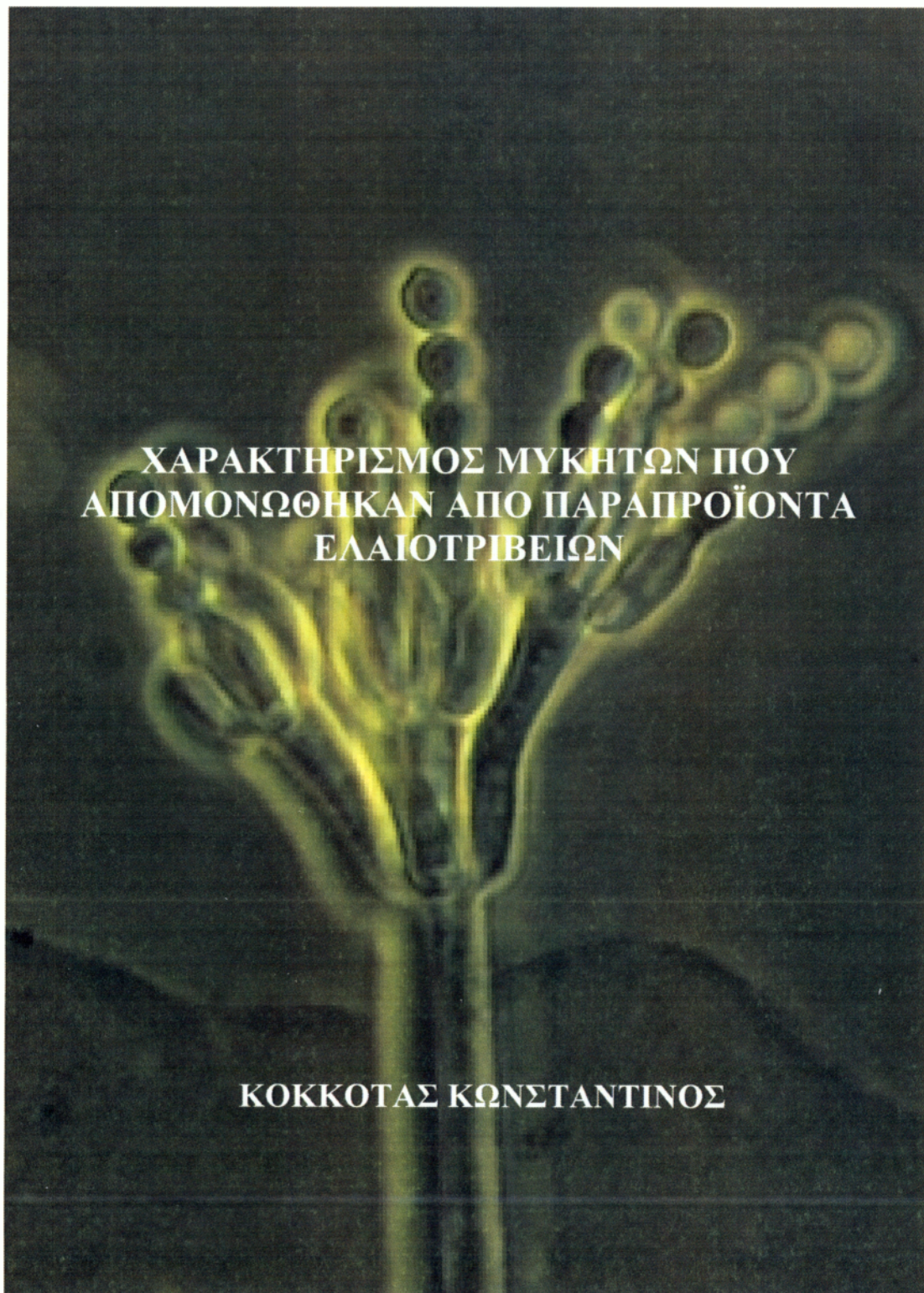


**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ  
Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**



**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ  
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ  
ΕΛΑΙΟΥΤΡΙΒΕΙΩΝ**

**ΚΟΚΚΟΤΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005**

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ  
ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

ΚΟΚΚΟΤΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Εισηγητές: Δρ Ντούγιας Σπυρίδων  
Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005

## *Πρόλογος*

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

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον 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 τη Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα, Καθηγήτρια Εφαρμογών του ΤΕΙ Καλαμάτας, για την βοήθειά της στην διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας στο Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την οικονομική τους υποστήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου, καθώς επίσης αυτούς και αυτές που συνέβαλαν στο να μου μείνουν αυτά τα πέντε χρόνια στην Καλαμάτα αξέχαστα (ξέρουν ποιοι είναι).

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός δεκαεπτά στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν τόσο από υγρά όσο και στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων και παρουσίασαν την ικανότητα να μειώνουν την φυτοτοξικότητα αυτών. Ο χαρακτηρισμός των απομονώσεων 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 στη φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών.

Εκ των δεκαεπτά απομονώσεων, οι FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A και FGAR-23B αποτελούσαν μέλη του γένους *Penicillium* και παρουσίασαν υψηλή φυλογενετική ομοιότητα με στελέχη των ειδών *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. commune*, *P. griseoroseum* και *P. solitum* var. *curtosum*. Οι απομονώσεις FFWW-12B, Fgold-17 και Fgold-20 άνηκαν επίσης στο γένος *Penicillium*, παρουσιάζοντας 99.8% και 99.3% φυλογενετική ομοιότητα με τα στελέχη *Penicillium roqueforti* IasaF09 και *Penicillium carneum* αντίστοιχα. Οι απομονώσεις FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25 συσχετίζονταν φυλογενετικά με τα γένη *Geotrichum* και *Dipodascus*, παρουσιάζοντας 92.6-97.6% ομοιότητα με στελέχη των γενών αυτών. Η απομόνωση FGAR-25 εμφάνισε ίσες φυλογενετικές αποστάσεις (99.8% ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2) με το στέλεχος *its297* και τα είδη *Cladosporium cladosporioides* ATCC 58991, *C. tenuissimum* ATCC 38027, *C. oxysporum* CBS 125.80, *C. cucumerinum* ATCC 38727 και *Mycosphaerella tassiana* ATCC 60569. Επιπλέον, η απομόνωση Fgold-25 παρουσίασε 99.5% ομοιότητα με τα στελέχη *Stereum hirsutum* FPL 8805 και *Xylobolus annosus* CTM10313.

Οι πλησιέστεροι φυλογενετικά μικροοργανισμοί των στελεχών της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι απομονώθηκαν από δείγματα φυτικής προελεύσεως, και παράλληλα, μερικοί από αυτούς, είχαν την ικανότητα να αποικοδομούν φαινολικά και άλλα αρωματικά συστατικά.

## Summary

The aim of this project was the molecular classification of seventeen fungal strains which were isolated from olive mill wastewater and alpeorujo (a solid olive-processing waste) samples and were capable to bioremediate these olive-oil by-product. Molecular characterization was based on PCR-amplification and sequencing of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 DNA region, followed by phylogenetic analysis.

The fungal isolates FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A and FGAR-23B placed in the genus *Penicillium*, showing high phylogenetic similarities with strains of the species *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. commune*, *P. griseoroseum* and *P. solitum var. curtosum*. The isolates FFWW-12B, Fgold-17 and Fgold-20 were also members of the genus *Penicillium*, showing 99.8% and 99.3% similarities with the strains *Penicillium roqueforti* IasaF09 and *Penicillium carneum* respectively. The isolates FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B and FFWW-25 were related with members of the genera *Geotrichum* and *Dipodascus* (similarities between 92.6-97.6%). The isolate FGAR-25 showed equal phylogenetic distances (99.8% similarity) from the strain its297, *Cladosporium cladosporioides* ATCC 58991, *C. tenuissimum* ATCC 38027, *C. oxysporum* CBS 125.80, *C. cucumerinum* ATCC 38727 and *Mycosphaerella tassiana* ATCC 60569. Moreover, isolate Fgold-25 showed 99.5% similarities with the strains *Stereum hirsutum* FPL 8805 and *Xylobolus annosus* CTM10313.

The closest phylogenetically relatives of the isolates from the present study were of vegetative origin. A few relatives were also involved in the degradation of polyphenols and other toxic aromatic compounds.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool.

**BOD:** Biological Oxygen Demand (βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο).

**bp:** βάσεις DNA.

**COD:** Chemical Oxygen Demand (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο).

**CTAB:** Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide.

**PCR:** αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

**rpm:** περιστροφή ανά λεπτό.

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulphate.

**TAE:** Tris-HCl/Acetic acid/EDTA.

**TE:** Tris-HCl/EDTA.

**ΥΑΕ:** υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Πρόλογος</i> .....	I
Περίληψη .....	II
Abstract.....	III
Συνοπτομογραφίες.....	IV
Περιεχόμενα .....	V
Περιεχόμενα Πινάκων .....	VIII
Περιεχόμενα Εικόνων.....	VIII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ .....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Γενικά στοιχεία .....	1
1.1.1. Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου. ....	1
1.1.2. Τύποι ελαιοτριβείων .....	2
1.1.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά-Δράσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων .....	2
1.1.4. Τρόποι διαχείρισης αποβλήτων ελαιοτριβείων .....	3
1.2. Μορφολογία μυκήτων .....	4
1.2.1. Είδη Σπορίων .....	6
1.3. Το Βασίλειο των Μυκήτων (Fungi).....	6
1.4. Ονοματολογία μυκήτων .....	7
1.5. Αναγνώριση-ταξινόμηση στελεχών μυκήτων .....	7
1.5.1. Μορφολογία.....	8
1.5.2. Φυλογενετική ανάλυση-Μοριακές τεχνικές .....	8
1.5.3. Ταξινόμηση-Φυσιολογία και βιοχημεία ειδών .....	11
1.5.4. Μελέτη μεμβρανών και κυτταρικών τοιχωμάτων .....	12
1.6. Συστηματική κατάταξη μυκήτων .....	13
1.6.1. Φύλο Ascomycota .....	13
1.6.2. Φύλο Basidiomycota.....	14
1.6.3. Φύλο Chitridomycota .....	15
1.6.4. Φύλο Glomeromycota .....	16
1.6.5. Φύλο Zygomycota.....	16

1.7. Γένος <i>Cladosporium</i> Link.....	17
1.8. Γένος <i>Geotrichum</i> Link.....	18
1.9. Γένος <i>Penicillium</i> Link.....	18
1.10. Γένος <i>Stereum</i> Pers.....	19
1.11. Στοιχεία βιοπληροφορικής.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Στελέχη μυκήτων .....	21
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	22
2.2.1. Θρεπτικό υπόστρωμα με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (YAE).....	22
2.2.2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος LB.....	23
2.3. Εξαγωγή χρωμοσωμικού DNA μυκήτων .....	24
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.5. Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης .....	27
2.6. Εισαγωγή DNA (προϊόν PCR) σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation).....	28
2.7. Γενετικός μετασχηματισμός κυττάρων (transformation).....	29
2.8. Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA.....	30
2.9. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάση περιορισμού.....	32
2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	33
2.11. Εύρεση της αλληλουχίας βάσεων τμημάτων DNA.....	35
2.12. Φυλογενετική ανάλυση .....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ.....	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
3.1. Χαρακτηρισμός μυκήτων με μοριακές μεθόδους .....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
4.1. Συζήτηση.....	40
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	44
<u>Παράρτημα 1. Αλληλουχίες βάσεων των στελεχών μυκήτων.....</u>	<u>44</u>



<u>Παράρτημα 2.</u> Σύγκριση των αλληλουχιών βάσεων των απομονώσεων μυκήτων.....	47
<u>Παράρτημα 3.</u> Φυλογενετικές ομοιότητες (%) των στελεχών FGAR-1, FGAR-2, FGAR-23A, FGAR-23B, FFWW-3, FFWW-12B, FFWW-14, FFWW-15, Fgold-17 και Fgold-20, με στελέχη του γένους <i>Penicillium</i> .....	54
<u>Παράρτημα 4.</u> Φυλογενετικές ομοιότητες (%) των στελεχών FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25, με στελέχη των γενών <i>Geotrichum</i> και <i>Dipodascus</i> .....	55
<u>Παράρτημα 5.</u> Φυλογενετικές ομοιότητες (%) του στελέχους FGAR-25, με στελέχη των γενών <i>Cladosporium</i> και <i>Mycosphaerella</i> .....	56
<u>Παράρτημα 6.</u> Φυλογενετικές ομοιότητες (%) του στελέχους Fgold-25, με στελέχη των γενών <i>Stereum</i> και <i>Xylobolus</i> .....	57
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	58
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	69
Διαδικτυακές Διευθύνσεις.....	69

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Προέλευση δειγμάτων και ονόματα στελεχών μυκήτων.....	21
Πίνακας 4.1. Φυλογενετική συσχέτιση των στελεχών μυκήτων .....	43

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εξώφυλλο.** Μορφολογία στελέχους του γένους *Penicillium*.

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

**Εικόνα 3.1.** Χρωμοσωμικό DNA στελεχών μυκήτων. Από αριστερά προς τα δεξιά: Α) δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A, FGAR-23B, FGAR-25 και FGold-25, και Β) δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B, FFWW-25, FFWW-12B, Fgold-17 και Fgold-20. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δύο φωτογραφιών με το πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0.....

**Εικόνα 3.2.** Προϊόντα ενίσχυσης του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 στελεχών μυκήτων. Από αριστερά προς τα δεξιά: Α) FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A, FGAR-23B, FGAR-25, FGold-25, μάρτυρας-τυφλό και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), και Β) FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B, FFWW-25, FFWW-12B, Fgold-17, Fgold-20, μάρτυρας-τυφλό και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp). Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δύο φωτογραφιών με το πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0.....

**Εικόνα 3.3.** Δενδρόγραμμα των φυλογενετικών θέσεων των απομονώσεων μυκήτων 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 ανάλυσης 100 δένδρων, λαμβάνοντας υπόψη προσθήκες και διαγραφές βάσεων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο.....

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Γενικά στοιχεία

Στην λεκάνη της Μεσογείου παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό ελαιολάδου παγκοσμίως, περίπου 2.5 εκατομμύρια τόνοι το χρόνο (Food and Agricultural Organization, 2003), με πρώτη ελαιοπαραγωγό χώρα την Ισπανία, ακολουθούμενη από την Ιταλία και την Ελλάδα. Στις χώρες γύρω απ' αυτήν, η καλλιέργεια της ελιάς (*Olea europaea L.*) αποτελεί παράδοση, με τις βρώσιμες ελιές και το ελαιόλαδο να συνιστούν βασικό καταναλωτικό αγαθό και στοιχείο υγιεινής διατροφής, εξαιτίας των άριστων οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών και των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν. Ο καρπός της ελιάς αποτελείται από την σάρκα (70 – 90%) και τον πυρήνα (10 – 30%), με τη σάρκα του ελαιοκάρπου να αποτελείται κύρια από νερό (70%) και έλαια (10%-20%) (Alburquerque *et al.*, 2003).

#### 1.1.1. Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου

Για την παραγωγή του ελαιολάδου στα παλιότερα χρόνια χρησιμοποιούνταν οι παραδοσιακοί πέτρινοι μύλοι που πλέον είναι σπάνιοι, ενώ σήμερα, με την πρόοδο της τεχνολογίας, η παραγωγή γίνεται με την χρήση φυγοκεντριτών. Αυτοί διαχωρίζουν το έλαιο, από την υδάτινη φάση και το στερεό υπόλειμμα με μια συνεχόμενη διαδικασία. Αρχικά ο ελαιόκαρπος οδηγείται στο ελαιουργείο σε σάκους των 50 ή 80 kg όπου ζυγίζεται και μεταφέρεται στο αποφυλλωτήριο με τη βοήθεια αναβατορίου ή μεταφορικής ταινίας. Εκεί γίνεται απομάκρυνση των ξένων υλών (κυρίως φύλλα) με τη χρήση κόσκινου ή δυνατού ρεύματος αέρα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύσιμο του ελαιοκάρπου όπου γίνεται απομάκρυνση των προσκολλημένων ξένων υλών, όπως λάσπη και χώμα, που δεν απομακρύνθηκαν από το αποφυλλωτήριο. Έπειτα ο καρπός προωθείται στον μεταλλικό σπαστήρα όπου αλέθεται κατά την πτώση του από την χοάνη τροφοδοσίας. Κατόπιν πραγματοποιείται μάλαξη της ελαιοζύμης σε ειδικούς μαλακτήρες με σκοπό την ευκολότερη συνένωση των ελαιοσταγονιδίων. Ο διαχωρισμός της ελαιοζύμης, που

οφείλεται στη διαφορά του ειδικού βάρους του ελαιολάδου, του νερού και των στερεών συστατικών, λαμβάνει χώρα στον φυγοκεντριτή-decanter (Κυριτσάκης, 1989).

