

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ολοκληρωμένη διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείου με τη
χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*

Παναγιώτης Κουτσούλης

Καλαμάτα, Απρίλιος 2007

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ολοκληρωμένη διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείου με τη
χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*

Παναγιώτης Κουτσούλης

Εισηγητής: Δρ Σπυρίδων Ντούγιας

Καλαμάτα, Απρίλιος 2007

Πρόλογος

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

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στο Δρ. Ζερβάκη Γεώργιο, Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας και επιστημονικό υπεύθυνο του προγράμματος “Integrated treatment and remediation of recalcitrant agricultural and industrial wastes with high content in polyphenolics and dyes” (Czech Ministry of Education – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας) στα πλαίσια του οποίου εντάσσεται η παρούσα εργασία, καθώς επίσης την Ασιμούλα Καρδιμάκη και το λοιπό προσωπικό του Ινστιτούτου για τη διευκόλυνση στην πραγμάτωση της παρούσας εργασίας.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών λευκής σήψεως των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

Για την πραγμάτωση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη βασιδιομυκήτων: τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22, *Pleurotus eryngii* LGAM P66, *Ganoderma australe* IK-1600 και *Ganoderma carnosum* IK-1642. Κατά την μελέτη της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας, των ολικών φαινολικών συστατικών και του βαθμού αποχρωματισμού τους καθώς και υπολογισμός της ενεργότητας λιγνινολυτικών ενζύμων.

Βάση των πειραματικών δεδομένων διαπιστώθηκε ότι τα τέσσερα στελέχη βασιδιομυκήτων προκάλεσαν σημαντική μείωση του χρώματος και του φαινολικού φορτίου έως 65% και 81% αντιστοίχως. Μείωση της φυτοτοξικότητας παρατηρήθηκε μόνο στους χειρισμούς με τα στελέχη του γένους *Pleurotus* (έως και 27% μείωση αυτής).

Συμπερασματικά, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην αποδόμηση των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ, αφού όλοι οι παράμετροι-χαρακτήρες που προσδιορίστηκαν (μείωση φαινολικών, χρώματος και φυτοτοξικότητας) βελτιώθηκαν σημαντικά, προσδιορίζοντας παράλληλα σημαντικές τιμές ενεργότητας του ενζύμου λακκάση..

Abstract

The aim of this project was to study the degradation of olive mill wastewaters using four basidiomycetous strains growing on olive mill wastewaters. To achieve this scope four white-rot fungi were used: *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22, *Pleurotus eryngii* LGAM P66, *Ganoderma australe* IK-1600 and *Ganoderma carnosum* IK-1642. In this experiment germination index, phenolic content and decolorization as well as activities of ligninolytic enzymes were determined.

The results showed that both *Ganoderma* and *Pleurotus* spp. tested caused significant decolorization and phenolic reduction up to 65% and 81% respectively. Phytotoxicity was decreased only in the OMW media treated by *Pleurotus* species (germination index was increased by 20-27% for the two *Pleurotus* strains tested).

In conclusions, *Pleurotus* spp. of the present study resulted in significant detoxification of the olive mill wastewaters (OMW), since they led to significant phenolic content, color and phytotoxicity decrease as well as to expression of high laccase activity.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABTS: 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid

BOD: Biological Oxygen Demand (βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο)

COD: Chemical Oxygen Demand (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο)

DMAB: 3-dimethylaminobenzoic acid

LiP: λιγνίνη υπεροξειδάση

MBTH: 3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrason-hydrochloride

MnP: εξαρτώμενη του μαγγανίου υπεροξειδάση

ΥΑΕ: υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	I
Περίληψη.....	II
Abstract.....	III
Συνοπτομογραφίες.....	IV
Περιεχόμενα.....	V
Περιεχόμενα Εικόνων.....	VII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.1. Τύποι ελαιοτριβείων	1
1.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων.....	2
1.2.1. Παραγόμενες ποσότητες υγρών απόβλητων ελαιοτριβείων	3
1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων	3
1.4. Περιβαλλοντική μόλυνση που προκαλείται από την παραγωγή αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	3
1.5. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων	4
1.5.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι	4
1.5.2. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες	5
1.5.3.. Επεξεργασία παράλληλη με πυρηνόξυλο	6
1.6. Χρήσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων	6
1.7. Παραδείγματα βιοαποικοδόμησης αποβλήτων ελαιοτριβείων	8
1.8. Δράση του ενζύμου λακκάση	10
1.9. Δράση της Mn-υπεροξειδάσης	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	13
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1. Επιλεγμένα στελέχη μικροοργανισμών – Προέλευση και διατήρηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).....	13
2.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων με ΥΑΕ.....	13
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....	14
2.4. Μέτρηση βιομάζας (ξηρό βάρος).....	15
2.5. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου	15
2.6. Μέτρηση δείκτη βλαστικότητας	16
2.7. Μέτρηση αποχρωματισμού	17
2.8. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση	18

2.9. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn- υπεροξειδάση	18
2.9.1. Προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn- υπεροξειδάση.....	18
2.9.2. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάσης (μη εξαρτημένης του Mn).....	20
2.9.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn – υπεροξειδάση.....	21
2.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.....	22
2.11. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ.....	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1. Προσδιορισμός βιομάζας.....	24
3.2. Μελέτη του αποχρωματισμού υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	24
3.3. Μελέτη της μείωσης του φαινολικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	25
3.4. Μελέτη της μείωσης της φυτοτοξικότητας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	26
3.5. Μελέτη της δράσεως του ενζύμου λακκάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	27
3.6. Μελέτη της δράσεως των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	31
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 3.1. Αποχρωματισμός υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	25
Εικόνα 3.2. Μείωση του φαινολικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	26
Εικόνα 3.3. Μελέτη της βαθμού μεταβολής της φυτοτοξικότητας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	27
Εικόνα 3.4. Δράση του ενζύμου λακκάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	28
Εικόνα 3.5. Δράση του ενζύμου υπεροξειδάση-μη εξαρτώμενης του Mn σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	29
Εικόνα 3.6. Δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών <i>Ganoderma</i> και <i>Pleurotus</i>	30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1. Τύποι ελαιοτριβείων.

Τα ελαιοτριβεία στα οποία γίνεται η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: τα κλασσικά-παραδοσιακά ελαιοτριβεία, τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία και τα μεικτού τύπου. Η εξαγωγή του ελαιολάδου περιλαμβάνει σε όλους τους τύπους την σύνθλιψη του καρπού και τη μάλαξη της ελαιοζύμης, αλλά διαφέρει στην διαδικασία διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη (Bořja *et al.*, 1995).

Στα κλασσικά-παραδοσιακά ελαιοτριβεία, η ελαιοζύμη διοχετεύεται σε υδραυλικό πιεστήριο. Με την πίεση από το μηχάνημα έχουμε διαχωρισμό της υγρής φάσης (ελαίου και νερού) από τον ελαιοπυρήνα. Τέλος, η υγρή φάση υπόκειται σε έναν ακόμη διαχωρισμό ώστε να παραλάβουμε το ελαιόλαδο (Hamdi, 1992).

Ο κύριος τύπος ελαιοτριβείων είναι τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία που διακρίνονται σε συστήματα τριών και δύο φάσεων. Στα ελαιοτριβεία τριών φάσεων πραγματοποιείται μία πρώτη φυγοκέντρωση όπου γίνεται αραίωση της ελαιοζύμης με νερό και διαχωρισμός του ελαίου από την ελαιοπυρήνα και το νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντρωση του ελαίου ώστε να παραλάβουμε το καθαρό ελαιόλαδο (Bořja *et al.*, 1995). Τα υγρά υπολείμματα που αποβάλλονται κατά την διάρκεια των δύο φυγοκεντρήσεων αποτελούν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ), ενώ τα στερεά υπολείμματα που προκύπτουν από την σύνθλιψη του καρπού και την εξαγωγή του ελαιολάδου αποτελούν την ελαιοπυρήνα, από τον οποίο με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, συνήθως εξάνιο, λαμβάνεται το πυρηνέλαιο και το πυρηνόξυλο στα πυρηνοελαιοτριβεία (Gonzalez *et al.*, 1993).

Οι βιομηχανίες ελαιολάδου στην προσπάθεια της μείωσης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου και του κόστους λειτουργίας των ελαιοτριβείων οδηγήθηκαν στη χρήση ενός νέου τύπου φυγοκεντρικού διαχωριστήρα, τον διαχωριστήρα δύο φάσεων ο οποίος σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως σε αρκετές μεσογειακές ελαιοπαραγωγικές χώρες (Jones *et al.*, 2000). Η αρχή λειτουργίας αυτού βασίζεται στο διαχωρισμό της ελαιοζύμης σε δύο φάσεις, μία υγρή η οποία περιέχει το ελαιόλαδο και μία ημιστερεή γνωστή ως ελαιοπυρηνόλυμα, η οποία περιέχει τον ελαιοπυρήνα μαζί με τα φυτικά υγρά του καρπού (Albuquerque *et al.*, 2004). Το χαρακτηριστικό στοιχείο αυτής της μεθόδου είναι η χρήση

νερού μόνο στον ελαιοδιαχωριστήρα και όχι κατά τη διάρκεια μάλαξης της ελαιοζύμης (Gonzalez *et al.*, 1990).

Τα μεικτού τύπου ελαιουργεία, δεν έχουν μεγάλη απήχηση, διότι ο διαχωρισμός του ελαίου από την ελαιοζύμη παρουσιάζει μεγαλύτερη δυσκολία σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου. Αυτό συμβαίνει διότι το υλικό κατασκευής των ελαιοτριβείων αυτών παρουσιάζει μεγάλη συνάφεια με τις σταγόνες ελαίου που υπάρχουν στο μίγμα με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να διηθηθούν. Το έλαιο έτσι υπόκειται σε μια διαδικασία φυγοκέντρισης από την ελαιοζύμη ώστε να παραλάβουμε το καθαρό ελαιόλαδο (Jones *et al.*, 1996).

1.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων.

Κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου σε ελαιοτριβεία τριών φάσεων παράγονται μία λιπαρή φάση (20%), ένα στερεό υπόλειμμα (30%) και μία υδάτινη φάση (50%). Η υδάτινη αυτή φάση αποτελεί τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου (YAE), των οποίων η χημική σύσταση ποικίλλει ανάλογα με τον τόπο προέλευσης, την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης του ελαιοκάρπου (Borja *et al.*, 1993). Τα YAE είναι σκουρόχρωμα με pH μεταξύ 4 έως 6 και περιέχουν 83% νερό, 15% οργανικό υλικό και 1.8% άλλα συστατικά εκ των οποίων τα κυριότερα είναι οι πολυφαινόλες, διάφορα οργανικά οξέα και ανόργανα άλατα. (Moreno *et al.*, 1987). Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή αγωγιμότητα οφειλόμενη στις υψηλές συγκεντρώσεις Na^+ και K^+ (Moreno *et al.*, 1987). Επίσης, περιέχουν σάκχαρα, τανίνες, πολυαλκοόλες, πηκτίνες και λιπίδια (Hamdi *et al.*, 1993; Yesilada *et al.*, 1998).

