματισμό

ποσότητας μυκηλίου παρόμοιου με του στελέχους FFWW-25 κατά την εκτέλεση και των δυο χειρισμών. Κατά την ανάπτυξη του 'μικτού πληθυσμού-consortium' μικροοργανισμών, αρχικά παρατηρήθηκε ραγδαία μυκηλιακή ανάπτυξη, η οποία μετά το πέρας της δέκατης ημέρας σταμάτησε, ακολουθούμενη από κατακρήμνιση μεγάλης ποσότητας στερεού.

3.2.2. Αποχρωματισμός.

Κατά τον προσδιορισμό του χρώματος των ΥΑΕ, τα οποία είχαν αρχικά εμβολιαστεί με καθένα από τα στελέχη μυκήτων, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος FFWW-14 προκαλούσε το μεγαλύτερο αποχρωματισμό, αποχρωματίζοντας τα ΥΑΕ κατά τουλάχιστον 100% (Πίνακες 3.3). Κατά τον προσδιορισμό του χρώματος και στους δυο χειρισμούς, παρατηρήθηκε ότι ο αποχρωματισμός ήταν μεγαλύτερος στην περίπτωση που δεν πραγματοποιήθηκε ανάδευση του υπερκείμενου και του κατακρημνίσματος (Πίνακας 3.4). Τονίζεται ότι και στους δυο χειρισμούς πραγματοποιήθηκε σημαντική μείωση του χρώματος, με αποτέλεσμα η τελική τιμή του χρώματος των ΥΑΕ να είναι ίση ή μικρότερη με το 33% της τιμής του μάρτυρα (περίπου 300% αποχρωματισμός).

Πίνακας 3.3. Προσδιορισμός του χρώματος ($A_{525\text{ nm}}$) στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.

Στέλεχος	A (525 nm)
FWW-9	3.02
FWW-12A	3.36
GAR-15	3.35
GAR-17	3.02
GAR-21	2.71
FFWW-14	1.52
FFWW-18B	2.78
FFWW-25	2.56
FGAR-2	1.77
FGAR-23A	1.61
FGAR-25	3.15
FGold-20	2.83
FGold-25	2.87

Πίνακας 3.4. Προσδιορισμός του χρώματος ($A_{525 \text{ nm}}$) κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.

Χειρισμός	A (525 nm)
<i>Δίχως ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	0.67 ± 0.04
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	0.83 ± 0.03
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκέντρωσεως 25% v/v)	3.36 ± 0.08
<i>Με ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	1.03 ± 0.04
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	1.22 ± 0.13
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκέντρωσεως 25% v/v)	3.12 ± 0.04

n= 4.

3.2.3. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών, τόσο στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών όσο και στα ΥΑΕ των δυο χειρισμών, δεν παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου. Εξάιρεση αποτελεί το στέλεχος FGOLD-25, το οποίο μείωνε τη συγκέντρωση φαινολικών κατά μικρό ποσοστό (μικρότερο του 10%). Τονίζεται ότι και στους δυο χειρισμούς παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του φαινολικού φορτίου, περίπου ίση με 5 έως 10% (Πίνακες 3.5 και 3.6).

Πίνακας 3.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.

Στέλεχος	Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών (mg ml^{-1})
FWW-9	2.71
FWW-12A	2.67
GAR-15	2.79
GAR-17	2.61
GAR-21	2.62
FFWW-14	2.70
FFWW-18B	2.64
FFWW-25	2.59
FGAR-2	2.56
FGAR-23A	2.71
FGAR-25	2.69
FGold-20	2.90
FGold-25	1.84

Πίνακας 3.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.

Χειρισμός	Φαινολικά (mg ml ⁻¹)
<i>Δίχως ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	2.43 ± 0.10
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	2.40 ± 0.07
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v)	2.14 ± 0.05
<i>Με ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	2.42 ± 0.06
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	2.36 ± 0.06
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v)	2.21 ± 0.01

n= 4.

3.2.4. Βλαστικότητα.

Κατά τον προσδιορισμό της βλαστικότητας των ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος FGAR-2 προκάλεσε την μεγαλύτερη βελτίωση της βλαστικότητας περίπου κατά 150 με 200% σε σχέση με τον μάρτυρα (Πίνακας 3.7). Στις περιπτώσεις των στελεχών FFWW-18B, FGAR-25 και FGOLD-25 παρατηρήθηκε μείωση της βλαστικότητας των ΥΑΕ, ενώ σε προγενέστερη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε το έτος 2004 βρέθηκε ότι τα τρία αυτά στελέχη προκαλούσαν αύξηση της βλαστικότητας. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην διαφορετική σύσταση της καινούργιας παρτίδας ΥΑΕ που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα. Κατά την πραγμάτωση των δυο χειρισμών, παρατηρήθηκε αύξηση της βλαστικότητας κατά 100 με 150% (Πίνακας 3.8). Παρόλα αυτά, το ποσοστό αυτό δεν υπερβαίνει εκείνο του στελέχους FGAR-2, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποδοθεί η μείωση της φυτοτοξικότητας στην δράση του ‘μικτού πληθυσμού-consortium’ των μικροοργανισμών.

Στο τέλος κάθε χειρισμού, μετρήθηκε το pH και βρέθηκε ίσο με 5.43 ± 0.05 και 4.99 ± 0.02 στην περίπτωση του πρώτου (επάση με βακτήριο) και του δεύτερου χειρισμού αντιστοίχως. Ο προσδιορισμός της βλαστικότητας επαναλήφθηκε για τους παραπάνω χειρισμούς, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH στην τιμή 6 (η οποία ήταν η τιμή του pH μάρτυρα) και στην τιμή 7.8 (η οποία είναι η τιμή του pH του πόσιμου νερού), εντούτοις δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιημένα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά του Πίνακα 3.8, για αυτό και παραλείπονται.

Πίνακας 3.7. Προσδιορισμός της βλαστικότητας στα ΥΑΕ των αρχικών στελεχών μικροοργανισμών.

Στέλεχος	Βλαστικότητα (%)
FWW-9	11.5 ± 5.4
FWW-12A	8.4 ± 0.9
GAR-15	12.9 ± 1.7
GAR-17	5.3 ± 0.5
GAR-21	10.8 ± 4.4
FFWW-14	7.3 ± 1.2
FEW-18B	3.4 ± 0.7
FFWW-25	8.6 ± 1.8
FGAR-2	21.1 ± 2.5
FGAR-23A	10.9 ± 3.9
FGAR-25	2.6 ± 0.8
FGold-20	15.2 ± 4.6
FGold-25	1.6 ± 0.5

Πίνακας 3.8. Προσδιορισμός της βλαστικότητας (%) κατά τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης μυκήτων και ζυμών σε 25% v/v ΥΑΕ.

Χειρισμός	GI (%)
<i>Δίχως ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	15.49 ± 1.64
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	18.23 ± 1.84
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v)	7.22 ± 0.42
<i>Με ανάδευση υπερκειμένου και κατακρημνίσματος</i>	
Με προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A για μία εβδομάδα	19.82 ± 0.54
Χωρίς προγενέστερη κατεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο FWW-12A	17.34 ± 2.17
Μάρτυρας (Μη εμβολιασμένο δείγμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v)	8.60 ± 1.32

n= 4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συζήτηση.