### **1.1.2. Τύποι ελαιοτριβείων**

Σήμερα υπάρχουν κυρίως δύο τύποι ελαιοτριβείων, στα οποία χρησιμοποιούνται τριών (three – phase centrifugation system) και δύο φάσεων (two - phase centrifugation system) φυγοκεντρικά συστήματα. Το πλέον διαδεδομένο σύστημα είναι ο φυγοκεντριτής τριών φάσεων που εμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του '70. Στο σύστημα αυτό, η ελαιοζύμη, αφού αραιωθεί με νερό, διοχετεύεται σε ένα οριζόντιας διάταξης φυγοκεντριτή ο οποίος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό του ελαίου από τον ελαιοπυρήνα και το νερό, ενώ ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντριση του ελαίου για την παραγωγή καθαρού ελαιολάδου (Borja *et al.*, 1995). Το σύστημα διαχωρισμού δύο φάσεων εμφανίστηκε στις αρχές του '90, όπου με το διαχωρισμό του ελαιόλαδου έχουμε απομάκρυνση των υγρών του καρπού μαζί με τον ελαιοπυρήνα (Albuquerque *et al.*, 2003). Στον φυγοκεντριτή τριών φάσεων έχουμε την παραγωγή δύο υποπροϊόντων. Το πρώτο είναι ο πυρήνας από τον οποίο εξάγεται το πυρηνέλαιο και παραλαμβάνεται το πυρηνόξυλο, και το δεύτερο, ένα μίγμα που αποτελείται από μια ημίρευστη μάζα ονομαζόμενη 'orujo' και μια υδάτινη, που μαζί συνιστούν τα 'υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου' (ΥΑΕ) και στη ξένη βιβλιογραφία αναφέρονται ως OMW (Olive Mill Wastewater). Στον φυγοκεντριτή δύο φάσεων έχουμε την παραγωγή ενός ημιστερεού, πολύ υδαρούς υλικού που ονομάζεται 'alperujo' ή 'alpeorujo' (Albuquerque *et al.*, 2003).

### **1.1.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά-Δράσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων**

Για κάθε λίτρο ελαιολάδου που παράγεται απελευθερώνονται περίπου 2.5 λίτρα ΥΑΕ. Υπολογίζεται ότι στην Μεσόγειο παράγονται περίπου 30 εκατομμύρια m<sup>3</sup> ΥΑΕ ετησίως. Τα ΥΑΕ αποτελούνται από το παραγόμενο νερό των καρπών, τα νερά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπλύση και την επεξεργασία αυτών και ένα γαλάκτωμα που περιέχει ιστούς σάρκας και έλαια (Lamia και Moktar, 2002). Έχουν έντονη οσμή, όξινο pH (περίπου 5 με 5.5), υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και επιφανειακή τάση και περιέχουν μεγάλες ποσότητες αιωρούμενων σωματιδίων (Οιχαλιώτης και Ζερβάκης, 2000). Τα κύρια

οργανικά συστατικά που περιέχονται σε αυτά είναι σάκχαρα, νιτρικές ενώσεις, πολυαλκοόλες, πηκτίνες, λίπη, πτητικά οξέα και πολυφαινόλες, οι οποίες λόγω της συγκέντρωσής τους ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) καθιστούν τα ΥΑΕ πολύ τοξικά και με μεγάλη αντιμικροβιακή δράση, με συνέπεια η αποικοδόμησή τους να καθίσταται δυσχερής. Ενδεικτικά, το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD, Biological Oxygen Demand) και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD, Chemical Oxygen Demand) αυτών κυμαίνεται από  $25 - 162 \text{ kg O}_2 / \text{l}$  και  $9 - 100 \text{ kg O}_2 / \text{l}$  αντίστοιχα (Fountoulakis *et al.*, 2002). Το υψηλό οργανικό φορτίο και η υψηλή αλατότητα των ΥΑΕ, καθώς και οι υψηλές συγκεντρώσεις των αποβλήτων αυτών σε φαινολικά και λιπαρά συστατικά, καθιστούν την απ' ευθείας διάθεσή τους στο περιβάλλον επικίνδυνη αφού προκαλούν ρύπανση χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων (Martirani, 1996; Perez, 1992).

Στην εξαγωγή ελαιολάδου με τη χρήση του φυγοκεντρική δύο φάσεων παράγονται  $800 \text{ kg}$  αλρεογιο για κάθε τόνο ελαιοκάρπου που επεξεργάζεται. Το αλρεογιο έχει όξινο pH ( $5.30 \pm 0.20$ ), περιέχει εναπομείναντες ποσότητες ελαίου (2.5-3.5%) και 60-70% νερό (Balis *et al.*, 1996). Τα κύρια συστατικά του είναι παρόμοια με αυτά των ΥΑΕ. Συγκεκριμένα περιέχει σάκχαρα, οργανικά οξέα, πηκτίνες, λιγνίνες, κυτταρίνες, λίπη, πρωτεΐνες, υδατοδιαλυτούς υδρογονάνθρακες και πολυφαινόλες. Το αλρεογιο παρουσιάζει μεγάλη αντιμικροβιακή δράση και φυτοτοξικότητα (Albuquerque *et al.*, 2003).

#### 1.1.4. Τρόποι διαχείρισης αποβλήτων ελαιοτριβείων

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την μείωση των ανεπιθύμητων συνεπειών των αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση τόσο βιολογικών όσο και φυσικοχημικών μεθόδων. Φυσικοχημικές μέθοδοι όπως η εξάτμιση και η χρήση μεμβρανών (Boari *et al.*, 1984; Bradley *et al.*, 1980), η εξουδετέρωση με προσθήκη  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Muezzinoglou και Uslu, 1986) και η οξείδωση με  $\text{O}_3\text{-O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  και αντιδραστήρια Fenton (Filipakopoulou *et al.*, 1999) έχουν μελετηθεί ως προς τη μείωση του υψηλού οργανικού φορτίου των ΥΑΕ, εντούτοις η εφαρμογή των τεχνικών αυτών καθίσταται δυσχερής λόγω του υψηλού τους κόστους. Ο συνδυασμός αερόβιας και αναερόβιας αποικοδόμησης, ως βιολογική μέθοδος έχει μερικώς ερευνηθεί (Boija *et al.*, 1993; Tsonis *et al.*, 1988) παρουσιάζοντας όμως προβλήματα με το βαθμό (αποτελεσματικότητα) απόδοσης των αποβλήτων αυτών. Παρόλα αυτά βρέθηκε ότι ορισμένοι μύκητες λευκής σήψεως είναι ικανοί να αποικοδομήσουν τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται και στους δύο τύπους

αποβλήτων. Τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στα απόβλητα αυτά έχουν παρόμοια δομή με την λιγνίνη με αποτέλεσμα το ένζυμο λακάση που βρίσκεται στους μύκητες λευκής σήψεως και ευθύνεται για την αποικοδόμηση της λιγνίνης, να διασπά και φαινολικές ενώσεις (Sanjust *et al.*, 1991). Το ενζυματικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψεως ενεργοποιείται από την παρουσία ουσιών όπως οι φαινόλες και οι αρωματικές αμίνες που οδηγεί στην μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων (Martirani *et al.*, 1996). Παράδειγμα μύκητα λευκής σήψεως είναι ο βασιδομύκητας *Pleurotus ostreatus* που σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 50% και 100% σε ΥΑΕ προκάλεσε την μείωση του φαινολικού φορτίου κατά 60-75%, εντούτοις δεν συνοδεύτηκε από αντίστοιχη μείωση του COD αφού αυτή ήταν μικρότερη του 10% (Fountoulakis *et al.*, 2002).

## 1.2. Μορφολογία μυκήτων

Το σώμα των μυκήτων όπως και άλλων κατώτερων οργανισμών (φύκη, λειχήνες) δεν διαφοροποιείται σε ρίζες, βλαστούς και φύλλα και λέγεται θαλλός.

Ο θαλλός σχηματίζεται από διακλαδιζόμενα νήματα που λέγονται υφές. Ο θαλλός αποτελούμενος από υφές ονομάζεται μυκήλιο. Η διάμετρος των υφών ποικίλει από 1-100 μm. Οι υφές των περισσότερων μυκήτων που σχηματίζουν μυκήλιο χωρίζονται σε κύτταρα με εγκάρσια διαφράγματα που λέγονται σέπτα (septa). Τα σέπτα φέρουν στο μέσο σπή, μέσω της οποίας επικοινωνούν τα πρωτοπλάσματα γειτονικών κυττάρων. Το μυκήλιο που φέρει σέπτα λέγεται πολυκύτταρο και είναι χαρακτηριστικό των λεγόμενων ανώτερων μυκήτων (Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες) (Alexopoulos *et al.*, 1996). Το μυκήλιο που δεν φέρει σέπτα ονομάζεται κοινोकύτταρο και χαρακτηρίζει ομάδες κατώτερων μυκήτων (Ωομύκητες, Ζυγομύκητες) (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Το μυκήλιο των μυκήτων σχηματίζει επίσης ποικίλες κατασκευές που παίζουν διάφορους ρόλους. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- **Οι πλάκες συγκράτησης ή προσκόλλησης:** Είναι κοντές, παχιές υφές, με τις οποίες το μυκήλιο προσκολλάται στην επιφάνεια του ξενιστή, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διάτρηση της εφυμενίδας για την είσοδο στους ιστούς. Η διάτρηση αυτή γίνεται συνήθως με την βοήθεια λεπτής κατασκευής, της διατρητικής υφής ή ράμφους.
- **Οι μυζητήρες:** Είναι εξειδικευμένα μυκηλιακά εξαρτήματα, τα οποία ορισμένοι μύκητες, που είναι υποχρεωτικά παρασιτικοί (περονόσποροι, ωΐδια κλπ.) εξαπολύουν εντός των κυττάρων του ξενιστή και αντλούν θρεπτικά στοιχεία.

- **Τα ριζοειδή:** Είναι λεπτές, κοντές, ριζοειδούς μορφής εκφύσεις του μυκηλίου που παρατηρούνται σε ορισμένα είδη Ζυγομυκήτων και χρησιμεύουν για τη στήριξή τους στο υπόστρωμα.

- **Τα στολόνια:** Είναι εναέριες οριζόντιες υφές, που συνδέουν δυο ριζοειδή.

- **Οι αναστομώσεις:** Είναι γεφυρώσεις των κορυφών δύο υφών, τα τοιχώματα των οποίων διαλύονται στο σημείο επαφής και επέρχεται επικοινωνία μεταξύ του πρωτοπλάσματός τους. Με τις αναστομώσεις υποβοηθείται η καλύτερη εκμετάλλευση του υποστρώματος, η θεραπεία του μυκηλίου σε περιπτώσεις τραυματισμού, η ανταλλαγή πυρήνων και άλλων οργανιδίων.

- **Οι ψευδοϊστοί:** Είναι σχηματισμοί που συχνά αποκτούν μακροσκοπικές διαστάσεις και χαρακτηρίζονται ως οργανωμένα συμπλέγματα αναστομούμενων υφών. Τέτοιους σχηματισμούς αναπτύσσουν πολλοί Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες τόσο στο βλαστικό όσο και στο αναπαραγωγικό στάδιο του βιολογικού τους κύκλου. Το σύμπλεγμα των υφών που είναι αραιά πλεγμένο, διατηρώντας το αρχικό σχήμα ονομάζεται προσέγγυμα. Αντίθετα ψευδοπαρέγγυμα λέγονται οι υφές που έχουν απολέσει το αρχικό τους σχήμα και την ατομικότητά τους, με συνέπεια τη στενή σύνδεση αυτών.

Διάφορες βλαστικές κατασκευές από ψευδοϊστούς είναι:

- **Τα σκληρώτια:** που συνίστανται από ψευδοπαρέγγυμα εξωτερικά και προσέγγυμα εσωτερικά. Έχουν σχήμα που ποικίλει πολύ αλλά συνήθως είναι 1-2 cm. Σκληρώτια παράγουν πολλοί Ασκομύκητες αλλά και Βασιδιομύκητες με σκοπό τον αποθησαυρισμό θρεπτικών ουσιών και την επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

- **Το στρώμα:** Είναι προσεγγυματικός ψευδοϊστός προσκολλημένος πάνω στους ιστούς του φυτού-ξενιστή. Πάνω στο στρώμα αναπτύσσονται συνήθως οι καρποφορίες του μύκητα.

- **Τα ριζόμορφα:** Είναι μυκηλιακοί σχηματισμοί που μοιάζουν με κορδόνια ή ρίζες φυτών. Ανατομικά μοιάζουν με τα σκληρώτια, αλλά ο ρόλος τους είναι κυρίως η εξάπλωση του μύκητα στο χώρο. Ριζόμορφα κάνουν ορισμένοι Βασιδιομύκητες που προσβάλλουν τις ρίζες δένδρων.

Εκτός από τις βλαστικές κατασκευές, όλες οι εγγενείς καρποφορίες των Ασκομυκήτων και Βασιδιομυκήτων συνίσταται από ψευδοϊστούς.

### 1.2.1 Είδη Σπορίων

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν είτε από ένα τμήμα του μυκηλίου τους, είτε μέσω των σπορίων που παράγουν (Alexopoulos *et al.*, 1996). Τα σπόρια μπορεί να είναι προϊόντα αγενούς γενέσεως (αγενή σπόρια) ή προϊόντα σύζευξης (εγγενή σπόρια).

Τα αγενή σπόρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Θαλλοσπόρια: που προέρχονται από την διαμόρφωση ήδη υπάρχοντων τμημάτων του μυκηλίου και διακρίνονται σε:
  - Αρθροσπόρια
  - Βλαστοσπόρια
  - Χλαμυδοσπόρια
2. Κυρίως σπόρια: τα οποία σχηματίζονται μέσα και πάνω σε ειδικές κατασκευές του μυκηλίου και διακρίνονται σε:
  - Σποριαγγειοσπόρια
  - Κονίδια

Τα εγγενή σπόρια διακρίνονται σε:

- α. Ωοσπόρια
- β. Ζυγοσπόρια
- γ. Ασκοσπόρια
- δ. Βασιδιοσπόρια

### 1.3. Το Βασίλειο των Μυκήτων (Fungi)

Το βασίλειο των μυκήτων ανήκει στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι εμφανίστηκαν πριν ένα δισεκατομμύρια χρόνια ταυτόχρονα με το βασίλειο των φυτών (Plantae) και των ζώων (Animalia) (Sogin, 1989; Taylor *et al.*, 1994), παρουσιάζοντας πλησιέστερη φυλογενετική σχέση με το βασίλειο των ζώων παρά με των φυτών (Nikoh *et al.*, 1994). Αναλύσεις ακολουθίας βάσεων DNA έδειξαν ότι τα τρία βασίλεια, πριν ένα δισεκατομμύριο χρόνια, προήλθαν από τον ίδιο πρόγονο, που εξελίχθηκε (Doolittle *et al.*, 1996), καταρρίπτοντας έτσι την θεωρία ότι οι μύκητες προήλθαν από τα άλγη (Hawksworth *et al.*, 1995). Τα τρία από τα πέντε φύλα μυκήτων, οι Ζυγομύκητες (Zygomycota), οι Ασκομύκητες (Ascomycota) και οι Βασιδιομύκητες (Basidiomycota) βρέθηκε πως προέκυψαν από την εξέλιξη των μελών ενός προσφάτως οριζόμενου φύλου



μυκήτων, τους Χιτριδομύκητες (Chytridomycota) πριν από 550 εκατομμύρια χρόνια. Επιπλέον εκτιμάται πως οι Ασκομύκητες και οι Βασιδιομύκητες διαφοροποιήθηκαν πριν από περίπου 400 εκατομμύρια χρόνια (Berbee *et al.*, 1995). Το φύλο Glomeromycota είναι η πέμπτη διακριτή ομάδα μυκήτων (Palm, 2001; Prillinger *et al.*, 2002).

#### 1.4. Ονοματολογία μυκήτων

Για να αναλυθεί και να αναγνωριστεί τυπικά ένας μικροοργανισμός θα πρέπει να περιγραφεί σύμφωνα με τους διεθνώς αποδεκτούς κανονισμούς και να του δοθεί ένα λατινικό διώνυμο. Οι κανόνες που ελέγχουν την ονοματολογία των οργανισμών διαφέρουν για κάθε βασίλειο και εξαρτώνται από τον τύπο του οργανισμού. Η ονομασία διέπεται από συγκεκριμένους κώδικες που αναφέρονται στα φυτά (Greuter *et al.*, 1994), στα καλλιεργούμενα φυτά (Brickell *et al.*, 1980), στα βακτήρια (Sneath, 1992), και στα ζώα (Ride *et al.*, 1985). Η ονοματολογία των μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών, καθορίζεται από τον Διεθνή Κώδικα της Βοτανικής Ονοματολογίας (ICBN, International Code of Botanic Nomenclature), που έχει ως σκοπό να παρέχει μια σταθερή μέθοδο ονομασίας των υπό ταξινόμηση ομάδων, αποφεύγοντας και απορρίπτοντας τα ονόματα που μπορεί να προκαλέσουν λάθη, ασάφεια ή σύγχυση. Εντούτοις, η αυστηρή του εφαρμογή οδηγεί συχνά σε αλλαγές ονόματος για τυπικούς παρά για επιστημονικούς λόγους (Hawksworth, 1993).