Κατά τη εξαγωγή του ελαιολάδου στα φυγοκεντρικά συστήματα δύο φάσεων παράγεται ένα ημιστερεό υπόλειμμα γνωστό ως ελαιοπυρηνόλυμα (στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει ο Ισπανικός όρος *alpeogujjo*) που αποτελείται από τον ελαιοπυρήνα και τα φυτικά υγρά του καρπού. Τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων παράγουν λιγότερα απόβλητα σε όγκο αλλά το ρυπαντικό τους φορτίο είναι πιο υψηλό σε αντίθεση με τους άλλους διαχωριστήρες διότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση τοξικών συστατικών ανά μονάδα όγκου. Η σύσταση τους είναι παρόμοια με αυτήν υγρών αποβλήτων, περιέχοντας λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες καθώς και ένα μικρό αλλά ενεργό κλάσμα πολυφαινολικών ουσιών. Παρουσιάζουν υψηλή αγωγιμότητα, ενώ μετά από παραμονή λίγων μηνών παρουσιάζουν και χαμηλή ενεργότητα του ύδατος (a_w).

1.2.1. Παραγόμενες ποσότητες υγρών απόβλητων ελαιοτριβείων.

Η παραγωγή των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι εξαιρετικά υψηλή στις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Η παραγωγή των ΥΑΕ στην περιοχή της Μεσογείου υπολογίζεται στα 30 εκατομμύρια κυβικά μέτρα δημιουργώντας σημαντικά προβλήματα τόσο στην διαχείριση των μεγάλων ποσοτήτων όσο και στην αποδόμηση αυτών. Η παραγωγή των ΥΑΕ αποτελεί κύριο πρόβλημα για την Ισπανία, την Ιταλία, την Ελλάδα οι οποίες παράγουν το 78% του ελαιολάδου παγκοσμίως (Bořja *et al.*, 1995). Στην Ελλάδα έχει υπολογιστεί ότι παράγονται 1.5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων και περίπου 400.000 τόνοι στερών υπολειμμάτων (Οιχαλιώτης *et al.*, 1999).

1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) οφείλουν την αντιμικροβιακή τους δράση στις ενεργές ουσίες του ελαιοκάρπου που μεταφέρθηκαν στην υδατική φάση κατά τη διαδικασία διαχωρισμού του ελαιοκάρπου από την ελαιοζύμη. Η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ οφείλεται στα φαινολικά τους οξέα, όπως πυροκατεχίνη, τυροσόλη, πυροκατεχικό οξύ και καφεϊκό οξύ (de Caro *et al.*, 1959; Ragazzi *et al.*, 1967; Sorlini *et al.*, 1986; Rodriguez *et al.*, 1988; Bořja *et al.*, 1990), στα λιπαρά τους οξέα (Ragazzi *et al.*, 1967; Gonzalez *et al.*, 1990) καθώς και στο υψηλό τους οργανικό φορτίο (Ntougias *et al.*, 2003). Οι ενεργές αυτές ουσίες εμφανίζουν ανασταλτική δράση ενάντια Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, καθώς και στην περίπτωση πολλών κατηγοριών μυκήτων.

1.4. Περιβαλλοντική μόλυνση που προκαλείται από την παραγωγή αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων, τόσο στερεά όσο και υγρά, προκαλούν σοβαρά προβλήματα στις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Στις χώρες αυτές, τα ΥΑΕ διοχετεύονται σε υδάτινα περιβάλλοντα όπως λίμνες, ποτάμια, ακτογραμμές και υδροφόρους ορίζοντες, διαταράσσοντας την ισορροπία των οικοσυστημάτων αυτών. Επίσης, τα ΥΑΕ επηρεάζουν με την τοξικότητα που παρουσιάζουν την πανίδα κυρίως των υδατικών περιβαλλόντων (Fiesta Ros De Ursinos, 1966). Τα ημιστερεά υπολείμματα ελαιοτριβείων δύο φάσεων

απορρίπτονται σε εδάφη πλησίον των ελαιοτριβείων αυξάνοντας τη βιοτοξικότητα αυτών και υποβαθμίζοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες και δομή των εδαφών αυτών. Τονίζεται ότι το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνου ανά λίτρο υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου εκτιμάται σε 25.000 mg (Perez *et al.*, 1980).

1.5. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Παρόλη την εντατική προσπάθεια αντιμετώπισης του προβλήματος που προκαλείται από την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων ελαιοτριβείων, αποτελεσματική λύση δεν έχει βρεθεί προς το παρόν (Hamdi, 1993; Dias *et al.*, 2004). Εντούτοις, η μελέτη της αποδόμησης των ΥΑΕ παρουσιάζει δυσκολίες λόγω των μεγάλων αποκλίσεων τους στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά.

1.5.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι.

Για την αποδόμηση των ΥΑΕ αρκετές φυσικοχημικές τεχνικές έχουν συσταθεί από τις οποίες άλλες είναι αποτελεσματικές σε μεγάλο βαθμό και άλλες όχι .

Μία από τις μεθόδους που έχουν προταθεί είναι η υπερδιήθηση των ΥΑΕ η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια μεμβρανών που λόγω του πορώδους τους διαχωρίζουν τις διαλυμένες ουσίες των αποβλήτων αυτών με βάση το μέγεθος τους (Lopez Aparicio *et al.*, 1977).

Κατά τη πειραματική μελέτη της μεθόδου της αντίστροφης ώσμωσης βρέθηκε ότι προκαλείται μείωση έως και 99% τόσο του BOD (Biological Oxygen Demand=Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο) όσο και του COD (Chemical Oxygen Demand = Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο). Πολλές φορές πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των ΥΑΕ και κατόπιν εφαρμογή της τεχνικής της αντίθετης ώσμωσης, αποσκοπώντας τόσο σε μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων όσο και στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και των σακχάρων από τα άλλα οργανικά συστατικά (Perez *et al.*, 1982).

Ένας άλλος τρόπος επεξεργασίας των ΥΑΕ είναι η εφαρμογή της ηλεκτροδιάλυσης που στηρίζεται στην μετακίνηση τοξικών ουσιών μέσω συνδυασμένης δράσης ημιπερατών μεμβρανών και ηλεκτρικών πεδίων. Παρόλο την αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής

το μεγάλο κόστος την καθιστά ασύμφορη σαν τρόπο διαχείρισης των ΥΑΕ (Vazquez et al., 1974).

Η μέθοδος της θερμικής συμπύκνωσης των ΥΑΕ, που στηρίζεται στην εξάτμιση και την συμπύκνωση αυτών μειώνει τον όγκο των ΥΑΕ κατά 75%, ενώ παράλληλα υπάρχει δυνατότητα συλλογής και ανάκτησης του απομακρυσμένου ύδατος. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η διαχείριση και η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων στερεών αποβλήτων που προκύπτουν από την εξάτμιση των ΥΑΕ (Gonzalez *et al.*, 1982). Επιπλέον, η αποτέφρωση των στερεών αποβλήτων και η χρήση τους ως καύσιμη ύλη έχει προταθεί ως μέθοδος διαχείρισης αυτών (Agrino και Carola, 1975).

Η εφαρμογή αντιδραστηρίων όπως $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO και άλλων πολυηλεκτρολυτών έχει βοηθήσει μερικώς στην διαχείριση των αποβλήτων των ΥΑΕ αφού προκαλεί αύξηση του pH και μείωση της δυσοσμίας των ΥΑΕ. Επίσης, η χρήση αυτών των αντιδραστηρίων συντελεί στην κατακρήμνιση τοξικών προς το περιβάλλον συστατικών των ΥΑΕ (Fiestas Ros de Ursinos, 1977).

Τέλος, μία ακόμη μέθοδος αποδόμησης των ΥΑΕ είναι η εφαρμογή του αντιδραστηρίου Fenton, το οποίο προκαλεί τη χημική οξείδωση του οργανικού τους φορτίου με ταυτόχρονο αποχρωματισμό των αποβλήτων. Το αντιδραστήριο Fenton αποτελείται από υπεροξείδιο του υδρογόνου και ένα σιδηρούχο άλας, τα οποία σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνουν το οργανικό φορτίο των αποβλήτων. Η μέθοδος, όμως αυτή μειονεκτεί καθότι, κατά τη διαδικασία αποικοδόμησης των ΥΑΕ, συχνά παράγονται τοξικά συστατικά από την οξείδωση της οργανικής ύλης. Επιπλέον, προβάλλει δύσκολος ο καθορισμός των καλύτερων δυνατών συνθηκών για την τέλεση της αντίδρασης όπως είναι η ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας, και των αρχικών συγκεντρώσεων του H_2O_2 και του σιδηρούχου άλατος (Saiz-Jimenez *et al.*, 1986).

1.5.2. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες.

Μια από τις μεθόδους απομάκρυνσης των ΥΑΕ είναι η διοχέτευση αυτών στο έδαφος με σκοπό την απορρόφηση τους και την βιοαποικοδόμηση τους από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η εφαρμογή των ΥΑΕ σε εδαφικούς αποδέκτες φαίνεται ότι είναι μια μέθοδος αρκετά υποσχόμενη, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν εμφανίζονται ζημιογόνες συνέπειες στις καλλιέργειες όπου γίνεται αυτή η εφαρμογή αφού συνήθως αυξάνεται η τοξικότητα των εδαφών αυτών (Andrich *et al.*, 1992).

Περαιτέρω μελέτη της εφαρμογή αυτής μπορεί να οδηγήσει, κάτω από προϋποθέσεις, σε χρήση των αποβλήτων αυτών στη λίπανση αγροτεμαχίων, εξαιτίας του πλούσιου τους οργανικού φορτίου και των αυξημένων τους ποσοτήτων καλίου, φωσφόρου και μαγνησίου (Andrich *et al.*, 1992). Έχει πειραματικά διαπιστωθεί ότι τα ΥΑΕ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιορισμένες ποσότητες σαν μέθοδος λίπανσης μόνο αν η εφαρμογή των αποβλήτων αυτών πραγματοποιείται τρεις εβδομάδες νωρίτερα από την σπορά, αφού τα μεγαλύτερα προβλήματα φυτοτοξικότητας προκαλούνται από τα ΥΑΕ κατά διάρκεια της εκβλάστησης (Krogmeier *et al.*, 1989; Casa *et al.*, 2003). Η λίπανση πρέπει επίσης να γίνει σταδιακά και όχι μονομιάς έτσι ώστε τα αποτελέσματα της καλλιέργειας να είναι τα επιθυμητά .

1.5.3. Επεξεργασία παράλληλη με πυρηνόξυλο.