Βάσει της φυλογενετικής μελέτης, οι απομονώσεις GOLD-13, GAR-15 και GAR-20, ανήκουν στο γένος *Filobasidium* (οικογένεια Filobasidiaceae, τάξη Filobasidiales, κλάση Heterobasidiomycetes, φύλο Basidiomycota), και μάλιστα είναι στελέχη του είδους *F. capsuligenum*, αφού παρουσιάζουν διαφοροποίηση μικρότερη ή ίση του 0.5% στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2. Αν και τα δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων GAR και GOLD παράχθηκαν σε διαφορετική χρονική περίοδο (το πρώτο παράχθηκε τον Ιανουάριο του 2004 και το δεύτερο τον Νοέμβριο του 2003), εντούτοις και τα δυο δείγματα προέρχονται από το ίδιο ελαιοτριβείο (περιοχή Γαργαλιάνων). Η ύπαρξη στελεχών του ίδιου είδους μπορεί να εξηγηθεί είτε στο ότι η ζύμη αυτή είναι ευρύτατα διαδεδομένη στην περιοχή αυτή και υπάρχει στο φύλλωμα ή στο καρπό των ελαιόδεντρων της περιοχής είτε στο ότι βρίσκεται ως μόλυσμα στις εγκαταστάσεις του ελαιοτριβείου ή στο χώρο απόρριψης των υγρών αποβλήτων. Η πρώτη εξήγηση είναι πιο πιθανή αφού είδη του γένους *Filobasidium* απαντώνται στο φύλλωμα (McCormack *et al.*, 1994) και μπορούν να προκαλέσουν αποικοδόμηση διαφόρων φυτικών υπολειμμάτων (Jimenez *et al.*, 1991). Επιπλέον, στελέχη του γένους αυτού έχουν απομονωθεί από ελαιόκαρπο (Moore και Kregerva, 1972). Στελέχη του γένους *Filobasidium* έχουν τόσο περιβαλλοντικό όσο και κλινικό ενδιαφέρον (Hall *et al.*, 2003; Samraio, 1999). Επίσης, στελέχη του γένους αυτού, χρησιμοποιούνται στο βιολογικό έλεγχο παθογόνων μικροοργανισμών, π.χ. έχει αναφερθεί η αναστολή του μύκητα *Botrytis cinerea* στα μήλα με την βοήθεια στελεχών του είδους *F. floriforme* (Filonow *et al.*, 1996).

Οι απομονώσεις GAR-12B και GAR-17 ανήκουν στο ίδιο είδος (99.5 % ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S-ITS2) και συσχετίζονται με το γένος *Pichia* (οικογένεια Saccharomycetaceae, τάξη Saccharomycetales, κλάση Saccharomycetes, υποφύλο Saccharomycotina, φύλο Ascomycota). Οι δυο αυτές απομονώσεις φαίνεται ότι ανήκουν σε μια καινούργια φυλογενετική ομάδα και αποτελούν ένα καινούργιο είδος του γένους *Pichia*, αφού παρουσιάζουν μικρή φυλογενετική συσχέτιση με το στέλεχος *P. deserticola* (81.6% και 82.2% ομοιότητες με τα στελέχη GAR-12B και GAR-17 αντιστοίχως), το οποίο είναι ο πιο συγγενής προς αυτά, γνωστός μικροοργανισμός. Οι απομονώσεις GAR-21 και GAR-22 ήταν γενετικά ταυτόσημες στο τμήμα DNA ITS1-5.8S-ITS2, ανήκοντας επίσης στο γένος *Pichia*.

Οι απομονώσεις αυτές φαίνεται ότι επίσης ανήκουν σε μια καινούργια φυλογενετική ομάδα και πιθανόν να αποτελούν ένα καινούργιο είδος του γένους *Pichia*, αφού παρουσιάζουν μικρή φυλογενετική συσχέτιση με τα πιο συγγενή προς αυτά είδη *P. fabianii* και *P. veronae* (87.1% και 85.4% ομοιότητα αντιστοίχως). Στελέχη του γένους *Pichia* απαντώνται τόσο σε κλινικά δείγματα (Hall *et al.*, 2003) όσο και σε φυτικά υπολείμματα και στο χόμα (Phaff *et al.*, 1985). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι στελέχη του είδους *P. membranifaciens*, είδος που συγγενεύει με τις απομονώσεις GAR-12B και GAR-17, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο βιολογικό έλεγχο του βοτρυτή (Santos και Marquina, 2004). Τόσο στελέχη του είδους *P. membranifaciens* όσο και στελέχη του είδους *P. anomala* (στέλεχος συγγενής προς τις απομονώσεις GAR-21 και GAR-22), έχουν απομονωθεί από βρώσιμες ελιές (Marquina *et al.*, 1992: Gonzalez *et al.*, 1993: Duran *et al.*, 1994: Faid *et al.*, 1994: Asehraou *et al.*, 1997: Asehraou *et al.*, 2000: Quintana *et al.*, 2003). Τα περισσότερα είδη του γένους *Pichia* συμμετέχουν σε ζυμώσεις (Mani *et al.*, 1997).

Η απομόνωση FWW-9 συσχετιζόταν γενετικά με το γένος *Rhodotorula*, (κλάση Urediniomycetes, φύλο Basidiomycota), εντούτοις η γενετική συσχέτιση με το είδος *R. hylorhila*, το πιο συγγενή προς αυτή μικροοργανισμό, ήταν μικρή (72.9% ομοιότητα). Επομένως, το στέλεχος FWW-9 είναι φυλογενετικά διακριτό από τους μέχρι στιγμής γνωστούς μικροοργανισμούς και πιθανόν να αποτελεί ένα καινούργιο είδος του γένους *Rhodotorula*. Στελέχη του γένους *Rhodotorula* απαντώνται σε κλινικά δείγματα, τρόφιμα και φυτικά υπολείμματα (McComack *et al.*, 1994: Asehraou *et al.*, 2000: Hall *et al.*, 2003). Είδη του γένους *Rhodotorula* έχουν επίσης απομονωθεί από επιτραπέζιες ελιές (Asehraou *et al.*, 2000). Επίσης, πολλά στελέχη του γένους αυτού παρουσιάζουν ισχυρή λιπολυτική δράση (Cardenas *et al.*, 2001), και πιθανόν, μέσω αυτής, να μειώνουν το λιπαρό φορτίο (και εντέλει και το οργανικό), το οποίο έχει βρεθεί να είναι υπεύθυνο για την μεγάλη φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ (Gonzalez *et al.*, 1990).

Οι απομονώσεις της παρούσας μελέτης που σχετίζονται με τα γένη *Rhodotorula* και *Pichia*, πιθανόν να εμπλέκονται στην διάσπαση ή μετατροπή, φαινολικών ή και άλλων αρωματικών συστατικών, αφού σε στελέχη των ειδών αυτών, έχουν βρεθεί μηχανισμοί διάσπασης φαινολικών/αρωματικών συστατικών (Sampaio, 1999).

Από τις οχτώ απομονώσεις ζυμών, οι τέσσερις (στελέχη των γενών *Rhodotorula* και *Filobasidium*) ανήκουν στις ζύμες του φύλου Basidiomycota (basidiomycetous yeasts), ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις απομονώσεις (στελέχη του γένους *Pichia*) ανήκουν στις ζύμες εκβλάστησης (budding yeasts).