#### 1.5. Αναγνώριση-ταξινόμηση στελεχών μυκήτων

Για τον προσδιορισμό των ειδών των μυκήτων εφαρμόζονται κλασικές τεχνικές μικροβιολογίας και μέθοδοι μοριακής βιολογίας. Οι πιο συνήθεις τρόποι κατάταξης των μικροοργανισμών βασίζονται στη μορφολογία, και στην ύπαρξη χαρακτηριστικών εξωτερικών – επιφανειακών δομών. Διάκριση στελεχών μυκήτων μπορεί να πραγματοποιηθεί βάση της μορφολογίας και φυσιολογίας αυτών, του τυχόν εξειδικευμένου βιότοπου – ξενιστή τους (π.χ. χαρακτηρισμών στελεχών φυτοπαθογόνων μυκήτων) και της φυλογενετικής ανάλυσης αυτών (Davis, 1995). Η φυλογενετική ανάλυση και οι τεχνικές μοριακής βιολογίας (ιδιαίτερα η ανάλυση της ακολουθίας βάσεων του DNA) έχουν βοηθήσει την συστηματική μελέτη των μυκήτων.

Η αναγνώριση και ταξινόμηση των μυκήτων στηρίζεται στη μελέτη της μορφολογίας, της ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες, στον προσδιορισμό των δευτερογενών μεταβολιτών, των κινονών, των λιπαρών οξέων, των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, στη σύνθεση πρωτεϊνών καθώς και στην μελέτη γενετικών χαρακτηριστικών.

### **1.5.1. Μορφολογία**

Η παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των μυκήτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια τόσο κλασικών μικροσκοπικών μεθόδων π.χ. κοινό μικροσκόπιο, όσο και με τη εφαρμογή νέων τεχνικών μικροσκοπίας που προσδίδουν καλύτερη διακριτικότητα, όπως η χρήση μικροσκοπίων αντιθέτου φάσεως και φθορισμού (Romero και Minter, 1988). Η χρώση κυττάρων, η παρατήρηση του σχήματος των υφών, η παρουσία ή απουσία σέπτα, η εγγενής ή αγενής παραγωγή σπορίων, ο τύπος καρποφορίας (π.χ. ασκώματα για τους ασκομύκητες, βασιδιώματα για τους βασιδιομύκητες) αποτελούν βασικά κριτήρια ταξινόμησης (Guarro *et al.*, 1999). Επίσης η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, είτε σαρώσεως (SEM - Scanning Electro Microscopy) είτε διαπερατότητας (TEM – Transmission Electro Microscopy), έχει συμβάλει στη ολοκληρωμένη μελέτη της μορφολογίας των μυκήτων, παρέχοντας την δυνατότητα λεπτομερής παρατήρησης της επιφάνειας των σπορίων και των εγκάρσιων τομών στα κυτταρικά τοιχώματα (Kurtzman και Fell, 1998).

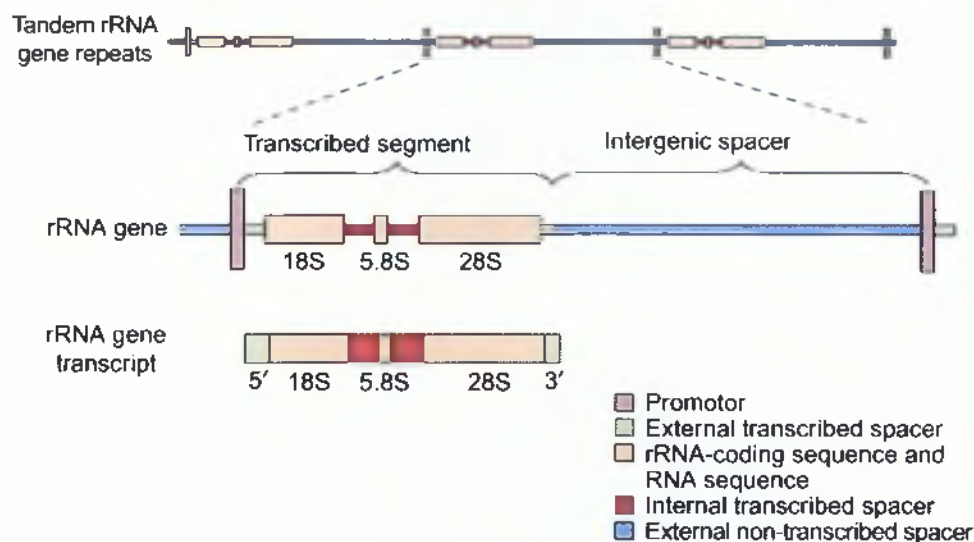
### **1.5.2. Φυλογενετική ανάλυση-Μοριακές τεχνικές**

Η εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας έχει συμβάλει στην λεπτομερή αναγνώριση και ταξινόμησή των μυκήτων. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction) και η επιλογή και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών (primers) για μύκητες, έχουν συντελέσει στην εύρεση της αλληλουχίας βάσεων τμημάτων DNA και στη φυλογενετική ανάλυση και διάκριση των μυκήτων (Golenberg *et al.*, 1990: Sandhu *et al.*, 1995: White *et al.*, 1990). Οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται στη φυλογενετική ανάλυση και εξέλιξη των ειδών, στην ταξινόμηση μικροοργανισμών, στη

διάγνωση και επιδημιολογία, καθώς και στη μελέτη της μικροβιακής οικολογίας περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Μια ομάδα γονιδίων που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φυλογενετική ανάλυση είναι εκείνη που εμπλέκεται στην έκφραση του ριβοσωμικού RNA. Επίσης υπάρχουν άλλα γονίδια, υπεύθυνα για την έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών, τα οποία όμως δεν χρίζουν ευρείας εφαρμογής στη φυλογενετική μελέτη των μικροοργανισμών. Αναφορικά, τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την έκφραση της  $\beta$ -τουβουλίνης, της ακτίνης, της συνθετάσης της χιτίνης, της συνθετάσης του συνένζυμου A, της δεϋδρογονάσης της 3-P-γλυκαλδεϋδης, της υπεροξειδάσης και της 5-P-αποκαρβοξυλάσης της οροτιδίνης (Guarino *et al.*, 1999). Η ύπαρξη γονιδίων rDNA σε κάθε μικροοργανισμό και η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων τους στα χρωμοσώματα αποτελούν τους κύριους λόγους επικράτησης της χρήσης των γονιδίων αυτών στη φυλογενετική μελέτη και εξέλιξη διαφόρων ειδών.

Η ιδιαίτερη μορφολογία και φυσιολογία κάθε μικροβιακού είδους είναι άμεσα συσχετιζόμενη με το γενετικό τους ανάγλυφο και τη χαρακτηριστική αλληλουχία βάσεων των γονιδίων rDNA. Στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια rDNA είναι επαναλαμβανόμενα, και συνήθως ευρίσκονται σε διαφορετικές χρωματοσωμικές θέσεις (Zoldos *et al.*, 1999). Κατά την φυλογενετική μελέτη των μυκήτων (μελέτη των γονιδίων rDNA), μελετάται συνήθως η υποομάδα 5.8S, η 18S-γνωστή ως μικρή υποομάδα (small subunit-SSU)- και η 28S υποομάδα -γνωστή ως μεγάλη υποομάδα (large subunit-LSU) (Krawiec και Riley, 1990). Τα τμήματα μεταξύ 18S και 5.8S rDNA και μεταξύ 5.8S και 28S rDNA παρουσιάζουν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα και είναι γνωστά ως ITS1 (internal transcribed spacer 1) και ITS2 (internal transcribed spacer 2). Τα τμήματα DNA που διαχωρίζουν την μεγάλη και τη μικρή υποομάδα ονομάζονται ETS (external transcribed spacer) και IGS (intergenic spacer), τα οποία επίσης παρουσιάζουν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα (Εικόνα 1.1).



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

Ορισμένα τμήματα DNA είναι συντηρημένα, σε αντίθεση με άλλα τμήματα, τα οποία διαφοροποιούνται από είδος σε είδος (Hills και Dixon, 1991). 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 εύρεση συντηρημένων τμημάτων DNA μυκήτων συντελεί στον χαρακτηρισμό ανώτερων ταξινομικών κατηγοριών, κυρίως σε επίπεδο γένους αφού στελέχη μυκήτων με μεγάλη φυλογενετική ομοιότητα, χαρακτηρίζονται από ελάχιστες έως μηδενικές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία βάσεων των γονιδίων rDNA (Hills και Dixon, 1991).

Η σύγκριση των ακολουθιών των γονιδίων 18S rDNA χαίρει ευρείας εφαρμογής στη φυλογενετική ανάλυση των μυκήτων καθώς και των περισσότερων ζωντανών οργανισμών. Για τους νηματοειδείς και τους μύκητες χρησιμοποιείται συνήθως η μερική ή ολική εύρεση της ακολουθίας βάσεων της μικρής υποομάδας, ενώ περιορισμένος είναι ο αριθμός των μυκήτων στους οποίους έχει εξεταστεί η μεγάλη υποομάδα. Τόσο η μικρή όσο και η μεγάλη υποομάδα δίνουν χρήσιμες ταξινομικές πληροφορίες αφού μικρές διαφορές στην ακολουθία των βάσεων αντιστοιχούν σε σημαντική ταξινομική διαφοροποίηση, επιτρέποντας διάκριση ανώτερων ταξινομικών κατηγοριών (χαρακτηρισμός γενών,

οικογενειών κτλ) (Gueho *et al.*, 1993). Οι περιοχές ITS παρουσιάζουν υψηλή γενετική διαφοροποίηση και χρησιμοποιούνται κυρίως για τον προσδιορισμό κατώτερων ταξινομικών κατηγοριών (διάκριση ειδών ή στελεχών), παρουσιάζοντας ταυτόχρονα στοιχεία μικροεξέλιξης (Graser *et al.*, 1999). Η γενετική απεικόνιση της εξέλιξης των οργανισμών και της φυλογενετικής τους θέσης πραγματοποιείται με τη μορφή δεντρογραμμάτων, η κατασκευή των οποίων στηρίζεται στην εφαρμογή ποικίλων αλγόριθμων.

Μια ακόμα τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση του DNA των μυκήτων είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας γουανίνης - κυτοσίνης (G + C content) του DNA του πυρήνα. Μικρές διαφορές στην περιεκτικότητα G + C δύο οργανισμών μπορούν να οδηγήσουν στην διάκριση ειδών. Η ταυτοποίηση ή μη δύο στενά σχετιζόμενων οργανισμών μπορεί να πραγματοποιηθεί με υβριδισμό του DNA, με συγγενείς μικροοργανισμούς να παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό υβριδοποίησης (Boekhout, 1991: Kurtzman, 1994: Vilgalys, 1998).

### 1.5.3. Ταξινόμηση-Φυσιολογία και βιοχημεία ειδών

Διαφορετικά είδη – στελέχη μυκήτων παρουσιάζουν συνήθως διαφορές στην φυσιολογία και βιοχημεία τους που βοηθούν στην αναγνώριση και ταξινόμηση αυτών (Bridge, 1985: Paterson, 1986: Paterson και Bridge, 1994), όπως π.χ. κατά την συστηματική μελέτη μαύρων ζυμών (De Hoog *et al.*, 1995: Yurlova και De Hoog, 1997). Δόκιμη διαφόρων πηγών άνθρακα προσδίδει πολύτιμες πληροφορίες για το μεταβολισμό και τη διάκριση διαφόρων ειδών μυκήτων (Hawksworth *et al.*, 2003). Η καλλιέργεια των μυκήτων σε διαφορετικό pH και διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος συμβάλουν στην κατηγοριοποίηση τους (Guarro *et al.*, 1999). Οι διαφορές και το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξης των οργανισμών καθώς και ο ρυθμός ανάπτυξης σε προκαθορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, βοηθούν επίσης στην κατηγοριοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών (McGinnis *et al.*, 1986: Millner *et al.*, 1977). Εφαρμογές μεθόδων χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην διάκριση ειδών μυκήτων (Paterson και Bridge, 1994).

Η μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από παράπλευρες βιοχημικές πορείες του μεταβολισμού θρεπτικών συστατικών από μικροοργανισμούς, και εκκρίνονται στο περιβάλλον, μπορεί να συμβάλει στην ταυτοποίηση ή διάκριση ειδών μυκήτων

(Hawksworth *et al.*, 1995). Συνήθως, οι δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν σε συγκεκριμένες κατηγορίες χημικών ενώσεων όπως είναι τα στεροειδή, τα αλκαλοειδή, τα κυκλοπεπτιδία και οι μυκοτοξίνες. Η ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών με τεχνικές χρωματογραφίας χρησιμοποιείται ευρύτατα στο γρήγορο χαρακτηρισμό στελεχών μικροοργανισμών. Μολονότι η παραγωγή των ουσιών αυτών επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, η χρήση τους στην χημειοταξινόμηση μελών μυκήτων, π.χ. διάκριση ειδών των τάξεων Eurotiales και Xylariales, την καθιστούν αποτελεσματική για τον προσδιορισμό διαφορετικών ειδών κατηγοριών μυκήτων (Frisvad, 1994: Whalley και Edwards, 1995).

Για τον χαρακτηρισμό των διαφόρων ειδών μυκήτων χρησιμοποιούνται επίσης μέθοδοι όπως η μελέτη των ισοενζύμων και η χρήση ανοσολογικών τεχνικών. Η πρώτη θεωρείται ως μια οικονομική και εύχρηστη τεχνική για την διάκριση μεγάλου αριθμού μυκητιακών στελεχών ενώ η δεύτερη, αν και πιο δαπανηρή, είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη (Kohn, 1992). Η δοκιμή διαφόρων αντιβιοτικών επίσης μας δίνει χαρακτηριστικές πληροφορίες για κάθε μικροοργανισμό, καθώς και ταξινομικές διαφορές (Lesova και Sturdikova, 2000).

#### **1.5.4. Μελέτη μεμβρανών και κυτταρικών τοιχωμάτων**

Η παρουσία διαφόρων τύπων λιπαρών οξέων καθώς και η εύρεση της σχετικής τους συγκέντρωσης έχουν βοηθήσει σημαντικά στην ταξινόμηση των μυκήτων. Η τεχνική αυτή, αν και χρησιμοποιείται ευρέως στην συστηματική των βακτηρίων (Moss, 1981: Veys *et al.*, 1989) επειδή παράγουν περισσότερα διαφορετικά λιπαρά οξέα από τους μύκητες (Lechevalier και Lechevalier, 1988), χαίρει αυξανόμενης αποδοχής στην αναγνώριση και διαφοροποίηση των μυκήτων. Για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών χρησιμοποιούνται ο αέριος χρωματογράφος και ο φασματογράφος μάζας. Επίσης, στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αέριας χρωματογραφίας έχει προσφέρει σημαντική βοήθεια στην μελέτη των λιπαρών οξέων πολυάριθμων ζυγομυκήτων και βασιδομυκήτων. Στις τεχνικές αυτές πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην σταθερότητα των συνθηκών καλλιέργειας και θερμοκρασίας διότι τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα επιρροής των αποτελεσμάτων (Blomquist *et al.*, 1992: Stahl και Klug, 1996).

Για τον χαρακτηρισμό στελεχών μυκήτων συχνά πραγματοποιείται η εύρεση κινονών, που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφοριλίωση, και συμμετέχουν ως

μεταφορείς ηλεκτρονίων κατά την αναπνοή. Βάσει του αριθμού ισοπρενίων που είναι προσκολλημένα σε κάθε μόριο κινόνης είναι εφικτός ο χαρακτηρισμός γενών και χαμηλότερων ταξινομικών κατηγοριών μυκήτων (Yaguchi *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1989).

