

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χρήση στελεχών των γενών
Agroclybe, *Inonotus*, *Pleurotus* και *Trametes*
στην αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Μάριος-Σωφρόνιος Κουνατίδης

Καλαμάτα 2007

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χρήση στελεχών των γενών
Agrocybe, Inonotus, Pleurotus και *Trametes*
στην αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Μάριος-Σωφρόνιος Κουνατίδης

Εισηγητής: Δρ Σπυρίδων Ντούγιας

Καλαμάτα 2007

Η πτυχιακή μελέτη αφιερώνεται στους γονείς μου, στον παππού μου και στην γιαγιά μου

Πρόλογος

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

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στο Δρ. Ζερβάκη Γεώργιο, Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Ελαιάς και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, για την διάθεση των αναλώσιμων, καθώς επίσης την Ασμούλα 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 τόσο με την προσθήκη εκχυλισμάτων καλλιέργειας μυκήτων υπό την επίδραση ή μη του ενζύμου καταλάση ή θερμικής επεξεργασίας, όσο και με την εφαρμογή εμπορικού σκευάσματος του ενζύμου λακκάση στα υγρά αυτά απόβλητα.

Για την πραγμάτωση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη βασιδιομυκήτων: τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614, *Agrocybe cylindraceae* IK1123 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557. 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 λιγνιολυτικών ενζύμων.

Βάση των πειραματικών δεδομένων διαπιστώθηκε ότι τυχόν ποσότητες H_2O_2 που μπορεί να υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου δεν προκαλούν χημική αποδόμηση των υγρών αυτών αποβλήτων. Επίσης, προσθήκη H_2O_2 συγκεντρώσεως 0.15 M προκάλεσε αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου που όμως συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της τοξικότητας, πιθανόν λόγω της οξειδωσης οργανικών συστατικών σε πιο τοξικές ενώσεις.

Η δράση του ενζύμου λακκάση φαίνεται να μην προκαλεί αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, αφού καμία μεταβολή του χρώματος δεν παρατηρήθηκε τόσο στην περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος όσο και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των τεσσάρων στελεχών βασιδιομυκήτων.

Προσθήκη εμπορικού σκευάσματος του ενζύμου λακκάση προκάλεσε ραγδαία μείωση των φαινολικών σε χρόνο μικρότερο των τριών ημερών, ενώ οι ποσότητες του ενζύμου λακκάση που παρήχθησαν από τα στελέχη των γενών *Pleurotus* και *Agrocybe* προκάλεσαν μείωση του φαινολικού φορτίου κατά τον ίδιο βαθμό αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (σε χρόνο 3-6 ημερών).

Εν συγκρίσει με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την επώαση των τεσσάρων στελεχών βασιδιομυκήτων σε Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v επί χρονικού διαστήματος 9 ημερών, η προσθήκη εκχυλίσματος (σε σχέση με την αντίστοιχη καλλιέργεια) ήταν πιο αποτελεσματική όσον αφορά τη μείωση των φαινολικών συστατικών.

Κατά τη μελέτη του δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε αύξηση αυτού μόνο στην περίπτωση των χειρισμών που περιελάμβαναν τα εκχυλίσματα των στελεχών *Trametes*

versicolor CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557 για διάστημα 6 ημερών, ενώ τη χρονική στιγμή t(9) παρατηρήθηκε αύξηση της φυτοτοξικότητας στα εκχυλίσματα των στελεχών αυτών.

Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση τόσο στην περίπτωση της παραγόμενης ποσότητας του ενζύμου αυτού από τα στελέχη βασιδιομυκήτων όσο και στην περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος ήταν σταθερή. Μέρος της ενεργότητας των ενζύμων Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn μειώθηκε κατά την πραγμάτωση των χειρισμών σε σχέση με τις αρχικές καλλιέργειες.

Abstract

The aim of this project was to study the degradation of olive mill wastewaters using extracts from selected basidiomycetous strains growing on olive mill wastewaters, in the presence of commercial catalase or laccase, with or without thermal treatment. To achieve this scope four basidiomycetes were used: *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614, *Agrocybe cylindraceae* IK1123 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557. In this experiment germination index, phenolic content and decolorization as well as activities of ligninolytic enzymes were determined.