Το στέλεχος βακτηρίου FWW-12A που ανήκει στο γένος *Acetobacter* (οικογένεια *Acetobacteraceae*, τάξη *Rhodospirillales*, υποκλάση *α-Proteobacteria*, κλάση *Proteobacteria*), αποτελεί στέλεχος του είδους *A. tropicalis*, αφού οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν υψηλή γενετική συσχέτιση (99.6% ομοιότητα στο γονίδιο 16S rDNA). Επομένως, η απομόνωση αυτή ανήκει στα οξικά βακτήρια, τα οποία έχουν απομονωθεί κυρίως από τρόφιμα και από διαδικασίες ζυμώσεων (Sokollek *et al.*, 1998; Lisdiyanti *et al.*, 2000; 2001). Επίσης, στελέχη του γένους *Acetobacter* έχουν απομονωθεί από ελαιόφυλλα (Ercolani, 1991). Βάση της παραπάνω αναφοράς η ύπαρξη του βακτηρίου αυτού στα ΥΑΕ μπορεί να εξηγηθεί, παρόλα αυτά, είναι άγνωστο με ποιο μηχανισμό το οξικό αυτό βακτήριο μειώνει τη φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ. Η φυλογενετική συσχέτιση των εννέα αυτών μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Κατά την μελέτη της μείωσης της τοξικότητας των ΥΑΕ με 'μικτό πληθυσμό-consortium' μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε έντονος αποχρωματισμός των ΥΑΕ, μειώνοντας το χρώμα των ΥΑΕ στο 30% της αρχικής τους τιμής. Παρόλα αυτά, η αύξηση της βλαστικότητας, αν και σημαντική (100 με 150%), δεν υπερκέρασε την αύξηση της βλαστικότητας που προκαλούνταν από ορισμένα στελέχη μικροοργανισμών, όταν αυτά εμβολιάζονταν ξεχωριστά, και όχι ταυτοχρόνως. Όσο αναφορά το φαινολικό φορτίο, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση της βλαστικότητας δεν συνοδεύεται απαραίτητα και από μείωση του φαινολικού φορτίου, αφού στην περίπτωση της συνεργιστικής δράσης των μικροοργανισμών αυτών, όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου αλλά μικρή αύξηση αυτού. Τέλος, είναι επίσης σημαντικό ότι κατά τη δράση του 'μικτού-πληθυσμού-consortium' των μικροοργανισμών παρατηρήθηκε κατακρήμνιση στέρεου, στοιχείο σημαντικό για την μείωση του οργανικού φορτίου με την χρήση φυσικοχημικών μεθόδων (π.χ. διήθηση).

Πίνακας 4.1. Φυλογενετική συσχέτιση των στελεχών βακτηρίου και ζυμών.

Στέλεχος	Μικρο- οργανισμός	Συστηματική κατάταξη	Φυλογενετικά συγγενής Μικροοργανισμός	Φυλογενετική ομοιότητα	Βιβλιογραφία
FWW-9	Ζύμη	Rhodotorula, Urediniomycetes, Basidiomycota	<i>R. hylophila</i>	72.9%	Van der Walt, 1971
FWW-12A	Βακτήριο	Acetobacteraceae, Rhodospirillales, α-Proteobacteria, Proteobacteria	<i>A. tropicalis</i>	99.6%	Lisdiyanti <i>et al.</i> , 2000
GAR-12B	Ζύμη	<i>Pichia</i> , Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota	<i>P. deserticola</i>	81.6%	Phaff <i>et al.</i> , 1985
GOLD-13	Ζύμη	<i>Filobasidium</i> , Filobasidiaceae, Filobasidiales, Heterobasidiomycetes, Basidiomycota	<i>F. capsuligenum</i>	99.7%	Fell <i>et al.</i> , 1972
GAR-15	Ζύμη	<i>Filobasidium</i> , Filobasidiaceae, Filobasidiales, Heterobasidiomycetes, Basidiomycota	<i>F. capsuligenum</i>	99.7%	Fell <i>et al.</i> , 1972
GAR-17	Ζύμη	<i>Pichia</i> , Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota	<i>P. deserticola</i>	82.2%	Phaff <i>et al.</i> , 1985
GAR-20	Ζύμη	<i>Filobasidium</i> , Filobasidiaceae, Filobasidiales, Heterobasidiomycetes, Basidiomycota	<i>F. capsuligenum</i>	99.5%	Fell <i>et al.</i> , 1972
GAR-21	Ζύμη	<i>Pichia</i> , Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota	<i>P. fabianii</i>	87.1%	Kurtzman, 1984
GAR-22	Ζύμη	<i>Pichia</i> , Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota	<i>P. fabianii</i>	87.1%	Kurtzman, 1984

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1. Αλληλουχίες βάσεων των στελεχών βακτηρίου και ζυμών.

Στέλεχος ζύμης FWW-9

AAGGATCATATTGAATCGTTTCTGAAGATCGTAAGATCTATCGGAACAAACCATCCTTCTTACCCTGTGCACTATATAGGTTGTTTACAACCT
TTTATTTTAAACACGAGTCTAAGTATGTTCTTTGTTATAAAGATAATATATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACCGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCTGGGATTTCTGGGAGC
ATGCTCTGTTTGGAGTGCATGAATATTCAATTTTACTTTTGTAAATGAAAATTTGTAGAATTTGATTTGATGTTGCTATTTCTCTCTCA
GGAGGATGTAAAATAGCTCATTCGAAATGTATTAGCATCCATCTGCATGATCGGATTTGACTCAGTGAATAGACTATTCTATTGAGGATTCATTC
TCGCAAGAGAAATGGCCGATTTTCTGACGGGAGCTTCTAAAACAGTTGTTCTCCGGAATGACGTCATTTAACTTTAGACCTCAAATCAGGCAGGA
TTACCCGCTGAACTTAAAG

Στέλεχος βακτηρίου FWW-12A

AGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCAT
GGGTGGGGGATAACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGGAGTCCGCTGTGGAGGAGCCTGCGTTCGATT
AGCTTGTGTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTATAAAG
CACTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCGAGAAGAACCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTT
GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAATCCCGGGCTTAACTGGGAGCTGCATTTGATACGTT
CAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTTGTGGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGGTTGGCGAAGGCGGCAACCT
GGCTCATGACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTT
GGGCAACTTAGTTGTTCAGTGTCTGAGCTAACGCGATAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAACTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGTATGTGTAGGCTGTGTCCAGGGATGGGCA
TTTCGCGCAAGGGACCTACAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGAGCTGCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TATCTTTAGTGTCCAGCTTGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGCTGACAGCCGAGGAAAGGTTGGGATGACGTCAGTCTCCTCATGGC
CCTTATGCTCTGGGTCACACGCTACAAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGCGACATCGTGTGATCTCTAAAAGCCGCTCAGTTC
GGATTGCACCTCGAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTATCAC
ACCGCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCTTAAAGCCGTTGAAACGAAACCAGCAATGGGGCGAGCCGACCAGGTCGGGTACGGACTGG
GGTGAAGTCTGAACAGGTAGCCGTAGGGGAACTTC

Στέλεχος ζύμης GAR-12B

AAGGATCATTACTGTGAATATAACTTCCACACATGCGTGGGACAAAAACATAAACCCTGAGTAATTTTAGTCGAAACTTGAAAAACAAAA
ATACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGGAATGCGATACCTAGTGTGAATTCAGCCATCGTGAATCA
TCGAGTCTTGAACGCACATTCGCCCGTCCGATTTCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCTTCTCTTGGAGTCTTCTCTTTTGAAG
ATGCCAGAACTGGCCGTTGCCACTGGCCCGGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCCGGAGCGAAAATA
TATATCATTTAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAA

Στέλεχος ζύμης GOLD-13

AAGGATCATTAGTGAATAACATGTCAAAGTCTCTGTTTCGGCAAGGCTTTGACAATCACATCCATAACACCTGTGAAGTGAAGATGCTTAGTG
TTTCGGCACGGCATCTGCCCTTTATAAACAATTAATGTAACAAATGTAGTCTTATATATAATCAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC
TCGCATCGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTT
GGTATTCGAGGAGCATGCCCTGTTTGGAGTGTGATGAAAATCAACCAAGACTTGGGTTTGTCTTGTCTTGGCTTGGAAATGGGTGCTTG
CAATCTTTACAGATGGCTCACCTTAAAAGAAATAGCTGGATCTGTTCTGAGAATTTGGTTGACTTGGCGTAATAAGTATTTCCGTAAGGACATC
TTCCGATGGCAATACTCTTAAACGAATGTCCGCTTCTAATCTGTTTCTTGGAGACTATACTTTTATGATCTGGCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAAG

Στέλεχος ζύμης GAR-15

AAGGATCATTAGTGAATAACATGTCAAAGTCTCTGTTTCGGCAAGGCTTTGACAATCACATCCATAACACCTGTGAAGTGAAGATGCTTAGTG
TTTCGGCACGGCATCTGCCCTTTATAAACAATTAATGTAACAAATGTAGTCTTATATATAATCAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC
TCGCATCGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTT
GGTATTCGAGGAGCATGCCCTGTTTGGAGTGTGATGAAAATCAACCAAGACTTGGGTTTGTCTTGTCTTGGCTTGGAAATGGGTGCTTG
CAATCTTTACAGATGGCTCACCTTAAAAGAAATAGCTGGATCTGTTCTGAGAATTTGGTTGACTTGGCGTAATAAGTATTTCCGTAAGGACATC
TTCCGATGGCAATACTCTTAAACGAATGTCCGCTTCTAATCTGTTTCTTGGAGACTATACTTTTATGATCTGGCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAAG

Στέλεχος ζύμης GAR-17

AAGGATCATTACTGTGAATATAACTTCCACACATGCGTGGGACAAAAACATAAACCCTGAGTAATTTTAGTCGAAACTTGAAAAACAAAA
ATACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTCAGCCATCGTGAAT
CATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCCCGTCCGATTTCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCTTCTCTTGGAGTCTTCTCTTTTGAAG
AGATGCCAGAACTGGCCGTTGCCACTGGCCCGGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCCGGAGCGAAAA
TATATATCATTTAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAA

Στέλεχος ζύμης GAR-20

AAGGATCATTAGTGAATAACATGTCAAAGTCTCTGTTTCGGCAAGGCTTTGACAATCACATCCATAACACCCGGAACGTGAAGATGCTTAGTG
TTTCGGCAGGGCATCTGCCCTTTATAAACAATTAATGTAACAAATGTAGTCTTATATATAATCAATAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGCTC
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCGTCCTT
GGTATTCGGAGGAGCATGCCCTGTTTGAGTGTTCATGAAAATATCAACCAAGACTTGGGTTTTTGGCTCTTCTTCTTGGCTTGAATTTGGGTGCTTG
CAATCTTTACAGATGGCTCACCTTAAAAGAATTAGCTGGATCTGTTCTGAGAATTGGTTGACTTGGCGTAATAAGTATTTTCGCTAAGGACATC
TTCCGATGGCCAATACTCTTAACGAATGTCCGCTTCTAATCCTGTTTCTCTTGGAGACTATACTTTTATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACCTAAG

Στέλεχος ζύμης GAR-21

AAGGATCATAAAAGTATCTTTTCGGCCTGCCAGCGCTTTCCTACTAGCGCGGGCCAAACCTTACACACAGTGCTTAGTTTTATATCTAACATTGC
TTTGGCTGGGCGCTTGGCGTCTGCCAGAGGTTAACCAAAACACAAAATATCGATCTATTTTTTAAAAATTAGTCAAGAAGTTTATTTAAAACA
AATCTTCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGGTTTTCGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCATATTCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGCATGCCGTGTTGAGCGTCAATTTCTCTCTCAAACCCCTAGGGTTT
GGTATTTAGTGATACTCTGTTAAACTGGGTTAACTTGAATAGTGTGGCAAGAGCTGCTTTGCCGAGGCTTCTCTGAACTAACGTTTCTAGGT
TCTACCAATTCGTTATGGGCAGTGGAGGGCGCTCTGGCGTTTGGGCTCGGCCAACAACACCTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
TTACCCGCTGAACCTAA

Στέλεχος ζύμης GAR-22

AAGGATCATAAAAGTATCTTTTCGGCCTGCCAGCGCTTTCCTACTAGCGCGGGCCAAACCTTACACACAGTGCTTAGTTTTATATCTAACATTGC
TTTGGCTGGGCGCTTGGCGTCTGCCAGAGGTTAACCAAAACACAAAATATCGATCTATTTTTTAAAAATTAGTCAAGAAGTTTATTTAAAACA
AATCTTCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGGTTTTCGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCATATTCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGCATGCCGTGTTGAGCGTCAATTTCTCTCTCAAACCCCTAGGGTTT
GGTATTTAGTGATACTCTGTTAAACTGGGTTAACTTGAATAGTGTGGCAAGAGCTGCTTTGCCGAGGCTTCTCTGAACTAACGTTTCTAGGT
TCTACCAATTCGTTATGGGCAGTGGAGGGCGCTCTGGCGTTTGGGCTCGGCCAACAACACCTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
TTACCCGCTGAACCTAA

Παράρτημα 2. Σύγκριση των αλληλουχιών βάσεων των απομονώσεων βακτηρίου και ζυμών.

Επεξήγηση: **Atropic:** *Acetobacter tropicalis* – **Aindone:** *Acetobacter indonesiensis* – **Acerevi:** *Acetobacter cerevisiae* – **Amaloru:** *Acetobacter malorum* – **Aorlean:** *Acetobacter orleasnensis* – **Osagarn:** *Oleomonas sagaranensis*.

A) Βακτηρίου.

	7	1464			
Atropic	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
FWW-12A	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
Aindone	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
Acerevi	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
Amaloru	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
Aorlean	-----	---AGCGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
Osagarn	GATCATGGCT	CAGAACGAAC	GCTGGCGGCA	TGCTTAACAC	ATGCAAGTCCG
	CACGAA-GGT	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	CACGAA-GGT	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	CACGAA-GGT	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	CACGAA-GGT	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	CACGAA-GGC	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	CACGAA-GGT	TTCGGCCTTA	-GTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CGCGTAGGAA
	AACGTTTGAC	TTCGGTCAGG	CGTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA
	TCTATCCATG	GGTGGGGGAT	AACTCTGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	TCTATCCATG	GGTGGGGGAT	AACTCTGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	TCTATCCGTG	GGTGGGGGAT	AACTCTGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	TCTATCCATG	GGTGGGGGAT	AACTCCGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	TCTATCCACG	GGTGGGGGAT	AACTCCGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	TCTATCCACG	GGTGGGGGAT	AACTCCGGGA	AACTGGAGCT	AATACCGCAT
	CCTGCCACGA	GGTACGGGAT	AACCCAGGGA	AACTGGGAC	AATACCGTAT
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCAAGTCGCC	TGTGGAGGAG	CCTGCCTTCG
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCGAGTCGCC	TGTGGAGGAG	CCTGCCTTCG
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCAAGTCGCC	TGCGGAGGAG	CCTGCCTTTG
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCAAGTCGCC	TGTGGAGGAG	CCTGCCTTTG
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCAAGTCGCC	TGTGGAGGAG	CCTGCCTTTG
	GATACCTGAG	GGTCAAAGGC	GCAAGTCGCC	TGTGGAGGAG	CCTGCCTTTG
	GTGACCTGAG	GGTGAAAGAT	TTA--TCGCC	TTTGGATGGG	CCCGCCTTCG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	ATTAGCTTGT	TGGTGGGGTA	ATGGCCTACC	AAGGCCATGA	TCGATAGCTG
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAA	GAAGGTTTTC	GGATTGTAAA	GCACTTTCGG
	AGCAATGCCG	CGTGTGTGAT	GAAGGCCTTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTCGC

CGGGGACGAT GATGACGGTA CCCGCAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG
CGGGGACGAT GATGACGGTA CCCGCAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG
CGGGGACGAT GATGACGGTA CCCGCAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG
CGGGGACGAT GATGACGGTA CCCGCAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG
CGGGGACGAT GATGACGGTA CCCGCAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG
ACGCGACGAT GATGACGGTA GCGTGAGAAG AAGCCCCGGC TAACTTCGTG

CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG
CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG
CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG
CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG
CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG
CCAGCAGCCG CGGTAATACG AAGGGGGCTA GCGTTGCTCG GAATGACTGG

GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG
GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG
GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG
GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG
GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG
GCGTAAAGGG CGTGTAGGCG GTTTGTACAG TCAGATGTGA AATCCCCGGG