Οι διαφορές που έχουν βρεθεί στην σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό και την ταξινόμησή τους. Οι Ωομύκητες μπορούν να διαχωριστούν από τους Βασιδομύκητες και τους Ασκομύκητες βάση του γεγονότος ότι οι πρώτοι περιέχουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα κυτταρίνη ενώ οι δεύτεροι χιτίνη και γλυκάνη. Στην περίπτωση των Ζυγομυκήτων συναντάμε χιτοσάνη και πολυγλουκορονικό οξύ. Επίσης, η μελέτη βιοχημικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, όπως π.χ. σάκχαρα και αμινοξέα, έχει συμβάλει στην συστηματική κατάταξη των μυκήτων (Bartnicki και Garcia, 1987).

## **1.6. Συστηματική κατάταξη μυκήτων**

Το 1988, μερικοί από τους 'κατώτερους μύκητες' (lower fungi) διαχωρίστηκαν και κατατάχτηκαν μεταξύ των Βασιλείων Protozoa και Chromista. Τα μέλη του φύλου Myxomycota και του φύλου Plasmodiophoromycota κατατάχτηκαν στο Βασίλειο των πρωτόζωων. Τα μέλη της κλάσεως 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, και Zygomycota (Palm, 2001; Prillinger *et al.*, 2002: NCBI database).

### **1.6.1. Φύλο Ascomycota**

Οι Ασκομύκητες αποτελούν το μεγαλύτερο σε αριθμό στελεχών φύλο του βασιλείου των Μυκήτων. Το φύλο Ascomycota περιλαμβάνει τις κλάσεις Ascomycetes, Neolectomycetes, Pneumocystidomycetes, Saccharomycetes, Schizosaccharomycetes, Sordariomycetes και Taphrinomycetes (Eriksson *et al.*, 2003: Index Fungorum).

Βασικό χαρακτηριστικό των περισσότερων μελών του φύλου αυτού, είναι η παρουσία ασκού. Σε περίπτωση απουσίας του χαρακτηριστικού αυτού μπορούν αρκετά συχνά να αναγνωριστούν από το τις υφές τους, οι οποίες αποτελούνται από τοίχωμα δύο στρωμάτων, και περιέχουν πρωτογενή σέπτα σε συμμετρικά διάκενα πάνω στην επιφάνειά τους (Hawksworth *et al.*, 1995).

Οι Ασκομύκητες, κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό, σχηματίζουν κονίδια που δεν περιβάλλονται από δευτερογενές τοίχωμα. Τα κονίδια αυτά προέρχονται από την άκρη σποριογενούς περιοχής ή κυττάρου και στην συνέχεια απελευθερώνονται για να διασκορπιστούν στο περιβάλλον. Στον εγγενή πολλαπλασιασμό, σχηματίζονται μέσα στον ασκό σπόρια, συνήθως οκτώ, που καλούνται ασκοσπόρια. Αυτά, απελευθερώνονται στο περιβάλλον έπειτα από το άνοιγμα ή το σπάσιμο του τοιχώματος των ασκών (Alexopoulos *et al.*, 1996: Ingold και Hudson, 1993).

Μεγάλος αριθμός στελεχών του φύλου Ascomycota συναντάται σε χέρσο περιβάλλον ενώ λίγα είναι τα στελέχη που συναντώνται σε υδάτινο. Πολλά είδη Ασκομυκήτων χρίζουν εξαιρετικής σημασίας καθότι ως φυτοπαθογόνα και παθογόνα ζώων, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες. Επιπλέον μερικά στελέχη, λόγω του ότι παράγουν διάφορους μεταβολίτες, έχουν εμπορική σημασία και χρησιμοποιούνται στην παρασκευή αντιβιοτικών και στη βιομηχανία των τροφίμων (Alexopoulos *et al.*, 1996: Ingold και Hudson, 1993).

Τέλος, τα περισσότερα στελέχη του φύλου είναι σαπρόβια ή παράσιτα φυτών και έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν σάκχαρα ως πηγή ενέργειας, ενώ, λιγότερο συχνά, μερικοί παρασιτικοί ασκομύκητες παράγουν ένζυμα που επιτρέπουν την πέψη μεγαλομοριακών ενώσεων, π.χ. κυτταρίνη, χιτίνη και πηκτίνη (Alexopoulos *et al.*, 1996).

### **1.6.2. Φύλο Basidiomycota**

Το φύλο Basidiomycota χωρίζεται στις κλάσεις Basidiomycetes, Urediniomycetes και Ustilaginomycetes και περιλαμβάνει 40 τάξεις και περίπου σε 1.500 γένη (Hawksworth *et al.*, 1995: Index Fungorum).

Το μυκήλιό τους έχει μεγάλο μέγεθος και είναι χωροταξικά διαχωρισμένο σε κομμάτια με το τοίχωμα των υφών τους να αποτελείται από πολλά στρώματα. Οι Βασιδιομύκητες πολλαπλασιάζονται εγγενώς με σπόρους, που καλούνται βασιδοσπόρια. Το κύριο χαρακτηριστικό του φύλου είναι η ύπαρξη βασιδίων. Τα βασίδια συνήθως δεν



έχουν σέπτα και φέρουν τέσσερις μικρές προεκτάσεις, που ονομάζονται στηρίγματα. Το κάθε στήριγμα ανέρχεται από ένα κύτταρο που καλείται ολοβασίδιο, και περιέχει ένα απλοειδές μειοσπόριο, το βασιδιοσπόριο, που όταν ωριμάσει αποκόπτεται (Kendrick, 1992). Κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό σχηματίζονται συνήθως αθροσπόρια, που καλούνται συχνά ως ωΐδια, ενώ μερικά είδη σχηματίζουν βλαστικά κονίδια. Τέλος, οι μύκητες αυτοί χρησιμοποιούν ριζόμορφα για την πρόσβασή τους σε θρεπτικά συστατικά (Alexopoulos *et al.*, 1996; Ingold και Hudson, 1993).

Τα περισσότερα στελέχη των Βασιδιομυκήτων συναντώνται σε χέρσο περιβάλλον και ελάχιστα σε υδάτινο. Συναντώνται κυρίως στα δέντρα δασικών περιοχών. Η κατηγορία αυτή μυκήτων περιλαμβάνει σαπρόφυτα, παθογόνα φυτών και ζώων και εδώδιμα είδη μυκήτων. Οι Βασιδιομύκητες έχουν μεγάλο κύκλο ζωής που κατά την διάρκειά του παράγεται μεγάλος αριθμός σπορίων (Alexopoulos *et al.*, 1996; Ingold και Hudson, 1993).

### 1.6.3. Φύλο Chitridomycota

Το φύλο Chitridomycota αποτελείται από μια και μόνο κλάση, τους Chitridomycetes, η οποία χωρίζεται στις τάξεις Blastocladales, Chytridiales, Monoblepharidales, Neocallimastigales και Spizellomycetales (Index Fungorum).

Οι Χιτριδομύκητες δεν έχουν κανονικό μυκήλιο και πολλαπλασιάζονται κυρίως μέσω αγενών σπορίων που φέρουν μαστίγια στο πίσω μέρος τους (ζωοσπόρια). Βρίσκονται υπό την μορφή σποραγγείων και απελευθερώνονται μέσω ενός ανοίγματος στο τοίχωμα αυτών, απ' το οποίο επέρχεται στη συνέχεια η καταστροφή του θάλλου. Σε κάποια είδη του φύλου αυτού έχουμε σχηματισμό εγγενών σπορίων (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Τα στελέχη τους συναντώνται ως σαπρόφυτα ή ως παράσιτα σε φυτά, ζώα και άλλους μύκητες. Τα σαπροφυτικά στελέχη χρησιμοποιούν σύνθετους υδρογονάνθρακες σαν βασική πηγή ενέργειας. Απομονώνονται από χέρσο ή υδάτινο περιβάλλον με τη βοήθεια εργαστηριακών υποστρωμάτων που περιέχουν κυτταρίνη, κερατίνη και χιτίνη (Alexopoulos *et al.*, 1996).

#### 1.6.4. Φύλο Glomeromycota

Το φύλο Glomeromycota είναι μια προσφάτως χαρακτηρισμένη ομάδα μυκήτων που απαριθμεί 150 περίπου αναγνωρισμένα είδη, ταξινομημένα σε δέκα γένη (*Acaulospora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Geosiphon*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora*, *Paraglomus* και *Scutellospora*), τα οποία διαχωρίστηκαν, αρχικά βάση της μορφολογίας των σπόρων τους και κατόπιν μέσω φυλογενετικής ανάλυσης (Schussler *et al.*, 2001: Index Fungorum).

Τα μέλη του φύλου Glomeromycota είναι υποχρεωτικά συμβιωτικά των ριζών των φυτών (Μυκόριζες- Mycorrhizas). Στις υφές τους δεν παρατηρούνται σέπτα και ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται αγενώς (Kuhn *et al.*, 2001). Τα στελέχη του παράγουν σχετικά μεγάλα σε μέγεθος σπόρια, που αποτελούνται από διαδοχικά τοιχώματα και περιέχουν πολλούς πυρήνες (Becard και Pfeffer, 1993). Τα σπόρια δημιουργούνται σε απλή μορφή (ένα ξεχωριστό), σε δέσμη ή σε μορφολογικούς σχηματισμούς-υποδοχείς που ονομάζονται σποροκάρπια (Morton, 1988).

Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες τα σπόρια αναπτύσσονται πάνω στη ρίζα του φυτού-ξενιστή. Τα νέα σπόρια μπορούν να δημιουργηθούν στο μυκήλιό του είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά του ιστού της ρίζας.

#### 1.6.5. Φύλο Zygomycota

Τα μέλη του φύλου Zygomycota ανήκουν στους κατώτερους μύκητες των οποίων οι θάλλοι δεν σχηματίζουν συνήθως σέπτα. Το φύλο αυτό περιλαμβάνει τις κλάσεις Zygomycetes και Trichomycetes. Στην κλάση Zygomycetes ανήκουν οι τάξεις Dimargaritales, Endogonales, Entomophthorales, Kickxellales, Mucorales και Zoopagales, ενώ η κλάση Trichomycetes αποτελείται από τις τάξεις Amoebidiales, Asellariales, Eccrinales και Herpalles (Index Fungorum).

Πολλαπλασιάζονται μέσω εγγενών ή αγενών σπορίων. Μετά τον σχηματισμό των αναπαραγωγικών τους οργάνων σχηματίζουν ένα μονήρες, σκούρου χρώματος, με παχύ τοίχωμα, εγγενή σπόρο που ονομάζεται ζυγοσπόριο. Τα περισσότερα στελέχη της κλάσεως Zygomycetes παράγουν σποράγγεια, ενώ τα μέλη της τάξεως Entomophthorales και ορισμένα μέλη της κλάσεως Trichomycetes σχηματίζουν κονίδια και αθροσπόρια,

αντίστοιχα. Τα σποράγγεια μπορεί να περιέχουν συνήθως 50 με 100 χιλιάδες σπόρους (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Σε θρεπτικό υπόστρωμα οι Ζυγομύκητες αναγνωρίζονται από τις ευρείες, χωρίς σέπτα, διαφανείς και συχνά διακλαδιζόμενες υφές τους. Το μυκήλιο των μελών της κλάσεως Zygomycetes είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένο και συνήθως βρίσκεται βυθισμένο στο υπόστρωμα ή στον ιστό του ξενιστή. Αντίθετα το μυκήλιο των μελών της κλάσεως Trichomycetes χαρακτηρίζεται ως απλό και οι θάλλοι του είναι αρκετά περιορισμένοι (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Τα στελέχη της κλάσεως Zygomycetes συναντώνται ως σαπρόφυτα, συμβιωτικά ή παράσιτα στο έδαφος. Λίγα είναι τα στελέχη που χαρακτηρίζονται ως φυτοπαθογόνα, από τα οποία τα περισσότερα εισχωρούν στο εσωτερικό του φυτού από φυσικά ανοίγματα. Στελέχη της τάξεως Mucorales μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το χώμα ή την λάσπη όταν αυτά αναπτύσσονται σαν σαπρόφυτα. Επίσης μερικά από τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, αμυλάσης και διάφορων άλλων οργανικών οξέων. Τα μέλη της κλάσεως Trichomycetes είναι άμεσα εξαρτημένα με τα αρθρόποδα, τα έντομα και τα οστρακόδερμα. Ο ξενιστής μπορεί να είναι προνύμφη ή ενήλικας, σε χέρσο ή υδάτινο περιβάλλον. Συνήθως οι μύκητες αυτοί είναι προσκολλημένοι στην κοιλιά του ξενιστή, απ' όπου και απορροφούν θρεπτικά συστατικά (Alexopoulos *et al.*, 1996: Ingold και Hudson, 1993).

### 1.7. Γένος *Cladosporium* Link

Το γένος *Cladosporium* Link ανήκει στην οικογένεια Mycosphaerellaceae, τάξη Mycosphaerellales, κλάση Ascomycetes, φύλο Ascomycota (Link, 1816: Index Fungorum). Το τυπικό είδος του γένους αυτού είναι το *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link (Link, 1816: Index Fungorum). Τα μέλη του γένους *Cladosporium* συναντώνται ευρύτατα στο εξωτερικό περιβάλλον των εύκρατων περιοχών, κυρίως στο έδαφος, στα φύλλα και στα νεκρά φυτικά μέρη-όργανα. Συναντάται επίσης στον αέρα την περίοδο που τα φυλλοβόλα δέντρα χάνουν την κόμη τους (τέλη καλοκαιριού-φθινόπωρο). Μαζί με μέλη του γένους *Alternaria* είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την δημιουργία (εξαιτίας των σπορίων) άσθματος στον άνθρωπο. Το μυκήλιο των στελεχών του γένους *Cladosporium* είναι σκούρου πράσινου χρώματος που αναπτύσσεται σχετικά αργά. Παράγει μαύρους σπόρους (κονίδια) που σχηματίζουν αλυσίδα, η οποία όταν διασπαστεί απελευθερώνει

σπόρους που διασκορπίζονται με τον αέρα. Τα κύτταρά τους παράγουν ένζυμα κατάλληλα για την διάσπαση της κυτταρίνης, της λιγνίνης και της πηκτίνης, ενώσεων που αποτελούν τα κύρια συστατικά των νεκρών φυτικών μερών. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 18 και 28 °C, ενώ έχει παρατηρηθεί μικρή ανάπτυξη και στους -6 °C (de Vries, 1952; Ellis, 1976; Wang και Zabel, 1990).

### 1.8. Γένος *Geotrichum* Link

Το γένος *Geotrichum* Link ανήκει στην οικογένεια τάξη Saccharomycetales, κλάση Saccharomycetes, υποφύλο Saccharomycotina, φύλο Ascomycota (Link, 1809: Index Fungorum). Τα μέλη του γένους *Geotrichum* συμπεριλαμβάνονται στις ζύμες και συναντώνται ευρέως στο χώμα, στο νερό, στον αέρα, σε λήμματα, σε φυτά, σε γαλακτοκομικά προϊόντα και τρόφιμα, και στον άνθρωπο. Το γένος *Geotrichum* περιλαμβάνει πληθώρα ειδών από τα οποία το πιο κοινό είναι το *Geotrichum candidum* Link (τυπικό είδος του γένους αυτού) το οποίο έχει έντονη οσμή παρόμοια με αυτή του ανανά. Τα κύτταρα του *Geotrichum* σχηματίζουν άσπρες, ξηρές, εύθρυπτες σαν βαμβάκι, ταχύτατα αναπτυσσόμενες αποικίες που όταν απλωθούν στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού ή ξενιστή αποκτούν χαρακτηριστική γλοιώδης υφή. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων του είναι οι 25 °C, ενώ στους 37 °C παρατηρείται ελάχιστη έως μηδενική ανάπτυξη (Bouakline *et al.*, 2000; Larone, 1995; Sutton *et al.*, 1998).

### 1.9. Γένος *Penicillium* Link

Το γένος *Penicillium* Link ανήκει στην οικογένεια Trichocomaceae, τάξη Eurotiales, κλάση Ascomycetes, φύλο Ascomycota (Link, 1809: Index Fungorum). Το τυπικό είδος του γένους αυτού είναι το *Penicillium expansum* Link (Link, 1809: Index Fungorum). Τα μέλη του γένους *Penicillium* είναι ευρύτατα διαδεδομένα και βρίσκονται σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα καθώς και σε τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά, σιτηρά και εσπεριδοειδή. Μερικά είδη του γένους *Penicillium* καθιστούν τα τρόφιμα μη εδώδιμα, ακόμη και επικίνδυνα για τον άνθρωπο λόγω των τοξινών που παράγουν. Αντίθετα άλλα είδη έχουν εφαρμογή στην τεχνολογία των τροφίμων, π.χ η χρήση του *Penicillium roquefortii* στην παρασκευή τυριού, και στην παραγωγή φαρμακευτικών

παρασκευασμάτων, π.χ. παράγωγη πενικιλίνης με τη χρήση στελεχών του είδους *Penicillium chrysogenum*. Το μυκήλιο στελεχών του γένους *Penicillium* είναι πράσινου ή κυανού χρώματος, ενώ η κονιδιοφόρος αυτών είναι χαρακτηριστική (μορφή δακτύλων). Τα είδη του αναγνωρίζονται από τις δομές που παρουσιάζουν οι πυκνές, σχήματος βούρτσας, σποριογενείς διακλαδώσεις που φέρουν δέσμες φλασκοειδών κυψελών (Pitt, 1980; Ramirez, 1982; Stolk και Samson, 1983).