Η μέθοδος επεξεργασίας των ΥΑΕ τα τελευταία χρόνια με πυρηνόξυλο έχει έντονα εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια κυρίως σε πειραματικό στάδιο. Το πλούσιο οργανικό φορτίο των ΥΑΕ διευκολύνει τη χρήση του σαν κατάλληλο υπόστρωμα για θερμοφίλους/θερμοανθεκτικούς μικροοργανισμούς (Μπαλής, 1984).

Αρχικά έχουμε διαβροχή του πυρηνόξυλου με τα ΥΑΕ σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας ώστε να υπάρχουν τα κατάλληλα κριτήρια για να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί. Με το πέρας της διαδικασίας αερόβιας χώνευσης, το τελικό προϊόν προκαλεί συνήθως αύξηση της γονιμότητας του εδάφους και βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους (Balis *et al.*, 1991).

Το κυριότερο πρόβλημα αυτής της μεθόδου είναι η διαφορετική σύσταση των αποβλήτων ελαιοτριβείων που δυσχεραίνει την ρύθμιση των συνθηκών της αερόβιας χώνευσης, καθώς επίσης το μεγάλο χρόνο περάτωσης και το υψηλό κόστος της διαδικασίας αυτής (Balis *et al.*, 1991).

1.6. Χρήσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν πηγή πολύ σημαντικών προβλημάτων για το περιβάλλον για αυτό και καταβάλλονται συνεχείς προσπάθειες σε πειραματικό επίπεδο

ώστε να υπάρξει μια ικανοποιητική λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα με κύριο προσανατολισμό την όσο το δυνατόν καλύτερη χρήση τους.

Τα απόβλητα των διαχωριστήρων δύο φάσεων (alreoujo) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμη ύλη για την παραγωγή ενέργειας (Alburquerque *et al.*, 2004).

Επίσης, γίνονται προσπάθειες ώστε να διασπαστούν τα φαινολικά συστατικά του 'alreoujo' με σκοπό να μετατραπεί σε οργανικό υλικό που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βελτιωτικό υποστρώματος. Αυτή η διαδικασία τελείται μέσω θερμοφίλης αερόβιας ζυμώσεως.

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη απομόνωση φαινολικών συστατικών, για τη περαιτέρω χρήση τους στην τεχνολογία τροφίμων και περιβάλλοντος (Moreno *et al.*, 1990).

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή μεθανίου μέσω αναερόβιας ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο γίνεται δυνατή η περαιτέρω χρήση των ΥΑΕ για παραγωγή ενέργειας. Επίσης, παράγονται μικρότερα ποσά ιλύος που την καθιστά ως καλύτερη μέθοδο διαχείρισης των αποβλήτων αυτών. Εντούτοις, η αναερόβια ζύμωση αποτελεί μια αρκετά αργή διαδικασία, η διάρκεια της οποίας εξαρτάται από το εάν τα ΥΑΕ έχουν υποστεί προηγουμένως βιομετατροπή με αερόβια μέθοδο ή όχι αντίστοιχα, καθιστώντας την εφαρμογή της οικονομικά ασύμφορη (Fiesta *et al.*, 1981: Rozzi *et al.*, 1984: Borja *et al.*, 1993).

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων έχει προταθεί τελευταίως η χρήση τους ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών, κυρίως των στελεχών του γένους *Pleurotus*. Κατά την καλλιέργεια των μανιταριών τελείται μία διαδικασία βιομετατροπής των τοξικών, χαμηλής αξίας υλικών, σε νέα προϊόντα υψηλής αξίας. Επιπλέον, το εξαντλημένο υπόστρωμα απαλλαγμένο από τα τοξικά συστατικά, όπως φαινολικά συστατικά, μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί στη λίπανση εδαφών (Zervakis *et al.*, 1996). Το μειονέκτημα της εφαρμογής αυτής είναι η αδυναμία να απορροφηθούν μεγάλες ποσότητες αποβλήτων (Zervakis *et al.*, 1996).

Τα ΥΑΕ δεν αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών λόγω του ότι εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα. Παρόλα αυτά, κάποιες ζύμες και μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν, παράγοντας μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν, υπό προϋποθέσεις, να χρησιμοποιηθούν στην κτηνοτροφία για τη διατροφή των ζώων. Εντούτοις, η διαδικασία αυτή παρουσιάζει διάφορα προβλήματα οικονομικού και τεχνικού χαρακτήρα (Μιχελάκης, 2000).

Επίσης, τα ΥΑΕ μπορούν να δράσουν ενάντια σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Αρκετοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως για παράδειγμα ο *Pseudomonas syringae*, αναστέλλονται με αρκετά αποτελεσματικό τρόπο, ενώ υπάρχουν και αρκετοί που πιστεύουν ότι για την καταπολέμηση των ασθενειών στα φυτά αρκούν μόνο η χρήση κάποιων δραστικών ουσιών των ΥΑΕ. Τέλος, προϊόντα αερόβιας χώνευσης στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ΥΑΕ μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσεως των φυτοπαθογόνων εδάφους *Phytophthora* και *Fusarium* (Ntougias *et al.*, 2003). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι τα ΥΑΕ μπορεί να δράσουν προστατευτικά έναντι και άλλων παθογόνων εδάφους (Proietti *et al.*, 1988; Molfese and Milano, 1989; Andrich *et al.*, 1992).

1.7. Παραδείγματα βιοαποικοδόμησης αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Η επεξεργασία των ΥΑΕ αποτελεί κύριο πρόβλημα στις ελαιοπαραγωγικές χώρες και διάφορες μεθοδολογίες έχουν προταθεί χωρίς καμία από αυτές να έχει εμφανίσει ιδιαίτερη αξιοπιστία, δημιουργώντας την ανάγκη για συνέχιση των ερευνών.

Η επεξεργασία των ΥΑΕ που πραγματοποιείται κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH έχει σαν κύριο στόχο τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου. Τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας είναι είτε αεροβικής είτε αναεροβικής λειτουργίας ανάλογα με την φύση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται (Οιχαλιώτης *et al.*, 1999).

Το υψηλό οργανικό φορτίο και η περιεκτικότητα των ΥΑΕ σε άζωτο δημιουργούν κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη αζωτοβακτηρίων όπως π.χ. στελεχών του γένους *Azotobacter*. Κατά την πειραματική μελέτη των Chatjiravlidis *et al.* (1996), τα ΥΑΕ αρχικά κατεργάστηκαν με H₂O₂ μέσα σε αλκαλικό περιβάλλον και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με στέλεχος του γένους *Azotobacter*. Αυτή η διαδικασία είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των τοξικών συστατικών π.χ. μείωση των φαινολικών κατά 73%, την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και μεγάλων ποσοτήτων πολυσακχαριτών. Τα υγρά αυτά απόβλητα ελαιοτριβείων κατόπιν διοχετεύτηκαν στο έδαφος παρουσιάζοντας φυτοπροστατευτική δράση ενάντια παθογόνων εδάφους.

Κατά την χρήση του στελέχους *Panus tigrinus* CBS 577.79 σε ΥΑΕ παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ έως και 75%. Όσον αφορά την ενζυμική δραστηριότητα μετρήθηκε λακκάση ίση με 1.5 U ml⁻¹ με το πέρας των 9 ημερών, ενώ η

Mn-υπεροξειδάση παρουσίασε ενεργότητα της τάξεως των 0.25 U ml^{-1} μετά από 7 ημέρες (D'Annibale *et al.*, 2004).

Ο μύκητας *Phanerochaete flavido-alba* χρησιμοποιήθηκε σε διάφορα υποστρώματα φαινολικών συστατικών αποσκοπώντας στη μελέτη της δράσεως της Mn-υπεροξειδάσης στην αποδόμηση των ΥΑΕ. Η δράση της Mn-υπεροξειδάσης εξαρτώνταν από το είδος του υποστρώματος και κυμαίνονταν μεταξύ 6.7 έως και 30 U ml^{-1} (de la Rubia *et al.*, 2002).

Ακόμη, ο μύκητας *Pleurotus ostreatus* χρησιμοποιείται ευρέως για την βιοαποικοδόμηση των φαινολικών συστατικών κυρίως μέσω οξειδώσεων που προκαλούνται από την δράση του ενζύμου λακκάση. Συγκεκριμένα κατά την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε αποστειρωμένο και θερμικά επεξεργασμένο δείγματα ΥΑΕ παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών κατά 78% και 65% αντίστοιχα (Fountoulakis *et al.*, 2002). Επίσης, κατά την αποδόμηση των ΥΑΕ με τη χρήση του παραπάνω μικροοργανισμού, παράχθηκε ποσότητα ενζύμου λακκάσης δραστηριότητας 60 U l^{-1} , που διατηρήθηκε για χρονικό διάστημα 11 ημερών (Aggelis *et al.*, 2003).

Κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με το βακτήριο του είδους *Lactobacillus plantarum* παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών, του χρώματος και του COD κατά 46, 58 και 55% αντίστοιχα. Η αποδόμηση στην περίπτωση αυτή βασίστηκε τόσο στον αποπολυμερισμό των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ όσο και στην αυτοοξειδωση διαφόρων φαινολικών συστατικών η οποία οδήγησε σε αποχρωματισμό των αποβλήτων αυτών (Lamia *et al.*, 2002).

Σε μία ακόμη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση, με το πέρας των 15 ημερών από τον εμβολιασμό των ΥΑΕ με τα στελέχη των μυκήτων *Coriolus versicolor* και *Funalia trogii* ήταν 5.6 και 8.1 U ml^{-1} αντίστοιχα. Η δράση του ενζύμου λακκάση συνοδεύτηκε από μείωση του φαινολικού φορτίου κατά 90%, του COD κατά 63% και του χρώματος κατά 65% στην περίπτωση του *Coriolus versicolor*, ενώ στην περίπτωση του μύκητα *Funalia trogii* οι αντίστοιχες μειώσεις ήταν της τάξεως των 93, 70 και 81% (Yesilada *et al.*, 1998).

Επίσης, κατά την μελέτη των ΥΑΕ με τη χρήση του μύκητα *Lentinula edodes* παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών κατά 67%, του COD κατά 75% και του χρώματος κατά 45%. Η ενζυμική δραστηριότητα περιορίστηκε στη δράση του ενζύμου λακκάση, που ήταν της τάξεως των $85.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Ακόμη, κατά την μελέτη της αποδόμησης πολυμερών αρωματικών συστατικών με τη χρήση του μύκητα *Rychnoporus coccineus* (Jaouani, 2004) παρατηρήθηκε έντονη

ενζυμική δραστηριότητα κατά την οποία η λακκάση εμφάνισε τιμή 833 U mg^{-1} σε υπόστρωμα Superdex 75 ακολουθούμενο από το Hitrap Q με τιμή 816 U mg^{-1} .