CTTAACCTGG GAGCTGCATT TGATACGTGC AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTGG GAGCTGCATT TGATACGTGC AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTGG GAGCTGCATT TGATACGTGC AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTGG GAGCTGCATT TAATACGTGC AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTGG GAGCTGCATT TAATACGTGC AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTGG GAGCTGCATT TAAGACGTAT AGACTAGAGT GTGAGAGAGG
CTTAACCTCG GAATTGCCTT CAAGACTGGT CAGCTAGAGT GTGGAAGAGG

GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC
GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC
GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC
GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC
GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC
GTTGTGGAAT TCCCAGTGTA GAGGTGAAAT TCCTAGATAT TGGGAAGAAC

ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT GACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT GACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA
ACCGGTGGCG AAGGCGGCAA CCTGGCTCAT TACTGACGCT GAGGCGCGAA

AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC
AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC

GATGTGTGCT GGATGTTGGG CAACTTAGTT GTTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG CAACTTAGTT GTTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG TAACTTAGTT ATTCACTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG TAACTTAGTT ACTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG TAACTTAGTT ACTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG TAACTTAGTT ACTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG TAACTTAGTT ACTCAGTGTG GTAGCTAACG
GATGTGTGCT GGATGTTGGG CCGTT--GCC GCTCAGTGTG GAAGTTAACG

CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG
CGATAAGCAC ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG

AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC


```

-----
-----
-----AAC
-----AAC
-----
-----
GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCTAGAGTT TGTGGGCTTT GCCTGCTATC

ATAACACCTG TGAACCTGTAA GATGCTTAGT G-----TTTC GGCACGGCAT
ATAACACCTG TGAACCTGTAA GATGCTTAGT G-----TTTC GGCACGGCAT
ATAACACCCG TGAACCTGTAA GATGCTTAGT G-----TTTC GGCACGGCAT
-TAACACCTG TGAACCTGTAA GACGTATGAT GAGGTCTTTG GCCAAGTCAT
-TAACACCTG TGAACCTGTAA GACGTATGAT GAGGTCTTTG GCCAAGTCAT
ATAACACCTG TGAACCTGTAA GATGCTTAGT G-----TTTC GGCACGGCAT
-TTAC-TCTG TGCACCTTTT AAAACGGTTT GGCTCTTTT AGAGTCTTGC
-TTAC-CCTG TGCACCTATAT AGG----- -TTGTTT ACAACCTTTT
-TAAC-CCTG TGCATCTGTT AATGGGAATA GTAGCTCTTC GGAGTGAACC
-TAAC-CCTG TGCATCTGTT AATGGGACTA GTAGCTCTTC GGAGTGAACC
-TAAC-CCTG TGCATCTGTT ATT--GGTTA GTAGCTCTTC GGAGTGAACC
GCTGG--GCG CTTGCCGTCT GGCCAGAGGT TAACCAAAAC ACAAATATAT
GCTGG--GCG CTTGCCGTCT GGCCAGAGGT TAACCAAAAC ACAAATATAT
GCTGC--GCA AGTG----- -GCCAAAGGT ---CTTAAAC ACAAAGATT
GCTGC--GCA AGTG----- -GCCAAAGGT ---CTTAAAC ACAAAGATT
GGTGG-TGAG CCTGGCTTAC TGCCCAAAGG ---TCTAAAC ACATTTTTTT
-----
-----
CTGCGGAAGG ATCATTACTG TGATTATTGT T--CCA-CAC -TGCGTGAGC
CTGCGGAAGG ATCATTACTG TGATTATTGT TTTCCA-CAC -TGCGTGAGC
-----AAGG ATCATTACTG TGAATATAAC TT-CCA-CAC ATGCGTGAS-
-----AAGG ATCATTACTG TGAATATAAC TT-CCA-CAC ATGCGTGAG-
----- -CATCCA-CAC ACG-GTGGCC
TCTTACCCAT GTCTTTTGAG TACTTACGTT TCCTCGGTGG GCTCGCCCGC

C---TGCCCT TT----ATAA ACAATTAATG TAACAAATGT AGTCTTATTA
C---TGCCCT TT----ATAA ACAATTAATG TAACAAATGT AGTCTTATTA
C---TGCCCT TT----ATAA ACAATTAATG TAACAAATGT AGTCTTATTA
CGTCTGCCCA TTTTAAACAA ACAATTAATG TAACAAACGT AGTCTTATTA
CGTCTGCCCA TTTTAAACAA ACAATTAATG TAACAAACGT AGTCTTATTA
C---TGCCCT TT----ATAA ACAATTAATG TAACAAATGT AGTCTTATTA
GTTTTATCAT TTTATAAACT TCAAGTAATG TATGTTTTTT GTTA-AATCT
ATTTT----- ----AAACA CGAGTCTAAG TATGTTCTTT GTTATAAAGA
ACCAT-TCAC TTATAAAACA CAAAGTC--- TATGAATGTA TACAAATTA
GCCAT-TCAC TTATAAA-CA CAAAGTC--- TATGAATGTA TACAAATTA
-CCAT-TCAC TTACAAA-CA CAAAGTC--- TATGAATGTA TACAAATTA
CGATCTATT -TTT-TAAAA ATTAGTCAAG AAGTTTAT-- ---TAAAAA
CGATCTATT -TTT-TAAAA ATTAGTCAAG AAGTTTAT-- ---TAAAAA
ATATCTTTT -TTTACAAAA TTTAGTCAAT GAAGTTTT-- ---AATACTA
ATATCTTTT -TTTACAAAA TTTAGTCAAT GAAGTTTT-- ---AATACTA
TAATGTTAAA ACCTTTAACC AATAGTCATG AAAATTTTTA ACAAATTA
-----
-----
GCACACAACA CACA-AACAC GTATACTAGT TCAG---GAG TTTTTATTT
GCACACAACA CACA-AACAA GTATACAAGT TCAG---AAG TTTTTTTAA
GCACAAAACA CATA-AAC-C GTGAGTAATT TTAGTCGAAA TTGAAAAAC
GCACAAAACA CATA-AAC-C GTGAGTAATT TTAGTCGAAA CTGAAAAAC
GCACAAAACA CATA-AACCA TAATACCAGC TTCA----AA CATACAAAGT
CGATTTGGACA AATTTAAACC CTTTGCAGTT GCAATCAGCG TCTGAAAAAC

TAATC-AATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAATC-AATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAATC-AATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACCTAATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACCTAATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAATC-AATA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACATAAAA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAATATATAA AA-CTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACAAAACA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACAAAACA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACAAAACA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
TAACAAAACA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA
-AATC-TTCA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAACGATGA
-AATC-TTCA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAACGATGA
TAATC-TTCA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAACGATGA
TAATC-TTCA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAACGATGA
AAATC-TTCA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAACGATGA
-----
-----
-----
-----GCATCGATGA
-----GCATCGATGA

```


CCTGTCTGAG CGTCGTTTCC TTCTTGGAGT CTTCTCTTTT GAGAAGATGC
CCTGTCTGAG CGTCGTTTCC TTCTTGGAGT CTTCTCTTTT GAGAAGATGC
CCTGTCTGAG CGTCGTTTCC TTCTTAACAC GT----- ----AGTGT
CCTGTCTGAG CGTCATTTGT ACCTTCAAGC TTG-CTTGG TGTGGGTGT