#### **1.10. Γένος *Stereum* Pers.**

Το γένος *Stereum* ανήκει στην οικογένεια Stereaceae, τάξη Russulales, κλάση Basidiomycetes, φύλο Basidiomycota (Pers., 1794: Index Fungorum). Το τυπικό είδος του γένους αυτού είναι το *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (Pers., 1800: Index Fungorum). Τα στελέχη του γένους αυτού συναντώνται στο εξωτερικό περιβάλλον και συνήθως σε απομεινάρια νεκρών φυτικών μερών όπως κορμούς, κλαδιά, κυρίως των κωνοφόρων δέντρων. Το σώμα τους αναπτύσσεται πάνω στον ξενιστή και σχηματίζει λεπτές, δερματώδεις στρώσεις. Η πάνω επιφάνεια αυτών είναι κυματιστή, καφέ-κίτρινου χρώματος και σχηματίζει πορώδεις λοβούς, ενώ η κάτω επιφάνεια είναι λεία, κιτρινωπού χρώματος. Οι στρώσεις αυτές με την πάροδο του χρόνου ξεθωριάζουν και χάνουν την γονιμότητά τους ενώ ταυτόχρονα σχηματίζονται νέες πιο γόνιμες. Τα στελέχη παράγουν λείους, κυλινδρικούς σπόρους (σποροκάρπια) που διασκορπίζονται στο περιβάλλον κυρίως από την πάνω, πιο γόνιμη επιφάνεια του σώματός τους. Τα μέλη του γένους αυτού δεν είναι εδώδιμα και δεν παρουσιάζουν αξιόλογη εμπορική ή κλινική σημασία.

#### **1.11. Στοιχεία βιοπληροφορικής**

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. Με την βιοπληροφορική είναι εφικτή η σύγκριση-φυλογενετική ανάλυση των μικροοργανισμών και των οργανισμών στην μικροβιακή-πληθυσμιακή οικολογία και στην συστηματική κατάταξη αυτών 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 φυσιολογικά ή γενετικά χαρακτηριστικά 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 χρήση 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. Τέλος, 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:

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

όπου  $\sqrt{\phantom{x}}$  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.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Στελέχη μυκήτων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δεκαεπτά στελέχη μυκήτων που απομονώθηκαν στο Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας Καλαμάτας από δύο δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και από ένα δείγμα ελαιοπυρηνόλυματος (αιρεοτυζο). Στον Πίνακα 2.1. παραθέτονται τα ονόματα των στελεχών μυκήτων που μελετήθηκαν καθώς και το είδος, η προέλευση και η ημερομηνία παραλαβής των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί αυτοί.

**Πίνακας 2.1.** Προέλευση δειγμάτων και ονόματα στελεχών μυκήτων.

Στέλεχος	Είδος Δείγματος	Προέλευση Δείγματος	Ημερομηνία Παραλαβής
FGAR-1	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/01/2004
FGAR-2	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/01/2004
FFWW-3	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-3A	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-7	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-12B	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-14	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-15	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FGOLD-17	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	01/11/2003
FFWW-18A	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FFWW-18B	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FGOLD-20	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	01/11/2003
FGAR-23A	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/01/2004
FGAR-23B	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/01/2004
FGAR-25	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/01/2004
FFWW-25	Ελαιοπυρηνόλυμα	Κρήτη	16/02/2004
FGOLD-25	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	01/11/2003

## 2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

### 2.2.1. Θρεπτικό υπόστρωμα με υγρά απόβλητα 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
- Πεγάμετρο
- Αυτόκαυστο

#### Πειραματική Πορεία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) στο 6 με τη χρήση διαλύματος CaO, και στη συνέχεια διήθηση αυτών προς παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος συγκεντρώσεως 100% v/v. Κατόπιν κατάλληλης αραίωσης και προσθήκης 1.7% w/v άγαρ παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα 15% v/v σε ΥΑΕ. Τέλος πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος στον αυτόκαυστο υπό πίεση 2.1 Atm για 20 min.

Πριν αναλυθούν, όλα τα υγρά απόβλητα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη συντηρούνταν στους 3°C, ενώ κατά την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων, κατάλληλη ποσότητα ΥΑΕ αφηνόταν να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα συγκεντρώσεως 15% v/v σε ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκε τόσο στην ανακαλλιέργεια των στελεχών μυκήτων όσο και στην εξαγωγή χρωμοσωμικού



DNA, αφού τα στελέχη της παρούσας μελέτης αδυνατούσαν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα.

## 2.2.2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος LB

### Υλικά και Όργανα

- πεπτόνη
- NaCl
- εκχύλισμα ζύμης (YE, yeast extract)
- Αμπικιλίνη
- Κωνική φιάλη των 500 και 1000 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 και 500 ml
- Αποιονισμένο νερό
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Ζυγό ακριβείας
- Άγαρ
- Αυτόκαυστο

### Πειραματική Πορεία

Η παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1% w/v NaCl, 1% w/v πεπτόνης και 0.5% εκχυλίσματος ζύμης σε κατάλληλη ποσότητα αποιονισμένου ύδατος. Προσθήκη 1.7% w/v άγαρ πραγματοποιούνταν για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος. Τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν στον αυτόκαυστο για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm. Όπου απαιτούνταν, πραγματοποιήθηκε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αμπικιλίνης ώστε η τελική συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο υπόστρωμα να είναι 100 µg/ml.

### 2.3. Εξαγωγή χρωμοσωμικού DNA μυκήτων

#### Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες (20 μl, 200 μl και 1 ml)
- Αποστειρωμένα νυστέρια
- Αποστειρωμένα μικρά πλαστικά έμβολα
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Δυο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65°C και 37°C αντίστοιχα
- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5 ml (Eppendorfs)
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)
- Μηχανικός αναδευτήρας (Vortex)

#### Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- Διάλυμα λύσης DNA, pH 7.2 (DNA extraction buffer- lysis buffer):
  - 50 mM Tris-HCl
  - 50 mM EDTA
  - 3% w/v SDS
  - 0.15 M NaCl
- Φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v/v), (LIFE TECHNOLOGIES)
- 3 M Οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa), pH 4.8
- Ισοπροπανόλη [CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>]
- 70% (v/v) αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- RNάση (10 μM)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O
- Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>)
- 100% (v/v) αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- Υγρό άζωτο

### Πειραματική πορεία

Με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, αποκολλήθηκε από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα κατάλληλη ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας, η οποία τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης (ependorf). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη αυτού σε υγρό άζωτο και σύνθλιψη του παγωμένου μυκηλίου με τη βοήθεια μικρού πλαστικού εμβόλου. Ακολούθησε προσθήκη 700 μl διαλύματος λύσης και ελαφρά ανακίνηση στο μηχανικό αναδευτήρα. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 1 h, αποσκοπώντας στη λύση των κυττάρων. Μετά το πέρας της μιας ώρας πραγματοποιήθηκε προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης : χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1, v/v/v) και ακολούθησε ισχυρή ανακίνηση του μικροσωλήνα φυγοκέντρησης προς απενεργοποίηση ενζύμων και καθαρισμό της υδατικής φάσης από κυτταρικά υπολείμματα και πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στη μικρο-φυγόκεντρο στις 11000 rpm για 10 min και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέους μικροσωλήνες. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση του μικροσωλήνα στις 11000 rpm για 10 min, προς απομάκρυνση τυχόν ποσοτήτων φαινόλης και άλλων υπολειμμάτων της υδατικής φάσης. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε εκ νέου σε καινούργιο μικροσωλήνα και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Το δείγμα ανακινήθηκε ελαφρά και παρέμεινε στους -20 °C για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Ακολούθησε προσθήκη 0.4 ml 70% (v/v) αιθανόλης, φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το DNA αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλύθηκε σε 0.2 ml υπερκάθαρου ύδατος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 5 μl RNασης (10 μM) και τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1 h, αποσκοπώντας στην διάσπαση του RNA από το ένζυμο. Με το πέρας μιας ώρας, το δείγμα εκχυλίστηκε με προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης : χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1, v/v/v) και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης όπου και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 10 min για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα φαινόλης. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε εκ νέου σε καινό μικροσωλήνα, όπου και παρέμεινε στους -20 °C για μια μέρα, έπειτα από προσθήκη τριών όγκων παγωμένης 100% (v/v) αιθανόλης και 0.1 όγκων 3 M οξικού νατρίου, pH 4.8.

Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.4 ml 70% (v/v) αιθανόλης. Τέλος, το DNA, αφού αφέθηκε να στεγνώσει, επαναδιαλύθηκε σε 50 μl υπερκάθαρου ύδατος και αποθηκεύθηκε στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση.

## 2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### Όργανα – Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5 ml (eppendorfs)
- Αυτόματες πιπέτες (1 μl, 10 μl και 100 μl)
- Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0.2 ml (PCR tube)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Στατό
- Μηχανή PCR (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer) (δημιουργεί άριστες συνθήκες για τη δράση του ένζυμου πολυμεράση)
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (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)
- 50 μM εκκινητή ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')
- 50 μM εκκινητή ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3')
- DyNazyme EXT DNA πολυμεράση, 1 U/μl, Finnzyme OY, Finland

### Πειραματική πορεία

Με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του τμήματος DNA στελεχών μυκήτων, που περιλάμβανε την περιοχή ITS1, το γονίδιο 5.8S rDNA, την περιοχή ITS2, καθώς και μικρά τμήματα της μεγάλης και της μικρής υποομάδας rDNA. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων:

- 38 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O
- 5 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer)
- 3 μl MgCl<sub>2</sub> (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) ανά δείγμα.

Πραγματοποιήθηκε παρασκευή ενός διαλύματος κατάλληλο για έξι δείγματα (Master mix), χρησιμοποιώντας εξαπλάσιες ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων εκτός του DNA των δειγμάτων που προστέθηκε σε κάθε σωλήνα αντίδρασης πολυμερισμού (0.2 ml PCR tube) ξεχωριστά. Σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε παρασκευή 'τυφλού δείγματος-μαρτύρα' με την ίδια σύσταση με τα δείγματα, εκτός της προσθήκης του DNA.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα πολυμερισμού (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

1<sup>ο</sup> Στάδιο: 4 min στους 94°C (αποδιάταξη DNA)

2<sup>ο</sup> Στάδιο: 35 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:

- 30 sec στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
- 30 sec στους 53°C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών)
- 1 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

3<sup>ο</sup> Στάδιο: 10 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

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

## 2.5. Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

### Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες (0.2 ml και 1 ml)
- Αποστειρωμένα ακροϋγχια μικροπιπετών (tips)

- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5 ml (Eppendorfs)
- QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Γερμανία)
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraeus instruments)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O

#### Πειραματική πορεία

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης όπου πραγματοποιήθηκε ανάμειξη με πέντε όγκους διαλύματος PB (Qiagen). Έπειτα από ανάδευση, το διάλυμα, μεταφέρθηκε σε μικροκολώνα των 2 ml (Qiagen) και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 1 min. Με την απομάκρυνση του υγρού, προστέθηκαν 0.75 ml διαλύματος PE (Qiagen) και ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min. Με την απομάκρυνση του υγρού από την μικροκολώνα (Qiagen), η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 30 μl αποστειρωμένου ύδατος και έπειτα από αναμονή 5 min, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 1 min. Τα 30 μl στα οποία επαναδιαλύθηκε το DNA συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

### **2.6. Εισαγωγή DNA (προϊόν PCR) σε πλασμιδιακό φορέα (Ligation)**

#### **Υλικά και Όργανα**

- Αυτόματες πιπέτες (2 μl 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 H<sub>2</sub>O

#### Πειραματική πορεία

Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega, WI, USA). Παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου για την αντίδραση της λιγάσης (2x

ligation buffer, Promega), 3.7 μl καθαρισμένου προϊόντος PCR, 0.3 μl πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) και 1 μl λιγάσης (3 με 6 U- Promega, WI, USA). Η εισαγωγή του ένθετου DNA στο πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε με παραμονή του παραπάνω διαλύματος στους 8°C για 12 h.

## 2.7. Γενετικός μετασχηματισμός κυττάρων (transformation)

### Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες (10 μl, 100 μl και 200 μl).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Πιπέτες Pasteur ή Γυάλινη ράβδος
- Δύο 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 H<sub>2</sub>O
- Άγαρ
- NaCl
- Πεπτόνη
- Εκχύλισμα Ζύμης

### Πειραματική πορεία

Αρχικά, 'ικανά κύτταρα' (competent cells) *E. coli* (στέλεχος DH5a) τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι την ρευστοποίηση αυτών. Ακολούθησε προσθήκη του πλασμιδίου στα 'ικανά κύτταρα'. Το μίγμα αυτό παρέμεινε στον πάγο για 30 min και στη συνέχεια εισήχθη

σε υδατόλουτρο στους 42°C για 1 min (heat shock). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0.2 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37°C για 1 h. Ακολούθησε προσθήκη 50 µl X-gal (2% w/v) και 10 µl IPTG (100 mM) στα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*, που στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB που περιείχε 100 µg/ml αμπικιλίνη. Ύστερα από επώαση 12-16 h, τα γενετικώς μετασχηματισμένα κύτταρα σχημάτιζαν λευκές αποικίες.

## 2.8. Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA

### Υλικά και Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες (10 µl και 200 µl).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 1.5 ml (Eppendorfs)
- Βρασμένο νερό
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraesus 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 µl 0.5 mg/ml λυσοζύμης ανά δείγμα]
- 100% (v/v) αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- Φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v/v), (LIFE TECHNOLOGIES)
- 3 M Οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa), pH 4.8
- Ισοπροπανόλη [CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>]
- 70% (v/v) αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- RNάση (10 µM)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O
- Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>)



### Πειραματική πορεία

Αποικίες γενετικά μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*, εμβολιάστηκαν σε 10 ml υγρού υποστρώματος LB (η καθεμία) και επώαστηκαν επί 14-18 h στις 150 στροφές ανά λεπτό (rpm). Ποσότητα κυττάρων μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης (erpendorf) και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm επί 1 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστέθηκαν στο δείγμα 0.15 ml διαλύματος λύσης και ακολούθησε έντονη ανάδευση και θέρμανση αυτού μέχρι βρασμού για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13000 rpm για 10 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Κατόπιν, προστέθηκαν 0.4 ml 70% v/v αιθανόλης και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το δείγμα αφέθηκε να στεγνώσει. Ακολούθησε επαναδιάλυση του DNA σε 0.2 ml ύδατος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 5 μl RNάση (10 μM) στο δείγμα, και τοποθέτηση αυτού σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h. Μετά το πέρας της μιας ώρας, το δείγμα εκχυλίστηκε με ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v), προς απενεργοποίηση και απομάκρυνση της RNάσης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min και το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε σε καινούς μικροσωλήνες φυγοκέντρησης. Στο δείγμα προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου, για την απομάκρυνση τυχόν υπολείμματος φαινόλης και πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min και μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε νέο μικροσωλήνα. Κατόπιν, το δείγμα παρέμεινε στους -20°C για μία μέρα, προς κατακρήμνιση του DNA, αφού πρώτα προστέθηκαν 3 όγκοι παγωμένης 100% (v/v) αιθανόλης και 0.1 όγκοι 3 M οξικού νατρίου, pH 4.8. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και έκπλυση του DNA με 0.5 ml 70% (v/v) αιθανόλης, η οποία μετά από φυγοκέντρηση 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.

## 2.9. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάση περιορισμού

### Υλικά και Όργανα

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

### Πειραματική πορεία

Τα προς πέψη δείγματα παρασκευάστηκαν με την προσθήκη των ακόλουθων συστατικών:

1. 10 μl πλασμιδιακού DNA
2. 2.5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (10x Buffer *EcoR* I, IMBB, Ηράκλειο Κρήτης).
3. 1.5 μl ενδονουκλεάσης περιορισμού *EcoR* I (10 U/μl):  $\frac{\text{GAATTC}}{\text{CTTAAG}}$
4. 11 μl αποστειρωμένου ύδατος

Το παραπάνω μίγμα παρέμεινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 h για να πραγματοποιηθεί η πέψη του ένθετου DNA. 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. Ακολούθησε χρωματισμός παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 mg/l) και αποχρωματισμός σε αραιό διάλυμα θειικού μαγνησίου (1 μM). Τέλος τα προϊόντα της πέψης φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως.