Κατά την μελέτη του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* σε ΥΑΕ περιεκτικότητας 20% παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών κατά 90%, του χρώματος κατά 73% και του COD κατά 45%. Η ενζυμική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ήταν για το ένζυμο λακκάση 1.05 U ml^{-1} , ενώ για την Μπ-υπεροξειδάση 0.17 U ml^{-1} (Dias *et al.*, 2004).

Τέλος, κατά τη μελέτη μιας σειράς μυκήτων σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων παρατηρήθηκε παραγωγή των ενζύμων λακκάση και Μπ-υπεροξειδάση. Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Coriolopsis polyzona*, *Centinus tigrinus*, *Lenzites betulina*, *Pleurotus sajor-caju*, *Polyporus ciliatus*, *Phlebia radiata* και *Trametes cingulata*. Η μεγαλύτερη παραγωγή λακκάσης σημειώθηκε στον μύκητα *Centinus tigrinus* με 49 U l^{-1} και ακολούθησε ο *Pleurotus sajor-caju* με 45 U l^{-1} . Ο μύκητας *Phlebia radiata* παρουσίασε τη μεγαλύτερη μεταβολή στην παραγωγή Μπ-υπεροξειδάσης με τιμή 55 U l^{-1} και ακολούθησε ο μύκητας *Lenzites betulina* με τιμή 50 U l^{-1} . Τέλος, παραγωγή λιγνίνης υπεροξειδάσης παρατηρήθηκε μόνο στο μύκητα *Coriolopsis polyzona* με τιμή 50 U l^{-1} . Τονίζεται ότι κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με τους παραπάνω μύκητες παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου, του χρώματος και του COD αυτών. Η μεγαλύτερη μείωση των φαινολικών παρατηρήθηκε με τη χρήση του μύκητα *Pleurotus sajor-caju* με τιμή 67%, ενώ το μεγαλύτερο αποχρωματισμό, περίπου της τάξεως του 68%, προκάλεσε ο μύκητας *Lenzites betulina*. Τέλος, το COD μειώθηκε κατά 73% στον *Polyporus ciliatus* και ακολούθησαν με μικρότερη τιμή οι υπόλοιποι μύκητες (Jaouani *et al.*, 2003).

1.8. Δράση του ενζύμου λακκάση.

Η λακκάση είναι μια οξειδάση η οποία περιέχει τέσσερα ιόντα-κέντρα χαλκού, το T1, το T2 και το ζεύγος T3-T4. Η δράση του ενζύμου λακκάση προκαλεί αναγωγή του οξυγόνου σε H_2O . Το ενεργό κέντρο χαλκού T1 οξειδώνει το υπόστρωμα μεταφέροντας ηλεκτρόνια στα T2 και T3 κέντρα χαλκού (Crestini *et al.*, 2003).

Η λακκάση ως ένζυμο, είναι εξαιρετικά θερμοάντοχο (σταθερή στους $60 \text{ }^\circ\text{C}$), οξειδώνοντας πλήθος αρωματικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών με τη βοήθεια του ενζύμου λακκάση,

λαμβάνει χώρα μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά την οποία αφαιρείται ένα πρωτόνιο, και σχηματίζεται μια φαίνοξυ ρίζα (Crestini *et al.*, 2003).

Η λακκάση έχει ως πλεονέκτημα να παρεμποδίζεται από περιορισμένο αριθμό ενώσεων, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα σημαντική οξειδωτική δράση της (10 – 100 φορές υψηλότερη έναντι των διαφόρων υπεροξειδασών). Το ένζυμο λακκάση παρουσιάζει διαφορετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής, που οφείλεται κυρίως στη γενετική διαφοροποίηση των ειδών μυκήτων που την παράγουν (Crestini *et al.*, 2003).

Παρόλο την υψηλή οξειδωτική δράση της, η λακκάση παρουσιάζει περιορισμένη λιγνιτολυτική δράση. Η χρήση ενεργοποιητών [π.χ. η προσθήκη 1 – υδροξυβενζοτριαζολη (HBT)] συμβάλει στην αποτελεσματικότερη αποδόμηση της λιγνίνης. Η απολιγνιτοποίηση που πραγματοποιείται από τη λακκάση με τη βοήθεια των ενεργοποιητών, οφείλεται κυρίως στην οξείδωση παράπλευρων, όσο αναφορά τον αρωματικό δακτύλιο, υποομάδων. Έχει αποδειχτεί, ότι η λακκάση παρουσία του HBT ενεργοποιεί την οξυβενζοτριαζολική ρίζα, μια σταθερή ρίζα που οξειδώνει φαινολικές και μη – φαινολικές ενώσεις. Η δράση του ενζύμου λακκάση με HBT ή ABTS που οφείλεται σε αφαίρεση ατόμων υδρογόνου, βρίσκεται σε αντιδιαστολή με τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων που πραγματοποιείται απουσία ενεργοποιητή (Crestini *et al.*, 2003).

Η μελέτη του ρόλου των ενεργοποιητών στην αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών με τη βοήθεια του ενζύμου λακκάση, πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα βανιλικής αλκοόλης τόσο παρουσία όσο και απουσία HBT. Ο ρόλος των φαίνυλο, υδρόξυ και των καρβόξυ ομάδων στην αποδόμηση της λιγνίνης, αποκαλύφθηκε μετά από χημική τροποποίηση των ομάδων αυτών, π.χ. με μεθυλίωση, και προσθήκη λακκάσης ή λακκάσης και HBT.

1.9. Δράση της Mn-υπεροξειδάσης.

Η Mn-υπεροξειδάση είναι μία αίμο-υπεροξειδάση που εξαρτάται από την παρουσία του μαγγανίου και προκαλεί αποδόμηση της λιγνίνης και άλλων φαινολικών συστατικών. Διάφοροι μύκητες λευκής σήψης, όπως π.χ. ο *Phanerochaete chrysosporium*, έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ένα μεγάλο αριθμό ρυπογόνων ουσιών με τη βοήθεια της Mn-υπεροξειδάσης (Timofeevski *et al.*, 1998).

Η καταλυτική δράση της Mn-υπεροξειδάσης είναι παρόμοια με αυτή των άλλων υπεροξειδασών, κατά την οποία η σιδηρούχος Mn-υπεροξειδάση οξειδώνεται από το

υπεροξειδίο του υδρογόνου σε μία σιδηρούχο-π-πορφυρικό κατιόν γνωστό ως συστατικό I. Ωστόσο, δύο διαδοχικές αναγωγές του συστατικού I πρώτα σε συστατικό II με πρόσληψη ηλεκτρονίου και ύστερα πάλι σε ένζυμο σιδήρου θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (II) (Timofeevski *et al.*, 1998).

Επιπλέον, κάποιες ενώσεις όπως τα οξαλικά και τα γαλακτικά ιόντα χρησιμοποιούνται στην αύξηση της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου, αφού διευκολύνουν την οξειδωση του Mn (II). Το συστατικό II, που προκύπτει από αναγωγή της Mn-υπεροξειδάσης, μπορεί να αντιδράσει με υπεροξειδίο του υδρογόνου ώστε να δημιουργήσει ένα υπεροξικό σύμπλοκο του τρισθενή σιδήρου, γνωστό και ως συστατικό III. Το συστατικό III μπορεί στη συνέχεια να οξειδωθεί από το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλώντας απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης (Timofeevski *et al.*, 1998).

Παρόλο που το συστατικό III αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικό σύμπλοκο μπορεί κάτω από προϋποθέσεις να επανασχηματίσει το αρχικό ένζυμο σιδήρου είτε με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου ή με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων (Timofeevski *et al.*, 1998).

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η Mn-υπεροξειδάση, όταν η παρουσία οξαλικών και γαλακτικών ιόντων είναι οριακή, παρουσιάζει ενζυμική δράση (απόλυτα εξαρτώμενη από το δισθενές μαγγάνιο), παρόμοια με τη δράση της καταλάσης, προστατεύοντας το ένζυμο από την αδρανοποίηση του από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τέτοιες συνθήκες απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον των μυκήτων λευκής σήψης, το ξύλο, όπου εκλύονται μεγάλες ποσότητες μαγγανίου καθώς αυτό αποσυντίθεται (Timofeevski *et al.*, 1998).

Για την προστασία της Mn-υπεροξειδάσης από την αδρανοποίηση της από το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει βρεθεί ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί (Timofeevski *et al.*, 1998). Βάσει του πρώτου μηχανισμού, το συστατικό III που συμπλέκεται αποτελεσματικά από την συσσώρευση του Mn (II) και επανεργοποιείται. Στη περίπτωση του δεύτερου μηχανισμού, ο οποίος παρατηρείται όταν η ποσότητα του μαγγανίου (II) είναι ανεπαρκής, ο καταβολισμός της Mn-υπεροξειδάσης μειώνεται με αποτέλεσμα το Mn (III) να οξειδώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου, εμφανίζοντας δράση παρόμοια με αυτή της αντίδρασης καταλάσης (Timofeevski *et al.*, 1998).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Επιλεγμένα στελέχη μικροοργανισμών – Προέλευση και διατήρηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).

Για την πραγμάτωση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 4 στελέχη μικροοργανισμών, τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22, *Pleurotus eryngii* LGAM P66, *Ganoderma australe* IK-1600 και *Ganoderma carnosum* IK-1642, που άνηκαν στη συλλογή του Ινστιτούτου Ελαίας Καλαμάτας, τα οποία είτε αποκτήθηκαν από τις συλλογές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (LGAM) και του Université de Bordeaux II (Γαλλία), είτε αποτελούσαν στελέχη της συλλογής του Ινστιτούτου Καλαμάτας απομονωμένα από το προσωπικό αυτού (IK).

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος, παρελήφθησαν από ελαιοτριβείο τριών φάσεων του νομού Μεσσηνίας. Οι ποσότητες αυτών αποθηκεύτηκαν αρχικά σε ψυγείο στους 5°C, ενώ πριν την χρησιμοποίησή τους παρέμειναν για χρονικό διάστημα 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων με ΥΑΕ.

Όργανα και υλικά

- Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ)
- Κωνικές φιάλες (250 ml)
- Απονισμένο νερό
- Ογκομετρικός κύλινδρος (250 ml)
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Ηθμός
- Αυτόκαυστο
- Υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο

Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος, σε κατάλληλες ποσότητες ΥΑΕ προστέθηκε διάλυμα οξειδίου του ασβεστίου (CaO) για τη επίτευξη της ρυθμίσεως του pH στη τιμή 6. Ακολούθησε διήθηση, και ανάμιξη αυτών με αποιονισμένο νερό για τη δημιουργία υγρού θρεπτικού υποστρώματος ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v. Πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του θρεπτικού αυτού υποστρώματος στους 121 °C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min.