TG-----CT CTTGTCTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC AATCTTTACA
TG-----CT CTTGTCTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC AATCTTTACA
TG-----CT CTTGTCTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC AATCTTTACA
TG-----CT CTAGT-CTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC CGCTTTTACG
TG-----CT CTAGT-CTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC CGCTTTTACG
TG-----CT CTTGTCTTG GCTTGGAAAT GGGTGCTTGC AATCTTTACA
TGCAAAAGCG GGTGGATTG GTTCTGAGT ATGTGCTGAC TTGCCCTGTCG
TG--AAAATT GTTAGAATTG GATTCTGAGT GT-TGCTATT TTCTCTCTCA
TG--AATCTG GTGGTGCTTG GTTCTGAGC GC-TGCT--- --CTGCTTCG
TG--AATCTG GTGGTGCTTG GTTCTGAGC GC-TGCT--- --CTGCTTCG
TG--AATCTG GTGGTGCTTG GTTCTGAGC GC-TGCT--- --CTGCTTCG
AGTGATACTC TGTAAACTG GGTAACTTG AAATAGTGT- ----GGCAAG
AGTGATACTC TGTAAACTG GGTAACTTG AAATAGTGT- ----GGCAAG
AGTGATACTC TCTT---CTG GGTAACTTG AAATAGTGT- --CTGGCAAG
AGTGATACTC TCTT---CTG GGTAACTTG AAATAGTGT- --CTGGCAAG
AGTGATACTC TGTCAA---G GGTAACTTG AAATAGTGT- --TTAGCAAG
AGTGATACTC TCTT---CTG GGTAACTTG AAATAGTGT- --TTAGCAAG
AGTGATACTC TCTT---TCTG GGTAACTTG AAATAGTGT- ----GGCAAG
CAGAGCTGGC CCGGCCAC-G GCCCGCCGA AAAGAAAC-- ----GAGGCC
CAGAGCTGGC CCGGCCAC-G GCCCGCCGA AAAGAAAC-- ----GAGGCC
CAGAACTGGC CGTGCCACTG GCCCGCCGA AAAGAAAC-- ----GTTGCG
CAGAACTGGC CGTGCCACTG GCCCGCCGA AAAGAAAC-- ----GTTGCG
TAGACATGGC CCGGCCACTG GCCCGCCGA AAAGAAAC-- ----GTTGCG
TTGTCTCGCC TCTGCGTGTG GACTCGCTC AAAACAATTG ----GCAGCC

GAT----- -G---GCTCA CCTTAAAAGA ATTAGCTGGA TCTGT-TCTG
GAT----- -G---GCTCA CCTTAAAAGA ATTAGCTGGA TCTGT-TCTG
GAT----- -G---GCTCA CCTTAAAAGA ATTAGCTGGA TCTGT-TCTG
AGC----- -G---GCTCA CCTTAAATGT ATTAGCTGGA TCTGTCTTTG
AGC----- -G---GCTCA CCTTAAATGT ATTAGCTGGA TCTGTCTTTG
GAT----- -G---GCTCA CCTTAAAAGA ATTAGCTGGA TCTGT-TCTG
AGT----- ---CAGCTTA CTCGAAATGG AGTAGT---G TTCGAGTGTG
GCAGGATGTA AAATAGCTCA TTCGAAATGT ATTAGC---A TCCATCTGC-
GCT----- ---TAGCTCG TTCGTAATGC ATTAGC---A TCCGCAACCG
GCT----- ---TAGCTCG TTCGTAATGC ATTAGC---A TCCGCAACCG
GCT----- ---TAGCTCG TTCGTAATGC ATTAGC---A TCCGCAACCG
AGC----- ----TGCT TTGCGCAGGT CTTCTCTGAA CTAACGTTTC
AGC----- ----TGCT TTGCGCAGGT CTTCTCTGAA CTAACGTTTC
AGT----- ----GTGCT TTTGTGGCCT CTTGACTGAG ATAATGTAT-
AGT----- ----GTGCT TTTGTGGCCT CTTGACTGAG ATAATGTAT-
AGT----- ----GTACT AATAAGCAGT CTT-TCGAA ATAATGTAT-
AGC----- ----TGCT ACGCAGA--T CTCCTCTGAA CTAACGTTTC
AGC----- ----TGCT TTGCAGGA-T CTCCTCTGAA CTAACGTTTC
-AC----- ----GA-GCG AACTAGAA-- -CAGGACGCT TGGGGTCTC-
-AC----- ----GA-GCG AACTAGAA-- -CAGGACGCT TGGGGTCTC-
GAC----- ----GAAGCG AACTACAT-- -CGGGACGCT TTGG-CCGC-
GAC----- ----GAAGCG AACTACAT-- -CGGGACGCT TTGG-CCGC-
GGC----- ----TGAGCG AACTAGAAA- -CAGGACGCT TGG--CCGC-
GGC----- ----GTATTG ATTTCCGAGC GCAGTACATC TCGCGCCTTG

AGAATTGGTT TGACTTGGCG TAATAAGTAT TTCGCTAAGG ACAT--CTTC
AGAATTGGTT TGACTTGGCG TAATAAGTAT TTCGCTAAGG ACAT--CTTC
AGAATTGGTT TGACTTGGCG TAATAAGTAT TTCGCTAAGG ACAT--CTTC
AGACTTGGTT TGACTTGGCG TAATAAGTAT TTCGCTAAGG ACATT-CTTC
AGAATTGGTT TGACTTGGCG TAATAAGTAT TTCGCTAAGG ACAT--CTTC
ATATTCCGAT TGACTCAGTG TAATAGACTA TTCGCTGAGG ACAC---CTC
ATGATCCGAT TGACTCAGTG TAATAGACTA TTCATTGAGG ATTCATTCTC
AACTTCCGAT TGACTTGGCG TAATAGACTA TTCGCTGAGG ATTCTAGTTT
AACTTCCGAT TGACTTGGCG TAATAGACTA TTCGCTGAGG ATTCTAGTTT
AACTTCCGAT TGACTTGGCG TAATAGACTA TTCGCTGAGG ATTCTAGTTT
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TGGGCAGTGG A---GGGCGC GTCTGGCGTT
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TGGGCAGTGG A---GGGCGC GTCTGGCGTT
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TAGCAGCTCA A---CTGTCC CTTTGGCATA
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TAGCAGCTCA A---TTGTCC CTTTGGCATA
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TATCAGCTAG G---CAGGTT TAGAAGTATT
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TGGGCAGTGG G---CAGTTG AAGCATGGCT
TAGGTTCTAC CAATTCGTTA TGGACAGTGT GTG-CTGAAC GCATGGCTTT
-----CGAGC ACTA----- -----TGA GCTCGACCTC
-----CGAGC ACTA----- -----TAA GCTCGACCTC
-----CGAGC GAAAATATAT AT--CATTGA GCTCGACCTC
-----CGAGC GAAAATATAT AT--CATTGA GCTCGACCTC

Παράρτημα 3. Φυλογενετικές αποστάσεις των στελεχών ζυμών.

Ζύμη	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	0.0																								
2	0.0	0.0																							
3	0.2	0.2	0.0																						
4	16.7	16.7	16.9	0.0																					
5	16.7	16.7	16.9	0.0	0.0																				
6	0.3	0.3	0.5	16.7	16.7	0.0																			
7	45.1	45.1	45.4	49.9	49.9	41.3	0.0																		
8	47.5	47.4	47.7	49.7	49.7	47.6	27.1	0.0																	
9	45.3	45.3	45.6	50.9	50.9	41.4	32.3	36.2	0.0																
10	44.9	44.9	45.2	50.0	50.0	41.1	32.9	36.7	0.9	0.0															
11	44.7	44.7	45.0	49.3	49.3	40.9	32.9	37.2	3.1	2.8	0.0														
12	86.2	86.2	85.5	81.0	81.0	89.5	86.1	78.6	89.3	90.8	92.2	0.0													
13	86.2	86.2	85.5	81.0	81.0	89.5	86.1	78.6	89.3	90.8	92.2	0.0	0.0												
14	76.3	76.3	75.7	75.8	75.8	80.6	80.4	69.8	78.0	80.0	81.7	19.2	19.1	0.0											
15	76.9	76.9	76.3	76.4	76.4	81.3	81.0	69.2	78.6	80.6	82.4	19.2	19.1	0.1	0.0										
16	79.3	79.2	79.2	79.2	79.2	82.3	79.2	73.4	81.6	83.6	85.5	27.6	27.6	24.6	24.8	0.0									
17	76.6	76.6	76.6	64.4	64.4	76.6	73.0	78.2	76.8	78.5	78.1	14.6	14.6	24.2	24.6	23.8	0.0								
18	74.5	74.5	74.5	61.9	61.9	74.5	74.6	78.2	78.0	76.4	77.7	12.8	12.8	20.7	21.0	26.6	10.7	0.0							
19	80.2	80.2	80.2	83.7	83.7	80.2	86.1	89.8	83.1	82.1	84.3	80.6	80.6	80.0	80.0	86.1	69.7	67.0	0.0						
20	79.3	79.3	79.3	83.5	83.5	79.3	87.9	90.4	84.1	83.1	85.3	81.4	81.4	79.0	79.0	87.8	69.6	66.0	2.5	0.0					
21	78.1	78.1	78.1	79.7	79.7	78.1	75.7	83.3	79.8	79.5	79.6	75.9	75.9	74.4	75.1	79.9	72.0	71.6	17.9	17.8	0.0				
22	79.9	79.9	79.9	81.6	81.6	79.9	76.7	85.3	81.5	81.2	81.3	77.8	77.8	76.1	76.8	81.6	73.9	73.5	18.5	18.4	0.4	0.0			
23	75.2	75.2	75.2	78.3	78.3	75.2	74.8	76.0	71.3	70.3	71.2	68.5	68.5	67.7	67.0	72.6	65.9	62.7	20.9	20.6	20.0	20.6	0.0		
24	89.5	89.5	89.5	90.7	90.7	89.5	94.2	95.0	85.4	85.2	87.7	87.2	87.2	79.8	79.2	83.4	74.1	65.6	53.6	54.4	50.6	51.4	41.8	0.0	