## 2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

### Υλικά και Όργανα

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: Ηλεκτροφορητικό δοχείο, υποδοχέας πηκτικής αгарόζης, 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 (tips)
- Κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ζυγός: KERN 572-35 (Kern & Sohn GmbH, Germany)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτών αгарόζης: (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. CH<sub>3</sub>COOH 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 (MgSO<sub>4</sub>)
- 5 mg/ml αρχικού διαλύματος, 0.5 mg/l τελική συγκέντρωση (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Br)
- 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

Το χρωμοσωμικό DNA των μυκήτων και τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v, ενώ τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoR* I αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w/v. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης HORIZON 58, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL με υποδοχέα πηκτής αγαρόζης χωρητικότητας 50 ml, ενώ στην δεύτερη η HORIZON 11.14, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL με υποδοχέα πηκτής αγαρόζης χωρητικότητας 120 ml.

Αρχικά, ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προς παρασκευή πηκτής 50 ml (1% w/v σε αγαρόζη) ή 120 ml (1.5 % w/v σε αγαρόζη) σε κωνική φιάλη. Το παρασκεύασμα τοποθετήθηκε στον φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και αφέθηκε να κρυώσει για να αποκτήσει θερμοκρασία περίπου ίση με 50°C.

Κατόπιν, ο υποδοχέας της πηκτής αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια θέση (χωρίς κλίση), οι ανοιχτές πλευρές του σφραγίστηκαν και εφαρμόστηκε κατάλληλα η ειδική χτένα. Το παραπάνω παρασκεύασμα εισήχθη στον υποδοχέα, απομακρύνοντας τυχόν φυσαλίδες. Η πηκτή αγαρόζης στερεοποιήθηκε, η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώθηκε με διάλυμα 1x TAE ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή και η χτένα απομακρύνθηκε.

Στην συνέχεια, έγινε προετοιμασία των δειγμάτων που προορίζονταν για ηλεκτροφόρηση με μίξη 8 μl ενισχυμένου τμήματος DNA και 5 μl διαλύματος φόρτωσης (loading dye). Στα προϊόντα της πέψης με ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoR* I πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 25 μl δείγματος με 5 μl διαλύματος φορτώσεως (loading dye). Καθένα από τα δείγματα τοποθετήθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια μικροπιπέτας σε μια από τις θέσεις ηλεκτροφόρησης ('πηγάδια'). Μαζί με τα δείγματα τοποθετήθηκαν μάρτυρας και δείκτης μοριακών μεγεθών DNA (100 bp DNA Ladder). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 5 V/cm με τη χρήση τροφοδοτικού (Power PAC 300, BIO-RAD, USA).

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή χρωματίστηκε σε διάλυμα 0.5 mg/l βρωμιούχου αιθιδίου 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 1 mM. Τέλος, τα δείγματα φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως, με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA).

## 2.11. Εύρεση της αλληλουχίας βάσεων τμημάτων DNA

Αρχικά, έγινε εξαγωγή πλασμιδιακού DNA από τρεις κλώνους που περιείχαν το κατάλληλο τμήμα DNA, που προήλθε από ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA των στελεχών μυκήτων 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'). Η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αναλυτή LI-COR Long ReadIR2 4200 (LI-COR, USA).

## 2.12. Φυλογενετική ανάλυση

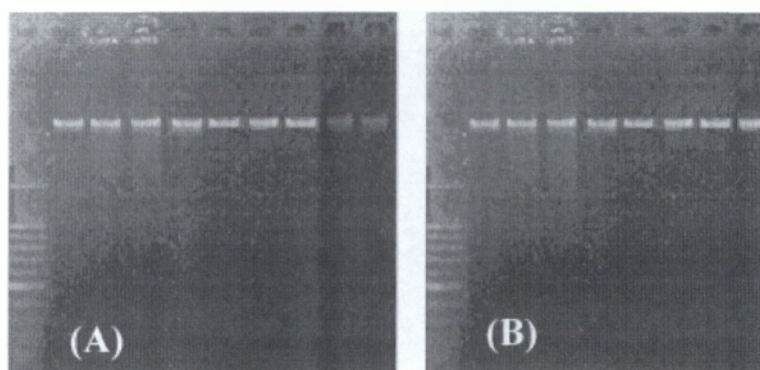
Οι αλληλουχίες των βάσεων DNA αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος (DNASTAR Inc., Madison, USA). Η φυλογενετική συσχέτιση των αλληλουχιών βάσεων των μικροοργανισμών της παρούσας μελέτης με τις αλληλουχίες βάσεων γνωστών μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής βάσης δεδομένων NCBI, χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό 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 ανάλυση. Συσχέτιση των αλληλουχιών βάσεων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του διαδικτυακού προγράμματος “ClustalW Submission Form” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν βάσει του προγράμματος TREECON for Windows (Version 1.3b). Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο του Kimura (1980). Η διαμόρφωση του φυλογενετικού δέντρου βασίστηκε στη μέθοδο “neighbor-joining” (Saitou και Nei, 1987) με τη στήριξη αυτοδύναμης ανάλυσης 100 δέντρων (bootstrap analysis).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

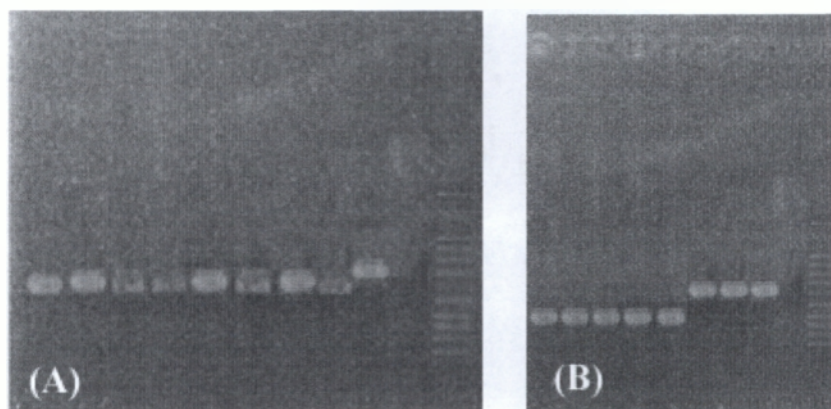
#### 3.1. Χαρακτηρισμός μυκήτων με μοριακές μεθόδους

Κατά την μελέτη δεκαεπτά στελεχών μυκήτων απομονώθηκε χρωμοσωμικό DNA, του οποίου η ποιότητα και ποσότητα εξαρτιόταν από την φύση του κάθε μικροοργανισμού (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1.** Χρωμοσωμικό DNA στελεχών μυκήτων. Από αριστερά προς τα δεξιά: A) δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A, FGAR-23B, FGAR-25 και FGold-25, και B) δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B, FFWW-25, FFWW-12B, Fgold-17 και Fgold-20. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δύο φωτογραφιών με το πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0.

Πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για τα στελέχη αυτά, με την οποία ενισχύθηκε το τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (547 bp για τα στελέχη FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A και FGAR-23B, 544 bp για τα στελέχη FFWW-12B, Fgold-17 και Fgold-20, 333 bp για τα στελέχη FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25, 513 bp για το στέλεχος FGAR-25 και 596 bp για το στέλεχος FGold-25) (Εικόνα 3.2).



**Εικόνα 3.2.** Προϊόντα ενίσχυσης του τμήματος DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 στελεχών μυκήτων. Από αριστερά προς τα δεξιά: A) FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A, FGAR-23B, FGAR-25, FGold-25, μάρτυρας-τυφλό και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp), και B) FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B, FFWW-25, FFWW-12B, Fgold-17, Fgold-20, μάρτυρας-τυφλό και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp). Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δύο φωτογραφιών με το πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0.

Σε καθεμία από τις απομονώσεις μυκήτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε η εύρεση της αλληλουχίας βάσεων των ενισχυμένων τους τμημάτων DNA. Οι αλληλουχίες των βάσεων DNA των απομονώσεων αυτών και η συσχέτιση των αλληλουχιών αυτών παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 1 έως 6.

Κατά την φυλογενετική ανάλυση των μυκήτων αυτών, οι απομονώσεις FGAR-1, FGAR-2, FFWW-3, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A και FGAR-23B αποτελούσαν μέλη του γένους *Penicillium* (οικογένεια Trichocomaceae, τάξη Eurotiales, κλάση Ascomycetes, φύλο Ascomycota), που παρουσίασαν υψηλή φυλογενετική ομοιότητα με στελέχη των ειδών *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. commune*, *P. griseoroseum* και *P. solitum* var. *curtosum*. Οι απομονώσεις FGAR-1, FGAR-2, FFWW-14 και FGAR-23A δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στην αλληλουχία βάσεων στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 τόσο μεταξύ τους όσο και με τα στελέχη *Penicillium expansum* VIC, *P. italicum* CECT 2294, *P. commune* wb193, *P. griseoroseum* VIC, *P. solitum* var. *curtosum* FRR 1669 και LB68A1A2. Οι απομονώσεις FFWW-15 και FGAR-23B παρουσίασαν 98.8% ομοιότητα με τις παραπάνω τέσσερις απομονώσεις και τα έξι στελέχη του γένους *Penicillium*, ενώ η μεταξύ τους ομοιότητα ήταν 99.6%. Η απομόνωση FFWW-3 παρουσίασε 99.6% και 100% ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 με τα

στελέχη *Penicillium italicum* ATCC 48114 και *Penicillium expansum* ATCC 7861 αντίστοιχα, ενώ παρουσίασε σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία βάσεων (98.0-98.2% ομοιότητα) με τα υπόλοιπα έξι στελέχη (FGAR-1, FGAR-2, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A και FGAR-23B). Βάσει των αποτελεσμάτων της φυλογενετικής ανάλυσης, διαπιστώθηκε επίσης η ύπαρξη δύο διακριτών φυλογενετικά στελεχών των ειδών *Penicillium italicum* και *Penicillium expansum*.

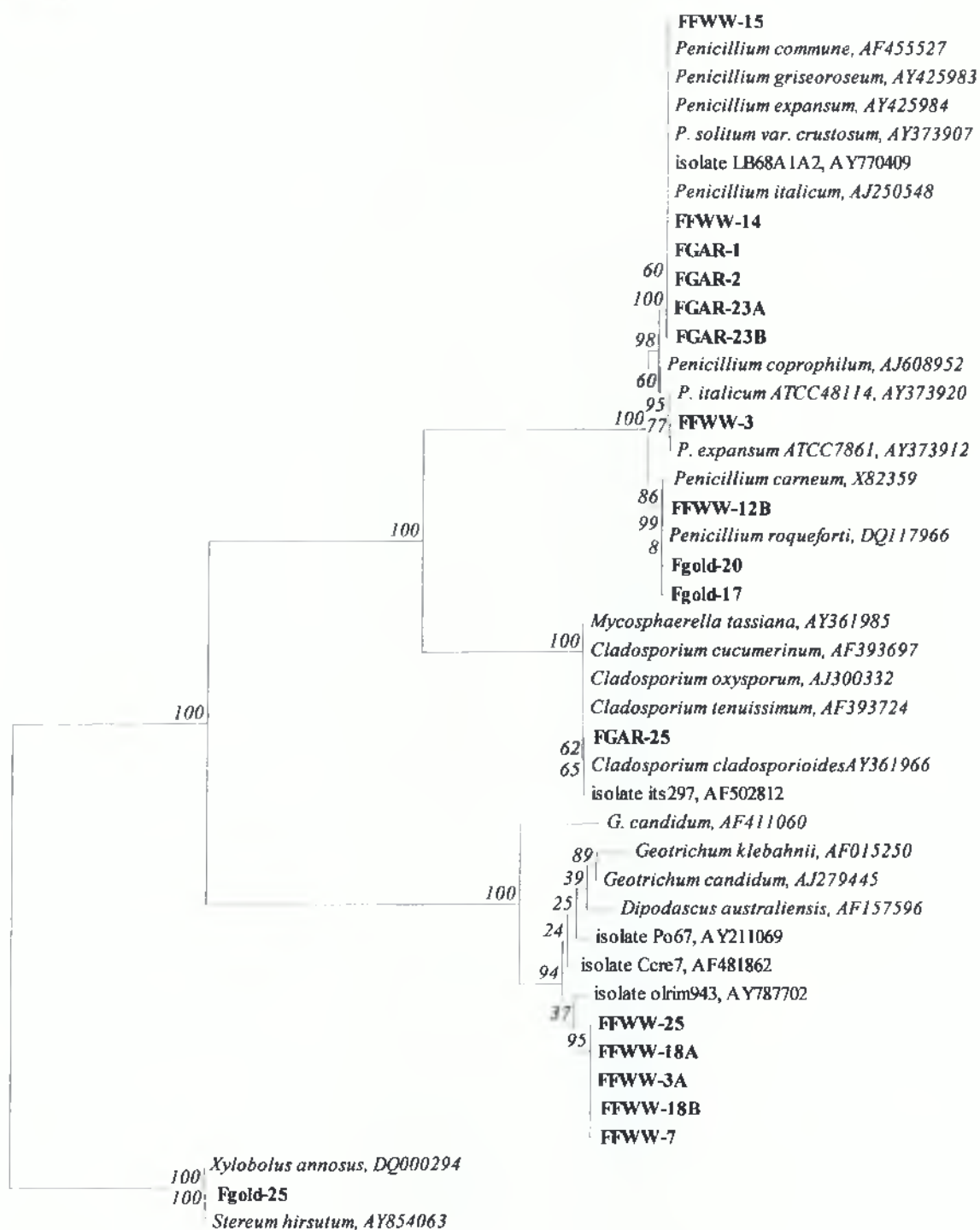
Οι απομονώσεις FFWW-12B, Fgold-17 και Fgold-20 άνηκαν επίσης στο γένος *Penicillium*, παρουσιάζοντας μεταξύ τους 99.6% ομοιότητα στο τμήμα ITS1-5.8S rDNA-ITS2. Ο πλησιέστερος φυλογενετικά μικροοργανισμός των απομονώσεων αυτών ήταν το στέλεχος *Penicillium roqueforti* IasaF09 (99.8% ομοιότητα) ακολουθούμενο από το *Penicillium carneum* (99.3% ομοιότητα).

Οι απομονώσεις FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25 συσχετιζόνταν φυλογενετικά με τα γένη *Geotrichum* και *Dipodascus* (τάξη Saccharomycetales, κλάση Saccharomycetes, φύλο Ascomycota), παρουσιάζοντας 97.2-97.6%, 96.3-96.6%, 95.6-95.9%, 95.0-95.4%, 94.4-94.7% και 92.6-92.9% ομοιότητα με τα στελέχη olrim943, *Dipodascus australiensis* UAMH 7863, Ccre7, *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii* DSM 1240, Po67 και *Geotrichum klebahnii* KCTC 6183 αντίστοιχως. Τα στελέχη FFWW-3A, FFWW-18A και FFWW-25 παρουσίαζαν 100% ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2, ενώ τα στελέχη FFWW-7 και FFWW-18B διέφεραν μεταξύ τους κατά 0.6% (99.4% ομοιότητα) και σε σχέση με τα τρία παραπάνω παρουσίαζαν 99.7% ομοιότητα.

Η απομόνωση FGAR-25 παρουσίασε φυλογενετική ομοιότητα με στελέχη των γενών *Cladosporium* και *Mycosphaerella* (οικογένεια Mycosphaerellaceae, τάξη Mycosphaerellales, κλάση Ascomycetes, φύλο Ascomycota), εμφανίζοντας ίσες φυλογενετικές αποστάσεις (99.8% ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2) με το στέλεχος its297 και τα είδη *Cladosporium cladosporioides* ATCC 58991, *C. tenuissimum* ATCC 38027, *C. oxysporum* CBS 125.80, *C. cucumerinum* ATCC 38727 και *Mycosphaerella tassiana* ATCC 60569.

Τέλος, η απομόνωση Fgold-25 ανήκε στην οικογένεια Stereaceae, τάξη Russulales, κλάση Basidiomycetes, φύλο Basidiomycota, παρουσιάζοντας 99.5% ομοιότητα στο τμήμα DNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 με τα στελέχη *Stereum hirsutum* FPL 8805 και *Xylobolus annosus* CTM10313.