2.3. Πειραματικός σχεδιασμός.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη μυκήτων *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22, *Pleurotus eryngii* LGAM P66, *Ganoderma australe* IK-1600 και *Ganoderma carnosum* IK-1642, η δράση των οποίων μελετήθηκε σε τέσσερις χρονικές περιόδους παρουσία μάρτυρα: Η πρώτη μέτρηση πραγματοποιήθηκε για τα τέσσερα στελέχη και τον μάρτυρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό (T0), ενώ η δεύτερη (T10), η τρίτη (T20) και η τέταρτη T(30) πραγματοποιήθηκαν δέκα, είκοσι και τριάντα ημέρες μετά τον εμβολιασμό των στελεχών. Για τον μάρτυρα και κάθε στέλεχος μικροοργανισμού, σε κάθε μία από τις τέσσερις περιόδους μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις.

Το πείραμα περιλάμβανε, σε κάθε χρονική στιγμή και για κάθε επανάληψη-δείγμα (συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα), μέτρηση της βιομάζας (ξηρή μάζα), των φαινολικών συστατικών, του δείκτη βλαστικότητας και του αποχρωματισμού των ΥΑΕ. Μελετήθηκε επίσης η παραγωγή, από τα στελέχη του πειράματος, των ενζύμων λακκάση, Μπ-υπεροξειδάση, οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης και λιγνίνη υπεροξειδάση. Ο εμβολιασμός των στελεχών, για κάθε επανάληψη, πραγματοποιήθηκε σε 100 ml ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v. Το ίδια ποσότητα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της κάθε επαναλήψεως του μάρτυρα.

2.4. Μέτρηση βιομάζας (ξηρό βάρος).

Υλικά και όργανα

- Διηθητικό χαρτί (Whatman 40)
- Εμβολιασμένα δείγματα ΥΑΕ-Δείγματα μάρτυρα
- Ξηραντήριο
- Ζυγός ακριβείας

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με διήθηση των επεξεργασμένων με στελέχη μυκήτων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων ώστε να επιτευχθεί η συγκράτηση του μυκηλίου. Στη συνέχεια, το διηθητικό χαρτί μετά της μυκηλιακής βιομάζας, τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 70 °C για 48 h, και μετρήθηκε, κατόπιν αφαιρέσεως του βάρους του διηθητικού χαρτιού, το ξηρό βάρος του μυκηλίου.

2.5. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου.

Υλικά και όργανα

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

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων βασίστηκε στη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.*, 1994). Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 1% v/v δείγματος ΥΑΕ εμβολιασμένο με στέλεχος μύκητα, 5% v/v διάλυμα Folin-Ciocalteu και 15% v/v διαλύματος Na_2CO_3 αρχικής συγκεντρώσεως 20% w/v, συμπληρώνοντας με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή εντός 8 min. Στην περίπτωση του μάρτυρα πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:2 v/v, ΥΑΕ:H₂O. Έπειτα, το δείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 760 nm.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παρασκευή πρότυπης καμπύλης συριγγικού οξέος, (χρησιμοποιώντας 0, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400 και 1600 μg συριγγικού οξέος/ml), για τον υπολογισμό του φαινολικού φορτίου.

2.6. Μέτρηση δείκτη βλαστικότητας.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Σπόροι κάρδαμου
- Απιονισμένο νερό - Πόσιμο νερό
- Αυτόματη πιέτα του 1 ml - Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Τρυβλία Petri
- Πλαστική σακούλα

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας σπόρων καρδάμου ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Zucconi *et al.* (1981). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση τριών διηθητικών χαρτιών στο εσωτερικό τρυβλίου Petri, και ακολούθησε προσθήκη 25 σπόρων καρδάμου, στους οποίους προστέθηκαν 3 ml δείγματος ΥΑΕ (επεξεργασμένο με στέλεχος μύκητα ή μάρτυρα). Ακολούθησε κλείσιμο του τρυβλίου και τοποθέτηση τους σε

διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί για την επίτευξη κατάλληλων συνθηκών υγρασίας. Τα τυβλία παρέμειναν σε πλαστική σακούλα στους 25 °C για διάστημα τριών ημερών αποσκοπώντας στην εκβλάστηση των σπόρων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για το τυφλό δείγμα (δείγμα αναφοράς) χρησιμοποιώντας ποσότητα πόσιμου νερού αντί υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένων του μάρτυρα και του τυφλού δείγματος (δείγματος αναφοράς). Ακολούθησε, μέτρηση του αριθμού των εκβλαστημένων σπόρων καθώς και του μήκος της ρίζας τους.

Ο δείκτης βλαστικότητα (% GI) δίνεται από την ακόλουθη σχέση: $\% GI = (\text{Βλαστικότητα σπορών δείγματος} / \text{Βλαστικότητα σπόρων μάρτυρα}) \times (\text{Μήκος ριζών των σπορίων που βλάστησαν} / \text{Μήκος ριζών των σπορίων του μάρτυρα}) \times 100$.

2.7. Μέτρηση αποχρωματισμού.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα ΥΑΕ - Απονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml - Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instraments Inc., USA)

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση του αποχρωματισμού πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ποσότητας δειγμάτων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και μάρτυρα (κατόπιν 1:4 v/v, ΥΑΕ:H₂O αραιώση) σε κυψελίδα. Ακολούθησε τοποθέτηση αυτής στο φασματοφωτόμετρο και μέτρηση της απορρόφησης στα 525 nm.

2.8. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml - Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instraments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Αντιδραστήριο 2,2 – azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfolic acid (ABTS)
- Διάλυμα τρυγικού νατρίου 0.1 M (pH 4.5)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1.2 ml τρυγικού νατρίου (0.1 M, pH 4.5) και 0.8 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με 0.4 ml ABTS (1.5 mM) κατόπιν αναδεύσεως. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 425 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

Η μαθηματική σχέση με την οποία υπολογίστηκε η δράση της λακκάσης δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Laccase activity} = d(A_{425 \text{ nm}}) / dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)} / V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

όπου $E \text{ (lt/mol.cm)} = 36 \text{ lt/mol.cm}$

2.9. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn- υπεροξειδάση.

2.9.1. Προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn- υπεροξειδάση.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0.1, 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος 0.1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH τιμή 4.5.
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Διάλυμα 1 mM 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στην μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος 0.1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4.5), 0.2 ml διαλύματος 25 mM DMAB και 0.1 ml διαλύματος 1 mM MBTH. Η εκκίνηση της μη –ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

Η μαθηματική σχέση με την οποία υπολογίστηκε η παρεμβολή του υποστρώματος δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Background activity} = d(A_{590 \text{ nm}})/dt (\text{min}) \times E (\text{lt/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

όπου $E (\text{lt/mol.cm})=32.9 \text{ lt/mol.cm}$

2.9.2. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάσης (μη εξαρτημένης του Mn).

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0.1, 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος 0.1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH τιμή 4.5.
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Διάλυμα 1 mM 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)
- 10 mM H₂O₂

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος 0.1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4.5), 0.2 ml διαλύματος 25 mM DMAB, 0.1 ml διαλύματος 1 mM MBTH και 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Η εκκίνηση της αντιδράσεως πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.01 ml διαλύματος 10 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

Η δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) υπολογίζεται ως εξής:

$$AP = \text{Independent peroxidase} + \text{Background activity} = d(A_{590 \text{ nm}})/dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)} \times V_{\text{reaction (ml)}}/V_{\text{sample (ml)}}$$

όπου E (lt/mol.cm)=32.9 lt/mol.cm

Στη συνέχεια, η υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity). Συνεπώς:

Independent peroxidase = AP- Background activity

2.9.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn – υπεροξειδάση.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0.1, 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος 0.1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH τιμή 4.5.
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Διάλυμα 1 mM 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)
- 10 mM H₂O₂
- 20 mM MnSO₄

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος 0.1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4.5), 0.2 ml διαλύματος 25 mM DMAB, 0.1 ml διαλύματος 1 mM

MBTH, 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και 0.01 ml 20 mM MnSO₄. Η εκκίνηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.01 ml διαλύματος 10 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

Η δραστηριότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται ως εξής:

$$AR = \text{Mn-peroxidase} + \text{Independent peroxidase} + \text{Background activity} = d(A_{590 \text{ nm}})/dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)} / V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

όπου $E \text{ (lt/mol.cm)} = 32.9 \text{ lt/mol.cm}$

Στη συνέχεια, η Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της τιμής της AP (Independent peroxidase + Background activity). Συνεπώς:

$$\text{Mn-peroxidase} = AR - AP$$

2.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0.1, 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl alcohol)
- 0.1 M τρυγικό νάτριο (pH 3)
- 54 mM H₂O₂

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (0.1 M, pH 3) και 0.8 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Η εκκίνηση της αντιδράσεως πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.07 ml διαλύματος 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

2.11. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων - Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0.1, 0.2 και 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instraments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης (Veratrylalcohol)
- 0.1 M τρυγικό νάτριο (pH 3)
- 54 mM H₂O₂

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της λιγνίνης υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (0.1 M, pH 3), 0.8 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και 0.07 ml διαλύματος 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης. Η εκκίνηση της αντιδράσεως πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.03 ml διαλύματος 54 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

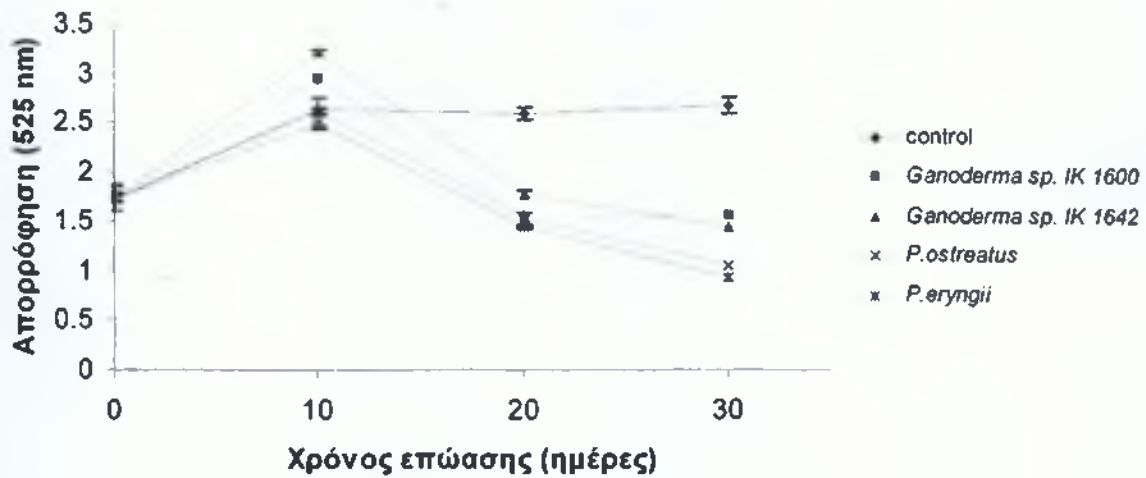
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προσδιορισμός βιομάζας.