Επεξήγηση: 1. Στέλεχος ζύμης GAR-15: 2. Στέλεχος ζύμης GOLD-13: 3. Στέλεχος ζύμης GAR-20: 4. *Sporobolomyces roseus*, AJ853460: 5. *Cryptococcus terreus*, AF444319: 6. *Filobasidium capsuligenum*, AF444382: 7. *Rhodotorula hylophila*, AF444622: 8. Στέλεχος ζύμης FWW-9: 9. *Rhodosporidium bahjevae*, AF444636: 10. *Rhodotorula glutinis*, AF444539: 11. *Rhodosporidium kratochvilovae*, AF444458: 12. Στέλεχος ζύμης GAR-21: 13. Στέλεχος ζύμης GAR-22: 14. *Williopsis beijerinckii*, AY563510: 15. *Williopsis saturnus*, AY563508: 16. *Pichia anomala*, AY046221: 17. *Pichia veronae*, AF335966: 18. *Pichia fabianii*, AF335967: 19. *Candida ethanolica*, AY790538: 20. *Pichia deserticola*, AY790538: 21. Στέλεχος ζύμης GAR-17: 22. Στέλεχος ζύμης GAR-12B: 23. *Pichia membranifaciens*, AY684146: 24. *Ascochyta lentis*, AY131201.

Παράρτημα 4. Φυλογενετικές ομοιότητες (%) του στελέχους βακτηρίου *FWW-12A*, με είδη του γένους *Acetobacter*.

Βακτήριο	<i>A. tropicalis</i>	FWW-12A	<i>A. indonesiensis</i>	<i>A. cerevisiae</i>	<i>A. malorum</i>	<i>A. orleasnensis</i>	<i>O. sagaranensis</i>
<i>A. tropicalis</i>	-	99.6	99.0	99.0	98.8	98.7	86.0
FWW-12A		-	98.6	98.5	98.4	98.3	85.5
<i>A. indonesiensis</i>			-	99.0	98.8	98.7	86.0
<i>A. cerevisiae</i>				-	99.9	99.7	86.0
<i>A. malorum</i>					-	99.7	86.1
<i>A. orleasnensis</i>						-	86.0
<i>O. sagaranensis</i>							-

Επεξήγηση: *A. tropicalis*: *Acetobacter tropicalis* AJ419842; Στέλεχος βακτηρίου FWW-12A: *A. indonesiensis*, *Acetobacter indonesiensis* AJ419841; *A. cerevisiae*, *Acetobacter cerevisiae* AJ419843; *A. malorum*, *Acetobacter malorum* AJ419844; *A. orleasnensis*, *Acetobacter orleasnensis* AJ419845; *O. sagaranensis*, *Oleomonas sagaranensis* D45202.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Albuquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia, D. and Gegarra, J. (2003). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* **91**, 195-200.

Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. (1979). *Introductory Mycology*. Wiley, NY.

Ammar, E. and Ben Rouina, B. (1999). Potential horticultural utilization of olive oil processing waste water. *Acta Hortoculturae* **474**, 741-744.

Asehraou, A., Mohieddine, S., Faid, M. and Serhrouchni, M. (1997). Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and moulds in fermenting green olives. *Grasas y Aceites* **48**, 68-73.

Asehraou, A., Peres, C., Brito, D., Faid, M. and Serhrouchni, M. (2000). Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y Aceites* **51**, 225-229.

Bayer, R. J., Soltis, D. E. and Soltis, P. S. (1996). Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *American Journal of Botany* **83**, 516-527.

Beijerinck, M. W. (1898). Uber die Arten der Essigbakterien. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II* **4**, 209-216.

Bergman, M. M., Gagnon, D. and Doern, G. V. (1998). *Pichia ohmeri* fungemia. *Diagnosis Microbiology & Infection Diseases* **30**, 229-231.

Bills, G. F., Christensen, M., Powell, M. and Thorn, G. (2003). Saprophytic soil fungi. In: *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Fungi*, G. M. Mueller and G. F. Bills (eds), University of Chicago Press, Chicago.

Bowden, G. H. W. (1993). Serological Identification. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*, M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (eds), pp. 429-462, Academic Press, London.

Broach, J. R., Pringle, J. R. and Jones, E. W. (1991). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genome dynamics, protein synthesis, and energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Campbell, I. and Duffus, J. H. (1988). *Yeast*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W. and Sinisterra, J. V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **14**,111-123.

Chatjipavlidis, I., Antonakou, D., Demou, D., Flouri, F. and Balis, C. (1996). Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plan in messinia, Greece. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 183-187.

Chtourou, M., Ammar, E., Nasri, M. and Medhioub, K. (2004). Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **79**, 869-878.

Ciapini, A., Dei, R. and Sacco, C. (2002). Phenotypic and genotypic characterisation of *Aeromonas* isolates. *Annual Microbiology* **52**, 339-352.

Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. and Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1551-1558.

Cowan, S. T. and Steel, K. L. (1965). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press, London.

de Hoog, G. S. and Yurlowa, N. A. (1994). Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie Leeuwenhoek* **65**, 41-54.

de Hoog, G. S., Gerrits van den Ende, A. H. G., Uijthof, J. M. J. and Untereiner, W. A. (1995). Nutritional physiology of the type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phaeococcomyces*. *Antonie Leeuwenhoek* **68**, 43-49.

De Ley, J. (1970). Re-examination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic. *Journal of Bacteriology*, **101**, 738-754.

De Ley, J. and Frateur, J. (1974). Genus *Acetobacter* Beijerinck 1898. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds), pp. 276-278. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Duran, M. C., Garcia, P., Brenes, M. and Garrido, A. (1994). *Lactobacillus plantarum* survival in aerobic, directly brined olives. *Journal of Food Science* **59**, 1197-1201.

Ercolani, G. L. (1991). Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology* **21**, 35-48.

Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K. and Ettayebi, M. (2003). Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 215-219.

Faid, M., Akhartouf, R. and Asehraou, A. (1994). Microorganisms associated with postharvest green olives deteriorations in Morocco. *Grasas y Aceites* **45**, 313-317.

Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA

D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1351-1371.

Fell, J. W., Statzell, A., Hunter and Phaff, H. J. (1972). *Antonie van Leeuwenhoek* **38**, 96.

Filonow, A. B., Vishniac, H. S., Anderson, J. A. and Janisiewicz, W. J. (1996). Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control* **7**, 212-220.