**Εικόνα 3.3.** Δενδρόγραμμα των φυλογενετικών θέσεων των απομονώσεων μυκήτων 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 ανάλυσης 100 δένδρων, λαμβάνοντας υπόψη προσθήκες και διαγραφές βάσεων. Η φυλογενετική κλίμακα παρουσιάζει τον αριθμό αντικαταστάσεως ανά νουκλεοτίδιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1. Συζήτηση

Βάσει των αποτελεσμάτων της φυλογενετικής αναλύσεως, τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που απομονώθηκαν από υγρά και στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων ήταν όλα μέλη των φύλων Ascomycota και Basidiomycota. Σχεδόν όλα τα στελέχη αυτά άνηκαν στο φύλο Ascomycota (τάξεις Eurotiales, Mycosphaerellales και Saccharomycetales) ενώ μόνο το στέλεχος Fgold-25 ανήκε στους μύκητες λευκής σήψεως (white-rot fungi) (τάξη Russulales). Η πλειονότητα των απομονώσεων της παρούσας μελέτης ήταν στελέχη του γένους *Penicillium* (10 απομονώσεις) και στελέχη που συσχετιζόνταν με τα γένη *Geotrichum* και *Dipodascus* (5 απομονώσεις). Τέλος η απομόνωση FGAR-25 αποτελεί μέλος του γένους *Cladosporium* (τάξη Mycosphaerellales) (Πίνακας 4.1).

Οι απομονώσεις FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25 παρουσίασαν σχεδόν ίσες φυλογενετικές αποστάσεις με τα γένη *Geotrichum* και *Dipodascus*, και επομένως χρίζουν επιπλέον ανάλυσης για την εύρεση της ακριβούς φυλογενετικής τους θέσεως.

Βάσει της φυλογενετικής ανάλυσης, η απομόνωση FFWW-3 τοποθετήθηκε σε μία διακριτή φυλογενετική ομάδα, διαφορετική από αυτή των απομονώσεων FGAR-1, FGAR-2, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A και FGAR-23B (Εικόνα 3.3), ενώ οι συσχετιζόμενοι ως προς τις επτά αυτές απομονώσεις μικροοργανισμοί ήταν κυρίως στελέχη των ειδών *Penicillium expansum* και *P. italicum*, συμπεραίνοντας ότι η φυλογενετική θέση των στελεχών *Penicillium expansum* VIC και *P. italicum* CECT 2294, και των *Penicillium italicum* ATCC 48114 και *Penicillium expansum* ATCC 7861, θα πρέπει ταξινομικά να επανεξετασθεί.

Η πλειονότητα των μικροοργανισμών που παρουσίασαν υψηλή φυλογενετική ομοιότητα με τις απομονώσεις της παρούσας μελέτης απομονώθηκαν από δείγματα φυτικής προελεύσεως. Ενδεικτικά, τα στελέχη *Penicillium italicum* CECT 2294 (αριθμός κατάθεσης αλληλουχίας βάσεων AJ250548), *P. roqueforti* (αριθμός κατάθεσης αλληλουχίας βάσεων DQ117966) και *P. solitum* var. *crustosum* (Peterson *et al.*, 2003) απομονώθηκαν από φρούτα σε κατάσταση αποσύνθεσης, φύλλα και σπόρους καφέ

αντίστοιχα. Επιπλέον, τα στελέχη *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii* DSM 1240 (Arias *et al.*, 2002), oIrim943 (αριθμός κατάθεσης αλληλουχίας βάσεων AY787702), Ccse7 (αριθμός κατάθεσης αλληλουχίας βάσεων AF481862) και Po67 (αριθμός κατάθεσης αλληλουχίας βάσεων AY211069) (που συσχετίζονταν φυλογενετικά με τα στελέχη FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25) αποτελούν μικροοργανισμούς απομονωμένους από δενδρώδη και θαμνώδη βλάστηση. Αναφορικά, οι συγγενείς προς τα στελέχη αυτά μικροοργανισμοί είχαν απομονωθεί από τους κορμούς και τις ρίζες των *Phragmites australis*, *Fraxinus excelsior*, *Podocarpus falcatus*, *Prunus Africana* και *Crassocephalum crepidioides*. Επίσης, οι απομονώσεις FGAR-25 και Fgold-25 παρουσίασαν στενή φυλογενετική συσχέτιση με τα στελέχη its297 και *Cladosporium oxysporum* (που απομονώθηκαν από τα είδη δένδρων-φυτών *Picea albis* και *Phragmites australis* αντίστοιχως) και *Xylobolus annosus* CTM10313 (μύκητας με σημαντική λιγνολυτική δράση). Εντούτοις, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη μερικών στελεχών (φυλογενετικά συσχετιζόμενα με μερικές από τις απομονώσεις της παρούσας μελέτης), τα οποία είτε έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα είτε αποτελούν πιθανούς αλλεργιογόνους παράγοντες. Αναφορικά, το στέλεχος *Penicillium commune* wb193 (Buzina *et al.*, 2003), και τα στελέχη *Cladosporium cladosporioides* ATCC 58991 και *Mycosphaerella tassiana* ATCC 60569 (Park *et al.*, 2004) έχουν απομονωθεί από βλέννα και κατά τη μελέτη αλλεργιογόνων μικροοργανισμών σε κλειστούς χώρους αντίστοιχα.

Η χρήση μυκήτων λευκής σήψεως, π.χ. ειδών *Pleurotus*, είναι ευρύτατα διαδεδομένη στην προσπάθεια αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Aggelis *et al.*, 2002). Στελέχη του γένους *Stereum* και ιδιαίτερα του είδους *Stereum hirsutum* χρησιμοποιούνται στην διάσπαση φαινολικών και διαφόρων άλλων αρωματικών συστατικών π.χ. φυτοφάρμακα (Bending *et al.*, 2002), παρουσιάζοντας επίσης ισχυρή λιγνολυτική δράση (Breccia *et al.*, 1997).

Στελέχη του γένους *Cladosporium* έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί στον καθαρισμό εδαφών, τα οποία ήταν επιβαρημένα με υψηλές συγκεντρώσεις, φαινόλης, κρεσόλης και αρωματικών υδρογονανθράκων (Atagana, 2004: Potin *et al.*, 2004). Επίσης, στελέχη του γένους αυτού και ιδιαίτερα του είδους *Cladosporium cladosporioides* (του πλησιέστερου φυλογενετικά μικροοργανισμού ως προς την απομόνωση FGAR-25) παρουσιάζουν αυξημένη λιπολυτική δράση, η ύπαρξη της οποίας μπορεί να συμβάλλει στην αποικοδόμηση των λιπαρών συστατικών των στερεών και υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Gopinath *et al.*, 1998). Επιπλέον, στελέχη του είδους *Cladosporium cladosporioides* απομονωμένα από έδαφος στο οποίο είχαν εναποτεθεί απόβλητα

ελαιοτριβείου, παρουσίασαν σημαντική ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 50% v/v σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Tardioli *et al.*, 1997).

Συχνά, έχουν απομονωθεί στελέχη του γένους *Penicillium*, τα οποία αναπτυσσόμενα σε υψηλές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (50-100% v/v) παρουσίασαν ισχυρή λιπολυτική δράση, προκαλώντας την βιοαποικοδόμηση διαφόρων τοξικών συστατικών (μειώνοντας κατά μεγάλο ποσοστό το COD των αποβλήτων αυτών) (Aranda *et al.*, 2004: Millan *et al.*, 2000: Robles *et al.*, 2000: Tardioli *et al.*, 1997). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι στελέχη του είδους *Penicillium roqueforti* εμφανίζουν ισχυρή λιπολυτική δράση (Larsen και Jensen, 1999).

Από τους πλέον χρησιμοποιούμενους μύκητες στην βιοαποικοδόμηση τόσο υγρών όσο και στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι στελέχη του είδους *Geotrichum candidum*. Στελέχη του είδους αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί στον αποχρωματισμό (κάποια από αυτά προκαλούσαν μείωση του χρώματος κατά 70%) και στην μείωση του φαινολικού φορτίου (το ποσοστό μείωσης των φαινολικών συστατικών πλησίασε το 50%) σκουρόχρωμων υγρών αποβλήτων (Assas *et al.*, 2000: Ayed *et al.*, 2005: Fadil *et al.*, 2003: Garcia *et al.*, 2000). Επίσης, μέλη του είδους *Geotrichum candidum* έχουν απομονωθεί από στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων (alpeorujo), τα οποία κατά την εφαρμογή τους σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων προκαλούσαν σημαντική μείωση των τοξικών συστατικών και ειδικότερα των πολυφαινολών (Giannoutsou *et al.*, 2001).

**Πίνακας 4.1.** Φυλογενετική συσχέτιση των στελεχών μυκήτων.

Στέλεχος	Συστηματική κατάταξη	Φυλογενετικά συγγενείς μικροοργανισμοί	Φυλογενετική ομοιότητα	Βιβλιογραφία
<b>FGAR-1, FGAR-2, FFWW-14, FFWW-15, FGAR-23A, FGAR-23B</b>	<i>Penicillium</i> , Trichocomaceae, Eurotiales, Ascomycetes, Ascomycota	<i>P. expansum</i> VIC <i>P. italicum</i> CECT 2294 <i>P. commune</i> wb193 <i>P. griseoroseum</i> VIC <i>P. solitum</i> var. <i>curtosum</i> FRR 1669 στέλεχος LB68A1A2	99.8-100%	AY425984 AJ250548 Buzina <i>et al.</i> , 2003 AY425983 Haugland <i>et al.</i> , 2004 Delalibera <i>et al.</i> , 2004
<b>FFWW-3</b>	<i>Penicillium</i> , Trichocomaceae, Eurotiales, Ascomycetes, Ascomycota	<i>Penicillium italicum</i> ATCC 48114 <i>Penicillium expansum</i> ATCC 7861	99.6-100%	Haugland <i>et al.</i> , 2004
<b>FFWW-12B, Fgold-17, Fgold-20</b>	<i>Penicillium</i> , Trichocomaceae, Eurotiales, Ascomycetes, Ascomycota	<i>Penicillium roqueforti</i> IasaF09	99.8%	DQ117966
<b>FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B, FFWW-25</b>	Saccharomycetales, Saccharomycetes, Ascomycota	στέλεχος olrim943, <i>Dipodascus australiensis</i> UAMH 7863, στέλεχος Ccre7, <i>Geotrichum candidum</i> DSM 1240, στέλεχος Po67, <i>Geotrichum klebahnii</i> KCTC 6183	97.2-97.6% 96.3-96.6% 95.6-95.9% 95.0-95.4% 94.4-94.7% 92.6-92.9%	AY787702 AF157596 AF481862 Wirsel <i>et al.</i> , 2001 AY211069 AF015250
<b>FGAR-25</b>	<i>Cladosporium</i> , Mycosphaerellaceae, Mycosphaerellales, Ascomycetes, Ascomycota	στέλεχος its297 <i>C. cladosporioides</i> ATCC 58991, <i>C. tenuissimum</i> ATCC 38027, <i>C. oxysporum</i> CBS 125.80, <i>C. cucumerinum</i> ATCC 38727, <i>Mycosphaerella tassiana</i> ATCC 60569	99.8%	AF502812 Park <i>et al.</i> , 2004 AF393724 Wirsel <i>et al.</i> , 2002 AF393697
<b>Fgold-25</b>	Stereaceae, Russulales, Basidiomycetes, Basidiomycota	<i>Stereum hirsutum</i> FPL 8805, <i>Xylobolus annosus</i> CTM10313	99.5%	AY854063 DQ000294

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

## Παράρτημα 1. Αλληλουχίες βάσεων των στελεχών μυκήτων.

### Στέλεχος FFWW-3

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTTTGGGTCCAACCTCCACCCCGTGTATTATTACCTCGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCC  
GCCGGGGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAAGCTCTGCCTGAAGATTGTCGCTCTGAGTGAAAATATAAATTAT  
TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAA  
TCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG  
TGTGGGCCCGCTCTCCGATTCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCCACC  
CGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGGCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

### Στέλεχος FFWW-3A

AAGGATCATTATGAATAAAAATATTGTGAATTTACCACAACAACAAAAATACTATAGTCAAAAACAAAAATAAATAAACTTTTAACAA  
TGGATCTCTTGGTTCCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCA  
CATTCGACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCTTTGGAATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAA  
TTCGTTTGAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA

### Στέλεχος FFWW-7

AAGGATCATTATGAATAAAAATATTGTGAATTTACCACAACAACAAAAATACTATAGTCAAAAACAAAAATAAATAAACTTTTAACAA  
TGGATCTCTTGGTTCCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCA  
CATTCGACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCTTTGGAATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAA  
TTCGTTTGAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA

### Στέλεχος FFWW-12B

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCCGTGTATTATTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCC  
GCCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAAGCTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAATAAATAAATTATT  
AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAAATC  
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG  
TGGGTCTCGTCTCCGATCTCGGAGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCCACCCG  
CTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGGCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

### Στέλεχος FFWW-14

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCCGTGTATTATTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGC  
CGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAAGCTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTA  
TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAA  
ATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT  
GTGTTGGGCCCGCTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA  
CCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGGCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA  
A

### Στέλεχος FFWW-15

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCCGTGTATTATTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGC  
CGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAAGCTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTA  
TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAA  
ATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT  
GTGTTGGGCCCGCTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA  
CCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGGCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA  
A

### Στέλεχος FFWW-18A

AAGGATCATTATGAATAAAAATATTGTGAATTTACCACAACAACAAAAATACTATAGTCAAAAACAAAAATAAATAAACTTTTAACAA  
TGGATCTCTTGGTTCCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCA  
CATTCGACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCTTTGGAATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAA  
TTCGTTTGAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA

### Στέλεχος FFWW-18B

AAGGATCATTATGAATAAAAATATTGTGAATTTACCACAACAACAAAAATACTATAGTCAAAAACAAAAATAAATAAACTTTTAACGA  
TGGATCTCTTGGTTCCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCA  
CATTCGACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCTTTGGAATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAA  
TTCGTTTGAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FFW-25**

AAGGATCATTATGAATTAATAATTTGTGAATTTACCACAACAAACAAAATACTATAGTCAAACAAAATAATTAACACTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCCTGATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATTTCTGTGAATTCAGAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCACATTCGACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTGTGTTGAGCGTGTGTTCTCTCTTGGAAATTCATTCGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAATTCGTTTGAATAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FGAR-1**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FGAR-2**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FGAR-23A**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FGAR-23B**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος FGAR-25**

AGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTTACCACCGGATGTTTCATAACCCCTTGTGTCGACTCTGTTGCCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGGTAACTTTGCGAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAACACTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCTCTGCTCTCCGATCTGGAGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος Fgold-17**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAGTATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCTCTGCTCTCCGATCTGGAGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

**Επέλεχος Fgold-20**

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTTATTTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCGCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGGCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAATATAAATTAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCTCTGCTCTCCGATCTGGAGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA

Επέλεχος Fqold-25

AAGGATCATTAAATGAAATTTATGACTGGAGTTGTAGCTGGCCTTTAAAAACGGCATGTGCACGCTCCTTCACTAATCCACACACACCTGT  
GCACCTTCGCGGGGGTCTCTTCGTTAACTCGAAGAGGCTCGCGTCCCTTTACACACCCCTTTGTATGTCTTAAGAATGTCTACTCGATGTAA  
TAAAAOGCATCTAATACAACFTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
CAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTTTGGTATTCGAAGGCACACCTGTTTGAGTGTCTGAAATTTCTCAA  
CCCTCTTCACTTTTGTGAACGTAGTGGATTGGACTTGGAGGCTTTGCCGGGCCTCACCGCTCGGCTCCTCTCAAATGCATTAGTGCCTTT  
GTTGCGACGTGCGCCTCGGTGTGATAATTATCTACGCTGTGGTGTGCTTCTGTGGAGACGCGCTTCTAACCCTCCGAAAGGACAGC  
TTTCATCGAACTTTGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAA

















**Παράρτημα 3.** Φυλογενετικές ομοιότητες (%) των στελεχών FGAR-1, FGAR-2, FGAR-23A, FGAR-23B, FFWW-3, FFWW-12B, FFWW-14, FFWW-15, Fgold-17 και Fgold-20, με στελέχη του γένους *Penicillium*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	-																					
2	99.6	-																				
3	99.6	99.6	-																			
4	99.8	99.8	99.8	-																		
5	99.3	99.3	99.3	99.4	-																	
6	96.4	96.4	96.4	96.6	96.4	-																
7	96.4	96.4	96.4	96.6	96.4	100	-															
8	96.4	96.4	96.4	96.6	96.4	99.6	99.6	-														
9	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	-													
10	96.7	96.6	96.6	96.8	96.3	98.0	98.0	98.0	99.8	-												
11	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	-											
12	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	-										
13	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	-									
14	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	-								
15	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	100	-							
16	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	100	100	-						
17	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	100	100	100	-					
18	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	100	100	100	100	-				
19	96.8	96.8	96.8	97.0	96.5	98.2	98.2	98.2	100	99.8	100	100	100	100	100	100	100	100	-			
20	96.7	96.7	96.7	96.8	96.3	98.0	98.0	98.0	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	-	
21	97.2	97.2	97.2	97.4	96.8	99.1	99.1	98.7	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9

**Επεξήγηση:** 1. Στέλεχος FFWW-12B: 2. Στέλεχος FGold-17: 3. Στέλεχος Fgold-20: 4. *Penicillium roqueforti*, DQ117966: 5. *Penicillium carneum*, X82359: 6. *Penicillium expansum* ATCC7861, AY373912: 7. Στέλεχος FFWW-3: 8. *Penicillium italicum* ATCC48114, AY373920: 9. Στέλεχος FGAR-23A: 10. Στέλεχος FGAR-23B: 11. Στέλεχος FGAR-2: 12. Στέλεχος FGAR-1: 13. Στέλεχος FFWW-14: 14. *Penicillium italicum*, AJ250548: 15. isolate LB68A1A2, AY770409: 16. *Penicillium solitum* var. *crustosum*, AY373907: 17. *Penicillium commune*, AF455527: 18. *Penicillium expansum*, AY425984: 19. *Penicillium griseoroseum*, AY425983: 20. Στέλεχος FFWW-15: 21. *Penicillium coprophilum*, AJ608952.