Στη χρονική στιγμή T30, τη μεγαλύτερη βιομάζα παρουσίασε το στελέχος *Ganoderma* sp. IK-1600 (0.15 g ξηρού βάρους), ακολουθούμενο από το στελέχος *Ganoderma* sp. IK-1642 και τα στελέχη των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *P. eryngii*, των οποίων το ξηρό βάρος προσδιορίστηκε σε 0.11, 0.12 και 0.13 g αντίστοιχα

3.2. Μελέτη του αποχρωματισμού υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

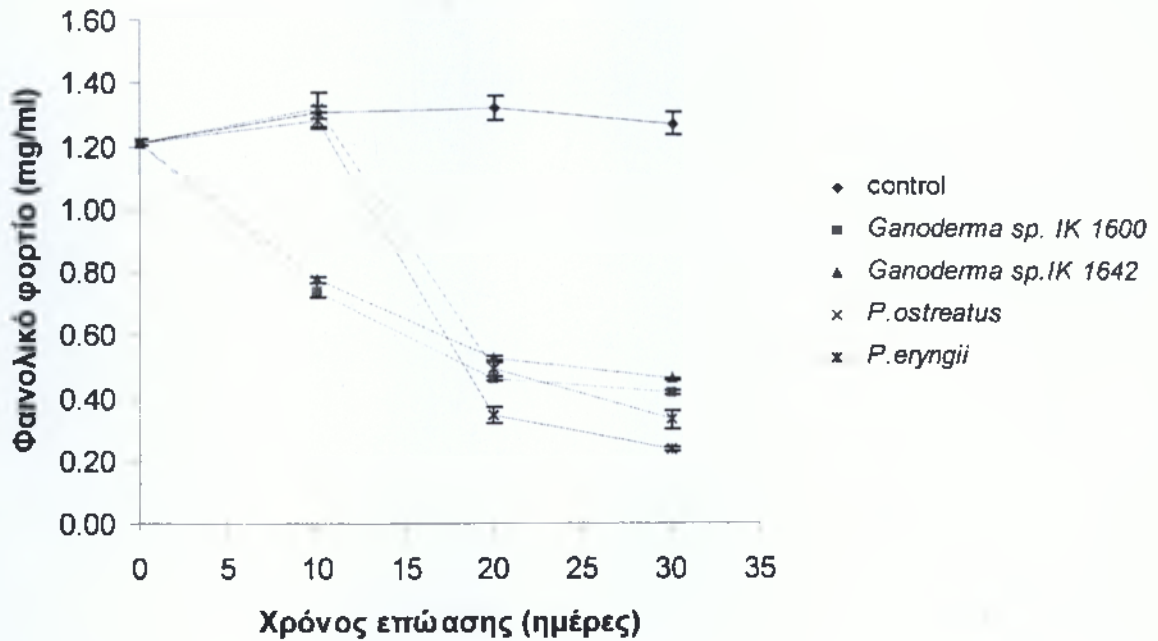
Κατά την χρονική περίοδο T10 παρατηρήθηκε αύξηση του χρώματος σε σχέση με το μάρτυρα στα δείγματα ΥΑΕ που επεξεργάστηκαν με τα στελέχη του γένους *Ganoderma*, παρουσιάζοντας αύξηση του χρώματος των ΥΑΕ που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη IK-1600 και IK-1642 κατά 12.8 και 22.8% αντίστοιχα (Εικόνα 3.1). Σε αντιδιαστολή, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* δεν προκάλεσαν μεταβολή στο χρώμα των υγρών αποβλήτων κατά την ίδια χρονική περίοδο. Κατά την χρονική περίοδο T20, όλα τα στελέχη της παρούσας μελέτης παρουσίασαν σημαντική μείωση του χρώματος των ΥΑΕ (σε σχέση με τον μάρτυρα) κατά 31.5-40.1 και 41.4-44% για τα είδη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* αντίστοιχα (Εικόνα 3.1). Κατά το τελευταίο δεκαήμερο της επώασης, ακολούθησε περαιτέρω αποχρωματισμός των ΥΑΕ, σε μικρό βαθμό για τα στελέχη του γένους *Ganoderma*, η δε αντίστοιχη μείωση του χρώματος που προκλήθηκε από την δράση των στελεχών του γένους *Pleurotus* ήταν ικανοποιητικότερη (της τάξεως του 60.4-64.8% σε σχέση με το μάρτυρα) (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Αποχρωματισμός υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

3.3. Μελέτη της μείωσης του φαινολικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

Κατά τη χρονική περίοδο T10 παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ που εμβολιάστηκαν με μέλη του γένους *Ganoderma* κατά 43.5 και 41.2% στην περίπτωση των στελεχών IK-1600 και IK-1642 αντίστοιχα (Εικόνα 3.2). Σε αντίθεση, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* κατά την ίδια περίοδο δεν παρουσίασαν καμία μείωση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ. Κατά την χρονική περίοδο T20, όλα τα στελέχη παρουσίασαν σημαντική μείωση των φαινολικών των ΥΑΕ σε σχέση με τον μάρτυρα κατά 60.6-65.2 και 62.9-74.2% για τα είδη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* αντίστοιχα (Εικόνα 3.2). Κατά τη χρονική περίοδο T30, μειώθηκε ο ρυθμός μείωσης του φαινολικού φορτίου των ΥΑΕ, η δε μείωση των φαινολικών σε σχέση με το μάρτυρα ήταν της τάξεως του 63.8-66.9% και 74-81.1% για τα στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* αντίστοιχα (Εικόνα 3.2).

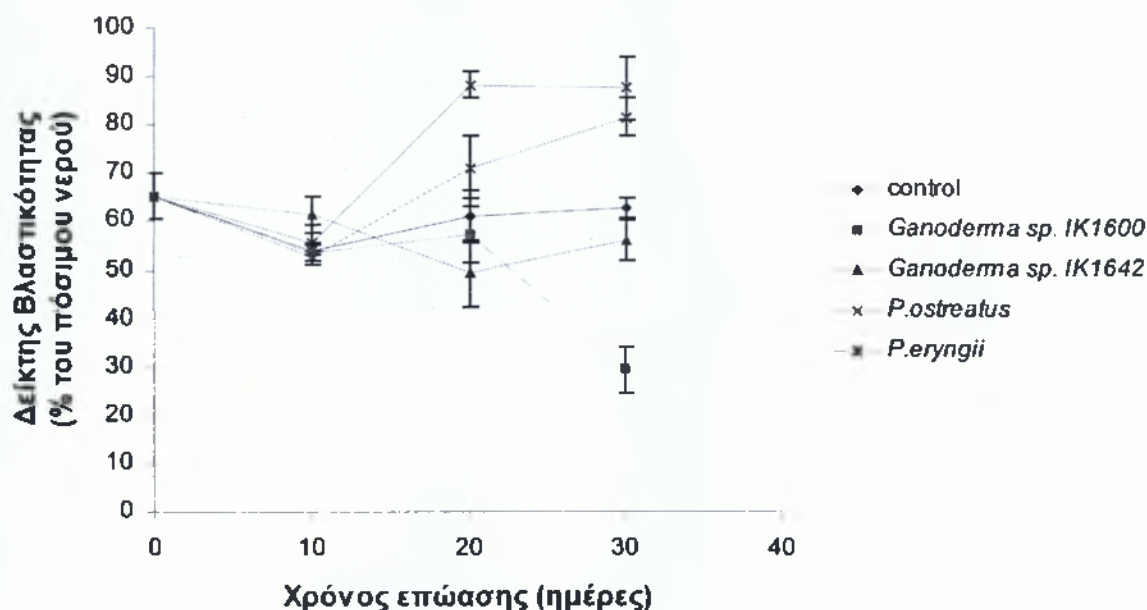


Εικόνα 3.2. Μείωση του φαινολικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

3.4. Μελέτη της μείωσης της φυτοτοξικότητας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

Κατά τη χρονική περίοδο T10, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή του δείκτη βλαστικότητας των ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* (σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα). Κατά την χρονική περίοδο T20, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του δείκτη βλαστικότητας των ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη του γένους *Pleurotus*. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αύξηση του δείκτη βλαστικότητας σε σχέση με το μάρτυρα κατά 10 και 27% για τα είδη *P. ostreatus* και *P. eryngii* αντίστοιχα (Εικόνα 3.3.). Τέλος, κατά την χρονική περίοδο T30, μόνο το είδος *P. ostreatus* παρουσίασε περαιτέρω αύξηση της τιμής του δείκτη βλαστικότητας των ΥΑΕ σε σχέση με τον μάρτυρα (κατά 20%) (Εικόνα 3.3.). Αντίθετα, στο είδος *P. eryngii* δεν παρατηρήθηκε εκ νέου αύξηση της τιμής του δείκτη βλαστικότητας. Όσον αφορά τα στελέχη των γενών *Ganoderma*, το στέλεχος IK-1624 δεν παρουσίασε καμία μεταβολή του δείκτη βλαστικότητας του μέσου ανάπτυξης του κατά την διάρκεια της επώασης του.

ενώ το στέλεχος IK-1600 προκάλεσε τη χρονική περίοδο T30 μείωση του δείκτη βλαστικότητας του μέσου ανάπτυξης του κατά 33% σε σχέση με τον μάρτυρα, χωρίς καμία μεταβολή τις χρονικές περιόδους T10 και T20 (Εικόνα 3.3.).