Fountoulakis, M. S., Dokianakis, S. N., Kornaros., M. E., Aggelis, G. G. and Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **36**, 4735-4744.

Frisvad, J. C., Bridge, P. D. and Arora, D. K. (1998). *Chemical Fungal Taxonomy. Culinary and Hospitality Industry Publication Services, USA.*

Gharsallah, N. (1993). Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeasts. *Environmental Technology* **14**, 391-395.

Giannoutsou, E. P., Meintanis, A. D. and Karagouni, A. D. (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresource Technology* **93**, 301-306.

Gonzalez, D. M., Moreno, E., Sarmiento, Q. J. and Cormenzana, R. A. (1990). Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpehin): inhibitory activity of phenols and fatty acids. *Chemosphere* **20**, 423-432.

Gonzalez, M. J. F., Garcia, P. G., Fernandez, A. G. and Quintana, M. C. D. (1993). Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 226-233.

Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G. (1993). Roots of bacterial systematics. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*, M. Goodfellow and A.G. O'Donnell (eds), pp. 3-54, Academic Press, London.

Hall, L., Wohlfiel, S. and Roberts, G. D. (2003). Experience with the MicroSeq d2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 5099-5102.

Hall, M. N. and Linder, P. (1993). The early days of yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hamamoto, M., Nagahama, T. and Tamura, M. (2002). Systematic study of basidiomycetous yeasts - evaluation of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodospordium*. *FEMS Yeast Research* **2**, 409-413.

Hansen, E. C. (1904). *Zentbl. Bakt. ParasitKde, Abt. II* **12**, 538.

Harrison, F.C. (1927). *Proc. & Trans. Roy. Soc. Canada, ser. 3-21*, 349.

Hillis, D. M. and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**, 411-446.

Jimenez, M., Gonzalez, A. E., Martinez, M. J., Martinez, A. T. and Dale, B. E. (1991). Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzyme-activities. *Mycological Research* **95**, 1299-1302.

Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, H. N. Munro (ed), pp. 21-132, Academic Press, New York.

Kiehn, T. E., Gorey, E., Brown, A. E., Edwards, F. F. and Armstrong, D. (1992). Sepsis due to *Rhodotorula* related to use indwelling central venous catheters. *Clinical Infection Diseases* **14**, 841-846.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.

Krawiec, S. and Riley, M. (1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbiology Reviews* **54**, 502-539.

Kurtzman, K. (1984). *Antonie van Leeuwenhoek* **50**, 213.

Kwon-Chung, K. J. (1977). *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**, 293.

Lamia, A. and Moktar, H. (2003). Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 59-65.

Linares, A., Caba, J. M., Ligeró, F., de la Rubia, T. και Martínez, J. (2001). Eliminación de los efectos fitotóxicos de los residuos de las almazaras por *Phanerochaete flavidobrunnea*. In : *Encuentro Internacional Gestión de Residuos Orgánicos en el Ambito Rural Mediterraneo*, pp. 22-23, de Febrero, Pamplona, España.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains from Indonesian sources, and proposal of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov.. *Journal of General and Applied Microbiology* **47**, 119-132.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov.. *Journal of General and Applied Microbiology* **46**, 147-165.

Logan, N. L. (1994). *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Lopez-Archilla, A. I., Gonzalez, A. E., Terron, M. C. and Amils, R. (2004). Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Canadian Journal of Microbiology* **50**, 923-934.

Mani, K., Peter, G. and Deak, T. (1997). Identification of industrial yeast strains of Indian origin. *Acta Alimentaria* **26**, 393-401.

Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M. and Spencermartins, I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* **14**, 279-283.

McCormack, P. J., Wildman, H. G. and Jeffries, P. (1994). Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeast-like fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 927-931.

Moore, R. T. and Kregerva, N. J. (1972). Ultrastructure of *Filobasidium olive*. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 1949.

Nassereddin, R. A. and Yaman, M. I. (2005). Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. *Journal of Food Protection* **68**, 773-777.

Ntougias, S. (1999). Alkaliphilic bacteria from edible olives. PhD thesis, University of London.

Ntougias, S., Ehaliotis, C., Zervakis, G. I., Katsaris, P. and Papadopoulou, K. (2003). Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology*, T. D. Lekkas (ed), pp. 666-673, University of the Aegean and GlobalNEST, Lemnos, Greece.

Olive, L. S. (1968). *J. Elisha Mitchell scient. Soc.* **84**, 261.

Owen, R. J. and Pitcher, D. (1985). Current methods for DNA. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, M. Goodfellow and D. E. Minnikin (eds), pp. 67-94, Academic Press, London.

Palm, M. E. (2001). Systematics and the impact of invasive fungi on agriculture in the United States. *Bioscience* **51**, 141-147.

Phaff, H. J., Starmer, W. T., Tredick, J. and Miranda, M. (1985). *Pichia deserticola* and *Candida deserticola*, two new species of yeasts associated with necrotic stems of cacti. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 211-216.

Prillinger, H., Lopandic, K., Schweigkofler, W., Deak, R., Aarts, H. J. M., Bauer, R., Sterflinger, K., Kraus, G. F. and Maraz, A. (2002). Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota. *Fungal Allergy and Pathogenicity Chemical Immunology* **81**, 207-295.

Quintana, M. C. D., Garcia, P. G. and Fernandez, A. G. (2003). Characteristics of the growth of table olive yeasts at low temperature. *Grasas y Aceites* **54**, 264-271.

Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Saviozzi, A., Vanni, G. and Scagnozzi, A. (1993). Effect of the disposal of sludge from olive processing on some soil characteristics, laboratory experiments. *Water, Air and Soil Pollution* **69**, 257-264.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.

Sampaio, J. P. (1999). Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Canadian Journal of Microbiology* **45**, 491-512.

Santos, A. and Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology-SGM* **150**, 2527-2534.

Scioli, C. and Vollaro, L. (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* **31**, 2520-2524.

Sokollek, S. J., Hertel, C. and Hammes, W. P. (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 935-940.

Tejada, M., Ruiz, J. L., Donao, M. and Gonzales, J. L. (1997). Evolution de parametros fisicos de un suelo tras la adiccion de distintos tipos de orujos de aceituna. *Actas de Horticultura* **18**, 514-518.

Thorn, R.G. (1997). The fungi in soil. In: *Modern Soil Microbiology*, J. D. van Elsas, J. T. Trevors and E. M. H. Wellington (eds), pp. 63-128, Marcel Dekker, New York.

Untereiner, W. A., Straus, N. A. and Malloch, D. A. (1995). Molecular-morphotaxonomic approach to the systematics of the Herpotrichiellaceae and allied black yeast. *Mycological Research* **99**, 897-913.

Van der Walt, D. B. (1988). *Antonie van Leeuwenhoek* **54**, 548.

Vanechoutte, M. (1996). DNA fingerprinting techniques for microorganisms-a proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology* **6**, 115-142.

Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J. and Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2096-2104.

Weaver, R. W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicsek, D., Smith, S., Tabatabai, A. and Wollum, A. (1994). *Methods of Soil Analysis, part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science of America Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Welthagen, J. J. and Viljoen, B. C. (1999). The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology* **16**, 63-73.

Winker, S. and Woese, C. R. (1995). A definition of the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal-RNA characteristics. *Systematic and Applied Microbiology* **14**, 305-310.

Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V. and Siljak-Yakovlev, S. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organisation among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 969-977.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. and de Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* **22**, 54-57.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κυριτσάκης, Α. (1989). Το Ελαιόλαδο. Αγροτικές Συνεταιριστικές Εκδόσεις ΑΕ, Θεσσαλονίκη.

Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (1995). Σύγχρονη Ελαιοκομία-το Ελαιόλαδο. Αθήνα.

Οιχαλιώτης, Κ. Δ. και Ζερβάκης, Γ. (1999). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δυο φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. *Ελιά και Ελαιόλαδο* **14**, 6-16 και 52-61.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

ClustalW Submission Form: (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

NCBI database: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).