**Παράρτημα 4.** Φυλογενετικές ομοιότητες (%) των στελεχών FFWW-3A, FFWW-7, FFWW-18A, FFWW-18B και FFWW-25, με στελέχη των γενών *Geotrichum* και *Dipodascus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-										
2	99.4	-									
3	99.7	99.7	-								
4	99.7	99.7	100	-							
5	99.7	99.7	100	100	-						
6	97.2	97.2	97.6	97.6	97.6	-					
7	95.0	95.0	95.4	95.4	95.4	95.0	-				
8	92.6	92.6	92.9	92.9	92.9	92.6	97.3	-			
9	94.4	94.4	94.7	94.7	94.7	95.0	97.6	95.1	-		
10	95.6	95.6	95.9	95.9	95.9	96.2	97.5	95.0	96.9	-	
11	96.3	96.3	96.6	96.6	96.6	95.3	96.9	94.1	95.0	95.5	-

**Επεξήγηση:** 1. Στέλεχος FFWW-7: 2. Στέλεχος FFWW-18B: 3. Στέλεχος FFWW-3A: 4. Στέλεχος FFWW-18A: 5. Στέλεχος FFWW-25: 6. isolate olrim943, AY787702: 7. *Geotrichum candidum*, AJ279445: 8. *Geotrichum klebahnii*, AF015250: 9. isolate Po67, Y211069: 10. isolate Ccre7, AF481862: 11. *Dipodascus australiensis*, AF157596.

**Παράρτημα 5.** Φυλογενετικές ομοιότητες (%) του στελέχους FGAR-25, με στελέχη των γενών *Cladosporium* και *Mycosphaerella*.

	1	2	3	4	5	6	7
1	-						
2	99.8	-					
3	100	99.8	-				
4	99.8	99.6	99.8	-			
5	99.8	99.6	99.8	100	-		
6	99.8	99.6	99.8	100	100	-	
7	99.8	99.6	99.8	100	100	100	-

**Επεξήγηση:** 1. isolate its297, AF502812: 2. Στέλεχος FGAR-25: 3. *Cladosporium cladosporioides*, AY361966: 4. *Cladosporium tenuissimum*, AF393724: 5. *Cladosporium oxysporum*, AJ300332: 6. *Cladosporium cucumerinum*, AF393697: 7. *Mycosphaerella tassiana*, AY361985.

**Παράρτημα 6.** Φυλογενετικές ομοιότητες (%) του στελέχους Fgold-25, με στελέχη των γενών *Stereum* και *Xylobolus*.

	1	2	3
1	-		
2	99.6	-	
3	99.5	99.5	-

**Επεξήγηση:** 1. *Stereum hirsutum*, AY854063: 2. *Xylobolus annosus*, DQ000294: 3. Στέλεχος FGold-25.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G. and Zervakis, G. I. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 353-360.

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., Mimms, C. W. and Blackwell, G. D. (1996). *Introductory Mycology* (4<sup>th</sup> edition).

Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J. A. and Garcia-Romera, I. (2004). Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 132-135.

Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M. and Parish, M. E. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1955-1961.

Assas, N., Marouani, L. and Hamdi, M. (2000). Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering* **22**, 503-507.

Atagana, H. I. (2004). Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**, 851-858.

Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S. and Hamdi, M. (2005). Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 7-11.

Balis, C., Chatzipavlidis, J. and Flouri, F. (1996). Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 169-178.

Bartnicki, S. and Garcia, S. (1987). The cell wall in fungal evolution, pp. 389-403. In: A. D. M. Rayner, C. M. Brasier, and D. Moore (eds.), *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press, New York.

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.

Becard, G. and Pfeffer, P. E. (1993). Status of Nuclear Division in Arbuscular Mycorrhizal Fungi During In-Vitro Development. *Protoplasma* **174**, 62-68.

Bending, G. D., Friloux, M. and Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters* **212**, 59-63.

Berbee, M. L., Yoshimura, A., Sogiyama, J. and Taylor, J. W. (1995). Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S, and ITS ribosomal sequence data. *Mycologia* **87**, 210-222.

Blomquist, G., Andersson, B., Andersson, K. and Brondz, I. (1992). Analysis of fatty acids. A new method for characterization of moulds. *Journal of Microbiological Methods* **16**, 59-68.

Boari, G., Brunetti, A., Passino, R. and Rozzi, A. (1984). Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters. *Agricultural Wastes* **10**, 161-171.

Boekhout, T. (1991). A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. *Studies in Mycology* **33**, 1-194.

Borja, R., Martin, A., Gomez, L. F. and Ramos-Cormenzana, A. (1993). Anaerobic digestion of olive mill wastewater pretreated with *Azotobacter chroococum*. *Resources, Conservation and Recycling* **9**, 201-211.

Borja, R., Martin, A., Alonso, V., Garcia, I. and Banks, C. J. (1995). Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research* **29**, 489-495.

Bouakline, A., Lacroix, C., Roux, N., Gangneux, J. P. and Derouin, F. (2000). Fungal contamination of food in hematology units. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4272-4273.

Bradley, R. M. and Baruchello, L. (1980). Primary wastes in the olive oil industry. *Effluent and Water Treatment Journal* **20**, 176-177.

Breccia, J. D., Bettucci, L., Piaggio, M. and Sineriz, F. (1997). Degradation of sugar cane bagasse by several white-rot fungi. *Acta Biotechnologica* **17**, 177-184.

Brickell, C. D., Voss, E. G., Kelly, A. F., Schneider, F. and Richens, R. H. (1980). International code of nomenclature of cultivated plants. Reg-num Veg. 36. Schlechtma & Holkema, Utrecht, The Netherlands.

Bridge, P. D. (1985). An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection Fasciculata. *Journal for General Microbiology* **131**, 1887-1895.

Buzina, W., Braun, H., Freudenschuss, K., Lackner, A. and Stammberger, H. (2003). Fungal biodiversity as found in nasal mucus. *Medical Mycology* **41**, 149-161.

Davis, J. I. (1995). Species concepts and phylogenetic analysis. *Introduction. Systematic Botany* **20**, 555-559.

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 Vries, G. A. (1952). Contribution to the Knowledge of the Genus *Cladosporium*. Hollandia Press, Baarn.

Delalibera, I. Jr., Handelsman, J. and Raffa, K. F. (2005). Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae) *Environmental Entomology* **34**, 541-547.

Doolittle, R. F., Feng, D. F., tsang, S., Cho, G. and Little, E. (1996). Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* **271**, 470-477.

Ellis, M. B. (1976). More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycol; Inst, Kew.

Eriksson, O. E., Baral, H.-O., Currah, R. S., Hansen, K., Kurtzman, C. P., Rambold, G. and Laessle, T. (2003). Outline of Ascomycota-2003. *Myconet* **9**, 1-103.

Fadil, K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A., Zaid, A. and Borja, R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51**, 37-41.

Filipakopoulou, T., Loulakis, X., Zorpas, A. and Vlyssides, A. G. (1999). Treatment of waste water from table olive industries by Fenton's reactions, pp. 109-113. Department of Chemical Engineering, University of Thessaloniki, Greece.

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. (1994). Classification of organisms by secondary metabolites, pp.303-321. In D. L. Hawksworth (ed.), *The identification and characterization of pest organisms*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Garcia, I. G., Pena, P. R. J., Venceslada, J. L. B., Martin, A. M., Santos, M. A. M. and Gomez, E. R. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* **35**, 751-758.

Giannoutsou, E. P., Meintanis, C. 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.

Golenberg, E. M., Giannasi, D. E., Clegg, M. T., Smiley, C. J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski, G. (1990). Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* **344**, 656-658.

Gopinath, S., Hilda, A. and Ramesh, V. M. (1998). Detection of biodegradability of oils and related substances. *Journal of Environmental Biology* **19**, 157-165.

Graser, Y., El Fari, M., Presber, W., Sterry, W. and Tietz, H.-J. (1998). Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *British Journal of Dermatology* **138**, 576-582.

Greuter, W., Barrie, F. R., Burdet, H. M., Chaloner, W. G., Demoulin, V., Hawksworth, D. L., Jorgensen, P. H., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Trehane, P. and McNeill, J. (1994). International code of botanical nomenclature (Tokyo Code) adopted by the Fifteenth International Botanical Congress, Yokohama, August-September 1993. Regnum Veg. 131. Koeltz Scientific Books, Konigstein, Germany.

Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A. M. (1999). Developments in Fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 454-500.



Gueho, E., Improvisi, L., Christen, R. and de Hoog, G. S. (1993). Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie Leeuwenhoek* **63**, 175-189.

Haugland, R. A., Varma, M., Wymer, L. J. and Vesper, S. J. (2004). Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 198-210.

Hawksworth, D. L. (1993). Name changes for purely nomenclatural reasons are now avoidable. *Systematic Ascomycetum* **12**, 1-6.

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. (1995). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 8<sup>th</sup> ed.. International Mycological Institute, Egham, United Kingdom.

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

Ingold and Hudson (1993). *The Biology of Fungi*. Academic Press, New York.

Kohn, L. M. (1992). Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* **84**, 139-153.

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

Kuhn, G., Hijri, M., Sanders, I. R. (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414**, 745-748.

Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**, 1727-1740.

Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (1998). *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

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

Larone, D. H. (1995). *Medically Important Fungi – A Guide to Identification*, 3<sup>rd</sup> ed. ASM press, Washington D.C.

Larsen, M. D. and Jensen, K. (1999). The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 159-166.

Lechevalier, H. and Lechevalier, M. P. (1988). Chemotaxonomic use of lipids—an overview, pp. 869-902. In: C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.

Lesova, K. and Sturdikova, M. (2000). Antifungal metabolites produced by micromycetes, *Chemical Listy* **94**, 21-27.

Link (1809). Genus *Penicillium*. *Magazin Ges. naturf. Freunde, Berlin* **3**, 16.

Link (1809). Genus *Geotrichum*. *Magazin Ges. naturf. Freunde, Berlin* **3**, 17.

Link (1816). Genus *Cladosporium*. *Magazin Ges. naturf. Freunde, Berlin* **7**, 37.

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

Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L. and Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **30**, 1914-1918.

Millan, B., Lucas, R., Robles, A., Garcia, T., de Cienfuegos, G. A. and Galvez, A. (2000). A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential. *Microbiological Research* **155**, 143-147.

Millner, P. C., Motta, J. J. and Lentz, P. L. (1977). Ascospores, germ pores, ultrastructure and thermophilism of *Chaetomium*. *Mycologia* **69**, 720-733.

McGinnis, M. R., Rinaldi, M. G. and Winn, R. E. (1986). Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Journal of Clinical Microbiology* **24**, 250-259.

Morton, J. B. (1988). Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* **32**, 267-324.

Moss, C. W. (1981). Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. *Journal of Chromatography* **203**, 337-347.

Muezzinoglu, A. and Uslu, O. (1986). Alleviation of pollution due to olive oil production, some practical considerations from Turkey, pp. 159-168. International Symposium on Olive By Products Valorization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Seville.

Nikoh, N., Hayase, N., Iwabe, N., Kuma, K. and Miyata, T. (1994). Phylogenetic relationships of the kingdom Animalia, Plantae and Fungi, inferred from 23 different protein species. *Molecular Biology and Evolution* **11**, 762-768.

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

Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K. and Jong, S.-C. (2004). Comparative analysis of common indoor *Cladosporium* species based on molecular data and conidial characters *Mycotaxon* **89**, 441-451.

Paterson, R. R. M. (1986). Standardized one-and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. *Journal Chromatography* **368**, 1599-1609.

Paterson, R. R. M. and Bridge, P. D. (1994). *Biochemical techniques for filamentous fungi*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Peterson, S. W., Perez, J., Vega, F. E. and Infante, F. (2003). *Penicillium brocae*, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. *Mycologia* **95**, 141-147.

Pitt, J. (1980). *The Genus Penicillium*. Academic Press, New York.

Perez, J., de la Rubia, T., Moreno, J. and Martinez, J. (1992). Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**, 489-495.

Pers. (1794). Genus *Stereum*. *Neues Mag. Bot.* **1**, 110.

Pers. (1800). *Stereum hirsutum*. *Observ. mycol. (Lipsiae)* **2**, 90.

Potin, O., Veignie, E. and Rafin, C. (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* **51**, 71-78.

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.

Ramirez, C. (1982). *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, New York.

Ride, W. D. L., Sabrosky, C. W., Bernard, G. and Melville, R. V. (1985). *International code of zoological nomenclature*, 3<sup>rd</sup> ed. International Trust for Zoological Nomenclature, London, United Kingdom.

Robles, A., Lucas, R., de Cienfuegos, G. A. and Galvez, A. (2000). Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology* **74**, 217-221.

Romero, A. J. and Minter, D. W. (1988). Fluorescence microscopy: an aid to the elucidation of ascomycete structures. *British Mycological Society* **90**, 457-470.

Sandhu, G. S., Kline, B. C., Stockman, L. and Roberts, G. D. (1995). Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2913-2919.

Sanjust, E., Pompei, R., Rinaldi, A. and Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 223-235.

Schussler, Schwartzott and Walker (2001). A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**, 1413-1421.

Sneath, P. H. A. (1992). International code of nomenclature of bacteria. 1990. *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*

Sogin, M. L. (1989). Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *American Zoology* **29**, 487-499.

Stahl, P. D. and Klug, M. J. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied Environmental Microbiology* **62**, 4136-4146.

Stolk, A. C. and Samson, R. A. (1983). The ascomycete genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs. *Studies in Mycology* **23**, 112-117.

Sutton, D. A., Forthergill, A. W. and Rinaldi M. G. (1998). Guide to Clinically Significant Fungi, 1<sup>st</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Tardioli, S., Toth, E. G. and Santori, F. (1997). Species-specific selection on soil fungal population after olive mill wastewater treatment. *Chemosphere* **34**, 2329-2336.

Taylor, J. W., Swan, F. C. and Berbee, M. L. (1994). Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties, pp. 201-212. In: Molecular evolution of ascomycete fungi: phylogeny and conflict, D. L. Hawksworth (ed.). Plenum Press, New York.

Tsonis, S. (1988). Elaboration of olive oil mill waste waters. Ph.D. thesis, Civil Engineering Department of Patras University, Greece.

Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E. and van Den-Abeelee, K. (1989). Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of non-fermenting gram-negative bacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 1538-1542.

Vilgalys, R. (1988). Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* **78**, 698-702.

Wang, C. J. K. and Zabel, R. A. (1990). Identification manual for fungi from utility poles in the eastern United States. American Type Culture Collection, Rockville, Md.

Whalley, A. J. S. and Edwards, R. L. (1995). Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. *Canadian Journal of Botany* **73 (Suppl. 1)**, S802-S810.

Wirsel, S. G. R., Leibinger, W., Ernst, M. and Mendgen, K. W. (2001). Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* **149**, 589-598.

Wirsel, S. G., Runge-Frobose, C., Ahren, D. G., Kemen, E., Oliver, R. P. and Mendgen, K. W. (2002). Four or more species of *Cladosporium* sympatrically colonize *Phragmites australis*. *Fungal Genetics and Biology* **35**, 99-113.

White, T., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In: PCR protocols, M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.). Academic Press, Inc., New York.

Yaguchi, T., Someya, A. and Udagawa, S. (1996). A reappraisal of intrageneric classification of *Talaromyces* based on the ubiquinone systems. *Mycoscience* **37**, 55-60.

Yamada, Y., Sugihara, K., van Eijk, G. W., Roeijmans, H. J. and de Hoog, G. S. (1989). Coenzyme Q systems in ascomycetous black yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* **56**, 349-356.

Yurlowa, N. A. and de Hoog, G. S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie Leeuwenhoek* **72**, 141-147.

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.

#### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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>).

Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/>

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