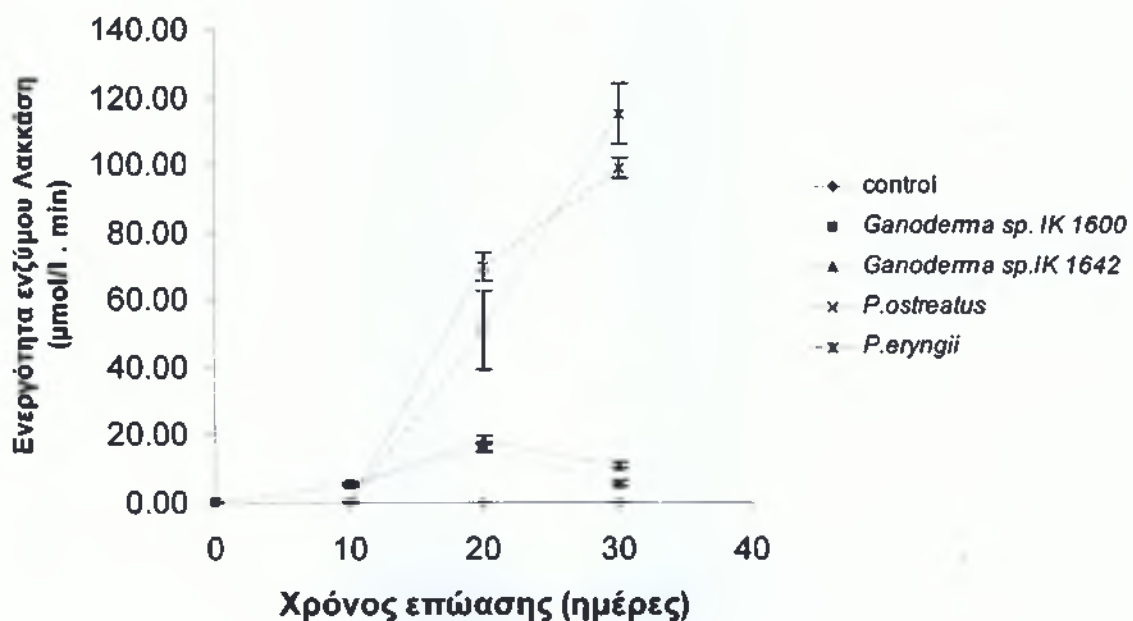


Εικόνα 3.3. Μελέτη της βαθμού μεταβολής της φυτοτοξικότητας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

3.5. Μελέτη της δράσεως του ενζύμου λακκάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

Κατά την χρονική περίοδο T10, η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση στα ΥΑΕ που επεξεργάστηκαν με τα είδη του γένους *Pleurotus* ήταν μηδέν, σε αντίθεση με τα ΥΑΕ που εμβολιάστηκαν με τα είδη του γένους *Ganoderma*, στα οποία προσδιορίστηκε μικρή ενζυμική δραστηριότητα ίση με 5.5 και 5.2 U l⁻¹ στην περίπτωση των στελεχών IK-1600 και IK-1642 αντίστοιχος (Εικόνα 3.4). Κατά την χρονική περίοδο T20, τα είδη του γένους *Ganoderma* προκάλεσαν μικρή αύξηση της δράσης του ενζύμου λακκάση κατά 10.7 και 13.5 U ανά λίτρο επεξεργασμένων ΥΑΕ αντίστοιχα. Στην ίδια χρονική περίοδο, παρατηρήθηκε σημαντική δράση του ενζύμου λακκάση στα ΥΑΕ που εμβολιάστηκαν με τα είδη του γένους *Pleurotus*, η δε ενεργότητα του ενζύμου αυτού κυμαίνονταν στα 51 και

70 U l⁻¹ στην περίπτωση του *P. ostreatus* και *P. eryngii* αντίστοιχα (Εικόνα 3.4). Κατά το τελευταίο δεκαήμερο των μετρήσεων, μειώθηκε η δράση του ενζύμου λακκάση όσον αφορά τα δείγματα ΥΑΕ που επώαστηκαν με στελέχη του γένους *Ganoderma*, με αποτέλεσμα η ενεργότητα τους να κυμαίνεται στα επίπεδα τιμών που παρατηρήθηκαν κατά το πρώτο δεκαήμερο της επώασης. Εν αντιθέσει, τα είδη του γένους *Pleurotus* προκάλεσαν περαιτέρω αύξηση της δράσης του ενζύμου λακκάση έως το πέρας των μετρήσεων, η δε ενεργότητα τη χρονική στιγμή T30 προσδιορίστηκε στα 99 και 115 U l⁻¹ για τα είδη *P. eryngii* και *P. ostreatus* αντίστοιχα (Εικόνα 3.4).

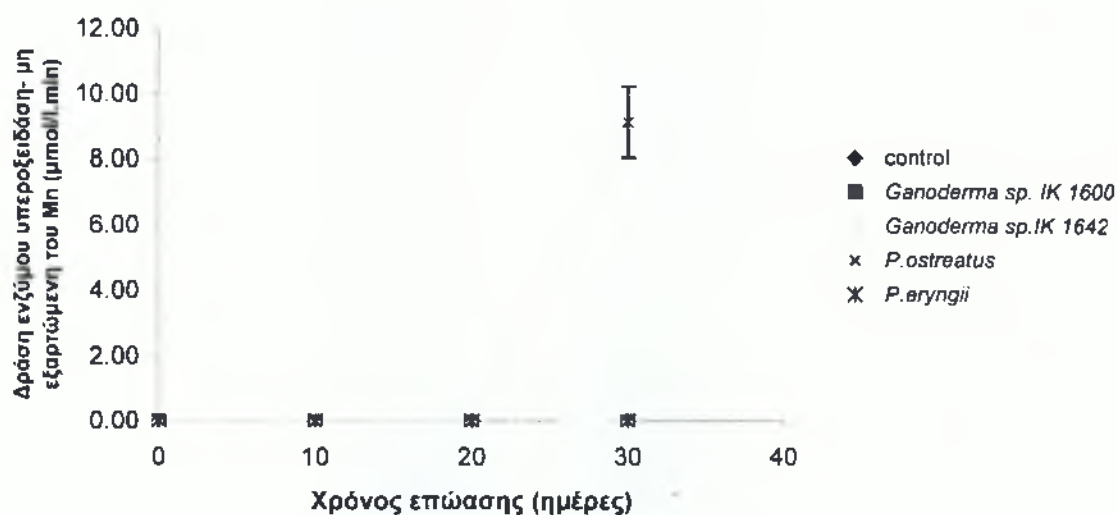


Εικόνα 3.4. Δράση του ενζύμου λακκάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

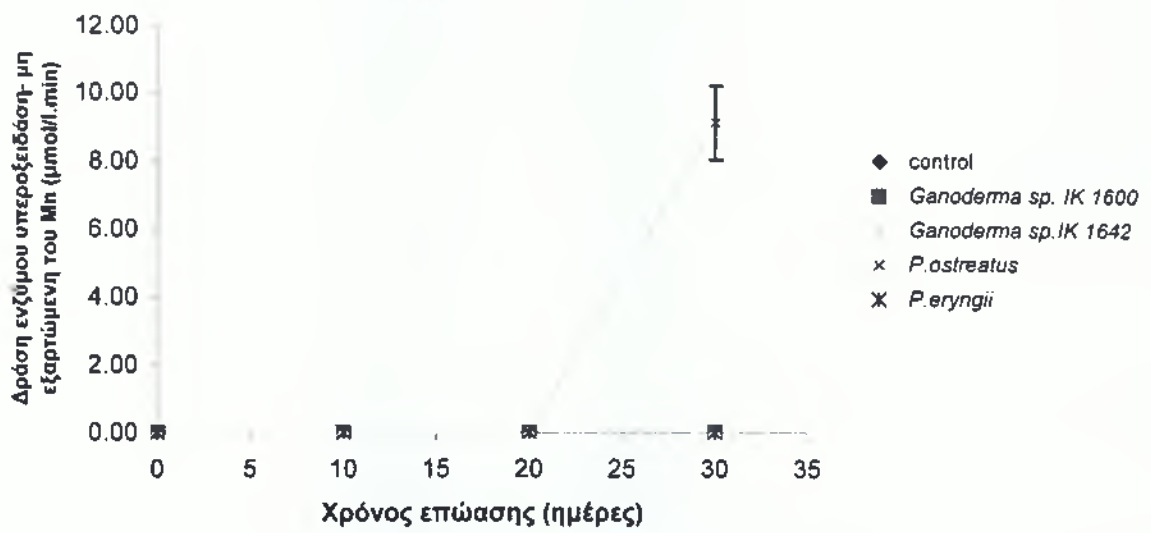
3.6. Μελέτη της δράσεως των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

Κατά την μελέτη της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση, μη εξαρτώμενης του μαγγανίου, δεν προσδιορίστηκε δραστηριότητα του ενζύμου αυτού στα ΥΑΕ που επεξεργάστηκαν με τα στελέχη μυκήτων λευκής σήψεως, με εξαίρεση την χρονική

περίοδο T30, όπου τα ΥΑΕ που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του είδους *P. ostreatus* παρουσίασαν ενεργότητα ίση με 9.1 U l^{-1} (Εικόνα 3.5). Κατά τον προσδιορισμό της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση του μαγγανίου σε ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη μυκήτων της παρούσης μελέτης, καμία ενεργότητα δεν προσδιορίστηκε στα επεξεργασμένα με αυτά δείγματα ΥΑΕ. Κατά την χρονική περίοδο T20, η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στα ΥΑΕ που επεξεργάστηκαν με τα στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* ήταν ίση με 0.7-3.8 και 4.6 U l^{-1} αντιστοίχως, με εξαίρεση την περίπτωση των δειγμάτων ΥΑΕ που επωάστηκαν με στέλεχος του είδους *P. ostreatus* που δεν παρουσίασαν καμία ενεργότητα (Εικόνα 3.6). Τέλος, μόνο στα ΥΑΕ που επωάστηκαν με το στέλεχος του είδους *P. ostreatus* παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας, στα οποία η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε σε 29.7 U l^{-1} , ενώ η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στους άλλους χειρισμούς κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.5. Δράση του ενζύμου υπεροξειδάση-μη εξαρτώμενης του Mn σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.



Εικόνα 3.6. Δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων εμβολιασμένα με στελέχη των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη μελέτη της αποδόμησης των ΥΑΕ με τη χρήση των στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* της παρούσα εργασίας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του χρώματος των ΥΑΕ μετά από 20 ημέρες επώασης, παρουσιάζοντας έτσι την ικανότητα των τεσσάρων αυτών στελεχών να αποδομούν τα απόβλητα ελαιοτριβείων. Η αύξηση του χρώματος που παρατηρήθηκε τη χρονική στιγμή T10 στους χειρισμούς του γένους *Ganoderma* μπορεί να αποδοθεί είτε στην οξείδωση φαινολικών σε συστατικά που απορροφούν περισσότερο στο ορατό φως (Thurston, 1994) είτε στην ικανότητα του ενζύμου λακκάση να πολυμερίζει φαινόλες (Farnet *et al.*, 2000).

Κατά τη μελέτη της αποδόμησης των ΥΑΕ με τη χρήση των στελεχών των γενών *Ganoderma* και *Pleurotus* παρατηρήθηκε διαφορετική πορεία στη μείωση των φαινολικών που προκλήθηκε από τη δράση των στελεχών του γένους *Pleurotus* σε σχέση με τη μείωση των φαινολικών που παρατηρήθηκε κατά τη χρήση των στελεχών του γένους *Ganoderma*. Πάντως, τόσο τα στελέχη του γένους *Ganoderma* όσο και τα στελέχη του γένους *Pleurotus* παρουσίασαν σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου που σε διάστημα 20 ημερών ήταν της τάξεως του 60-75%.

Όπως παρατηρήθηκε, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προκάλεσαν αποχρωματισμό και μείωση του φαινολικού φορτίου στον ίδιο περίπου βαθμό. Ομοίως τα στελέχη του γένους *Ganoderma* παρουσίασαν παρόμοιο ρυθμό μείωσης του φαινολικού φορτίου και του χρώματος. Εντούτοις, ο ρυθμός αποχρωματισμού και μείωσης των φαινολικών μεταξύ των στελεχών του γένους *Ganoderma* διαφοροποιούνταν, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη διακριτή ταξινομική-φυλογενετική θέση των γενών αυτών.

Κατά τη μελέτη της ικανότητας των στελεχών της παρούσας μελέτης να μειώνουν τη φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ, μόνο τα στελέχη του γένους *Pleurotus* προκάλεσαν σημαντική μείωση της φυτοτοξικότητας (περίπου κατά 20-30%). Κατά τη χρονική στιγμή T30, εν αντιθέσει με την περίπτωση των χειρισμών του γένους *Ganoderma* στους οποίους ο δείκτης βλασπικότητας παρέμεινε αμετάβλητος ή και μειωνόταν (π.χ. στους χειρισμούς του στελέχους *Ganoderma* sp. IK-1600).

Όπως βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί (Perez *et al.*, 1998), τα στελέχη του γένους *Ganoderma* αποτελούν πιθανούς επαγωγείς φαινυλοξειδασών και υπεροξειδασών. Βάσει των αποτελεσμάτων, στους χειρισμούς των στελεχών του γένους *Pleurotus* παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές του ενζύμου λακκάση, τόσο τη χρονική στιγμή T20 όσο και τη χρονική στιγμή T30. Την ίδια περίοδο, μικρότερες τιμές ενεργότητας του ενζύμου λακκάση παρατηρήθηκαν στους χειρισμούς με τα στελέχη του γένους *Ganoderma*. Παρά τη μικρή ανάπτυξη του μυκηλίου σε στελέχη του γένους *Ganoderma* κατά τη χρονική στιγμή T10, μια μικρή αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση προσδιορίστηκε. Η μικρή ενεργότητα του ενζύμου λακκάση στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των στελεχών του γένους *Ganoderma* μπορεί να συνδέεται με μείωση του χρώματος ή του φαινολικού φορτίου, έτσι ώστε να ευνοείται η μετέπειτα ανάπτυξη του μυκηλίου στα υγρά αυτά απόβλητα. (Tomati *et al.*, 1991; Tsioulpas, 2002).

Μόνο το στέλεχος του είδους *Pleurotus eryngii* παρουσίασε μικρή ενεργότητα των ενζύμων Μπ-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση-μη εξαρτώμενης του Μπ. Αντιθέτως, το στέλεχος του είδους *Pleurotus ostreatus* καθώς και τα στελέχη του γένους *Ganoderma* δεν παρουσιάζουν ενεργότητα των ενζύμων αυτών. Έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή του ενζύμου Μπ-υπεροξειδάση από τα είδη του γένους *Pleurotus* είναι σχετικά μικρή σε υποστρώματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά (Saavedra *et al.*, 2006).

Συμπερασματικά, όλα τα στελέχη της παρούσας μελέτης παρουσίασαν σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου τους σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 20 ημερών), λαμβάνοντας βέβαια υπόψη ότι και τα τέσσερα στελέχη είναι στελέχη του φύλου Basidiomycota.

Επιπλέον, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην αποδόμηση των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ, αφού όλοι οι παράμετροι-χαρακτήρες που προσδιορίστηκαν (μείωση φαινολικών, χρώματος και φυτοτοξικότητας) βελτιώθηκαν σημαντικά, προσδιορίζοντας παράλληλα σημαντικές τιμές ενεργότητας του ενζύμου λακκάση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* **37**, 3897-3904.
- Albuquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia, D. and Gegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* **91**, 195-200.
- Andrich, G., Balsini, S., Zinnai, A., Silvestri, S. and Fiorentini, R. (1992). Effect of olive oil waste water irrigation on olive plant products. *Agricoltura Mediterranea* **122**, 97-100.
- Ayed, L. and Hamdi, M. (2003). Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 59-65.
- Balis, C., Chjatjipavlidis, J. and Flouri, F. (1991). Integrated management of olive oil mills wastewaters, 66-74. In: *Management of olive mills wastes*. Proceedings of International Seminar. Geotechnical Chamber of Greece, Chania, Crete.
- Borja, R., Banks, C. J., Alba, J. and Escobar, J. (1995). The temperatures dependence of the kinetic parameters derived for the aerobic treatment of wastewater from the washing of olive prior to the oil production process. *Journal of Environmental Science and Health* **30**, 1693-1705.
- Borja, R., Garrido, S. E., Martinez, L., Ramos-Comenzana, A. and Martin, A. (1993). Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry* **28**, 397-404.

- Borja, R., Martin, A., Banks, C.J., Alonso, V. and Chica, A. (1995). A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environmental Pollution* **88**, 13-18.
- Borja, R., Martin, A., Fiestas, J. A. and Maestro, R. (1990). Study on the inhibition of olive mill wastewater biomethanation in bioreactors with microorganisms immobilized on various types of support. *Grasas y Aceites* **41**, 397-403.
- 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.
- Borja, R., Martin, A., Gomez, L. F. and Ramos-Comenzana, A. (1993). Anaerobic digestion of olive mill wastewater pre-treated with *Azotobacter chroococcum*. *Resources, Conservation and Recycling* **9**, 201-211.
- Casa, R., D'annibale, A., Rieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G. and Lo Cascio, B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* desf.) germinability. *Chemosphere* **50**, 959-966.
- Chatjipavlidis, I., Antonakou, D., Demou, D., Flouri, F. and Balis, C. (1996). Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plan in messinia, Greece. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 183-187.
- Crestini, C., Jurasek, L. and Argyropoulos D. S. (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemical European Journal* **9**, 5371-5378.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F., Fenice, M., (2004). *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research Microbiology* **155**, 596-603.
- De Caro, M. and Ligori, M. G. (1959). Activita antibiotica di un estratto desunto dalle acque di vegetazione delle olive. *Institution Super Sanita* **22**, 223-243.

- De la Rubia, T., Linares, A., Perez, J., Munoz-Dorado, J., Romera, J., Martinez, J. (2002). Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Res Microbiol* **153**, 547-554.
- Dias, A. A., Bezerra, R. M. and Pereira, A. N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* **92**, 7-13.
- Farnet, A.M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G., Le Petit, J. 2000. Purification, partial characterization and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 189-194.
- Fiestas Ros De Ursinos, J. A. (1977). Depuración de aguas residuales en las industrias de aceitunas y aceites de oliva. *Grasas y Aceites* **28**, 113-121.
- Fiestas, J. A. (1981). Différentes utilisations des margines. In : *Proceedings of Séminaire International sur la Valorisation des Sous-Produits de l'Olivier*, pp. 93-100. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Tunisie.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, S.E., Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **36**, 4735-4744.
- Gonzalez, D. M., Moreno, E., Sarmiento, Q. J. and Cormenzana, R. A. (1990). Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin): inhibitory activity of phenols and fatty acids. *Chemosphere* **20**, 423-432.
- Hamdi, M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill waste waters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **37**, 155-163.
- Hamdi, M. (1993). Future prospects and constraints of olive oil mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Engineering* **8**, 209-214.

- Hamdi, M., Festino, C. and Aubart, C. (1992). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fully mixed reactors and in fixed film reactors. *Process Biochemistry* **27**, 37-42.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., Penninckx, M.J. (2003). Potent fungi for decolourisation of olive mill-wastewaters. *Enzyme Microb Tech* **33**, 802-809.
- Jones, C. E., Murphy, P. J. and Russell N. J. (2000). Diversity and osmoregulatory responses of bacteria isolated from two-phase olive oil extraction waste products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 555-561.
- Krogmeier, M. G. and Bremner, J. M. (1989). Effects of phenolic acids on seed germination and seedling growth in soil. *Biology and Fertility of Soils* **8**, 116-122.
- Molfese, S. and Milano, A. (1989). Acque reflue dei frantoi: allarmismo per scarichi biodegradabili. *L'informatore Agrario* **9**, 227-232.
- Moreno, E., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1987). Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios* **51**, 169-174.
- Moreno, E., Quenedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A. (1990). Antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills. *Ed PNChermisinoff* **26**, 731-752.
- Ntougias, S., Ehaliotis, C., Zervakis, G. I., Katsaris, P., and Papadopoulou, K. (2003). Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants, pp. 666-673. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology*. (T. D. Lekkas, ed.), University of the Aegean and GlobalNEST, Lemnos, Greece.
- Perez, D. J., Esteban, E., Gomez, M. and Gallardo-Lara, F. (1986). Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *Journal of Environmental Science and Health* **B21**, 349-357.

- Perez, J., Hernandez, M. T., Ramos-Cormenzana, A. and Mertinez, J. (1987). Caracterization de fenoles del pigmento del alpechin y transformacion por phanerochaete chrysosporium. *Grasas y Aceites* **38**, 367-371.
- Perez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O. and Martinez, J. (1998). *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2726-2729.
- Proietti, M., Cartechini, A. and Tombesi, A. (1988). Influenza delle acque reflue dei frantoi oleari su olivi in vaso e in campo. *L'informatore Agrario* **45**, 87-91.
- Ragazzi, E. and Veronesse, G. (1967). Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive. *Annual Chimie* **57**, 1398-1413.
- Rodriguez, M. M. A., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1988). Effects of extracts obtained from olive mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 219-226.
- Rozzi, A., Santori, M. and Spinoza, L. (1984). In: *Anaerobic digestion in Italy with special references to treatment of olive oil mill wastes*, pp. 96-103. EEC, Athens, Greece.
- Saiz-Jimenez, C., Gomez -Alarcon, G., (1986). Effects of vegetation water on fungal microflora. In: *International symposium on olive by-products valorization*, pp. 61-76. FAO, Madrid, Spain.
- Saavedra, M., Benitez, E., Cifuentes, C. and Nogales, R. (2006). Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* **17**, 93-102.
- Sorlini, C., Andreoni, V., Ferrari, A. and Ranalli, G. (1986). In: *The influence of some phenolic acids present in oil mill waters on microbic groups for the methanogenesis*, pp. 81-88. International Symposium on Olive by Products Valorization, Seville, Spain.

- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Tomati, U., Galli, E., Dilena, G. and Buffone, R. (1991). Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste-waters. *Agrochimica* **35**, 275-279.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* **84**, 251-257.
- Yesilada, O. and Sam, M. (1998). Toxic effects of biodegraded and detoxified olive oil mill wastewater on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicological and Environmental Chemistry* **65**, 87-94.
- Yesilada, O., Sik, S. and Sam, M. (1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects on agitation, initial cod concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 37-42.
- Zervakis, G., Yatras, P. and Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *International Bioreterioration and Biodegradation* **38**, 237-243.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Μιχελάκης Ν. (2000). Απόβλητα ελαιουργείων-Οικονομική εφικτότητα των μεθόδων διαχείρισης των αποβλήτων. *Ελαιοκομία-αφιέρωμα*. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία, 150-157.
- Οιχαλιώτης, Κ. Δ. και Ζερβάκης, Γ. (1999). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. *Ελιά και Ελαιόλαδο* **14**, 6-16 και 52-61.