The presence of H₂O₂ in olive mill wastewater did not result in detoxification of those wastewaters. Addition of H₂O₂ solution caused the decolorization of olive mill wastewaters which although accompanied by an increase in the toxicity, probably due to the oxidation of organic compounds to more toxic forms. Laccase activity did not lead to decolorization of olive mill wastewaters, whereas a significant decrease in phenolic content was observed. Use of extract, compared to olive mill wastewater media inoculated with the four fungal strains, resulted in a greater decrease of the concentration of the phenolic compounds in these wastewaters. Germination indices were improved in case of *Trametes versicolor* and *Inonotus andersonii*-formed extracts compared to all other treatments. Enzyme activities were stable at all time for all treatment performed.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ABTS:** 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfolic 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-hydrazon-hydrochloride
- MnP:** εξαρτώμενη του μαγγανίου υπεροξειδάση
- PAHs:** πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- Pox:** υπεροξειδάσες
- ΥΑΕ:** υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Abstract.....	4
Συντομογραφίες	5
Περιεχόμενα.....	6
Περιεχόμενα Εικόνων.....	8
Περιεχόμενα Διαγραμμάτων.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	11
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	11
1.1. Τύποι ελαιοτριβείων	11
1.2. Φυσικοχημική ανάλυση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων... ..	13
1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων	14
1.4. Φυτοτοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων	15
1.5. Χρήσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων	15
1.6. Φυσικοχημικοί μέθοδοι αποδόμησης	16
1.7. Βιολογικοί μέθοδοι αποδόμησης	17
1.8. Παραδείγματα μικροοργανισμών στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε.	17
1.8.1. Αποδόμηση των Υ.Α.Ε. με τη χρήση βακτηρίων	18
1.8.2. Αποδόμηση των Υ.Α.Ε. με τη χρήση ζυμών	18
1.8.3. Αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων	19
1.9. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση	21
1.10. Μηχανισμοί δράσεως των ενζύμων Μn-υπεροξειδάση (MnP) και λιγνίνη υπεροξειδάση (LiP).....	23
1.11. Το γένος <i>Pleurotus</i> (Fr.) P. Kumm (1871).....	25
1.12. Το είδος <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd (1921).....	26
1.13. Το είδος <i>Agrocybe cylindraceae</i> (DC.) Gillet (1874).....	28
1.14. Το είδος <i>Inonotus andersonii</i> (Ellis & Everh) Cerný (1963).....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1. Στελέχη μικροοργανισμών-Σκοπός πειράματος	30

2.2. Πειραματικός σχεδιασμός	30
2.3. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Υ.Α.Ε.....	31
2.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (Μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	32
2.5. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας	33
2.6. Μέτρηση αποχρωματισμού	34
2.7. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση	35
2.8. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Μπ).....	35
2.9. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Μπ-υπεροξειδάση	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ.....	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
3.1. Μελέτη του βαθμού αποχρωματισμού σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.....	39
3.2. Μελέτη του βαθμού μείωσης των ολικών φαινολικών συστατικών σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.	41
3.3. Μελέτη του δείκτη βλαστικότητας σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.	42
3.4. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.	44
3.5. Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Μπ) και Μπ-υπεροξειδάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
4.1. Συζήτηση.....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.....	73

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση: οξείδωση φαινολικών συστατικών.	23
Εικόνα 1.2. <i>Trametes versicolor</i> (C. von Linnaeus) C.G. Lloyd 1921 (Lloyd, 1921).....	26
Εικόνα 1.3. Το είδος <i>Agrocybe cylindraceae</i>	28

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1. Προσδιορισμός χρώματος ($A_{525\text{ nm}}$) σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. « <i>Agrocybe</i> », <i>Agrocybe cylindraceae</i> IK1123: « <i>Pleurotus</i> », <i>Pleurotus ostreatus</i> P15: « <i>Trametes</i> », <i>Trametes versicolor</i> CCBAS-614: « <i>Inonotus</i> », <i>Inonotus andersonii</i> CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml ⁻¹ του ενζύμου καταλάση: “Heat”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: “Blank”, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml ⁻¹ - JenaBios, Germany): H ₂ O ₂ , Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποίο προστέθηκε 0.15 M H ₂ O ₂	40
--	----

Διάγραμμα 3.2. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από

κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: "Heat", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: "Blank", αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany): H₂O₂, Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποίο προστέθηκε 0.15 M H₂O₂.....42

Διάγραμμα 3.3. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: "Initial culture", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: "Fungus-(t9)", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: "Catalase", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: "Heat", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: "Blank", αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany): H₂O₂, Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποίο προστέθηκε 0.15 M H₂O₂.....43

Διάγραμμα 3.4. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: "Initial culture", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: "Fungus-(t9)", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: "Catalase", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany).....45

Διάγραμμα 3.5. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση.....47

Διάγραμμα 3.6. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση.....48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1. Τύποι ελαιοτριβείων

Η καλλιέργεια του ελαιόδεντρου εστιάζεται κυρίως στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, και ιδιαίτερα στην Ισπανία, στην Ιταλία και στην Ελλάδα όπου παράγονται τα 3/4 της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (Fotopoulos *et al.*, 1998). Παρόλο την αυξανόμενη παγκόσμια απαίτηση για ελαιόλαδο και την εισαγωγή νέων ελαιοπαραγωγικών χωρών στο παγκόσμιο στερέωμα όπως η Αυστραλία, η Χιλή, η Νότια Αφρική και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Καλιφόρνια), η συγκομιδή του ελαιόκαρπου και η εξαγωγή του ελαιολάδου δεν έχουν επαρκώς προσαρμοστεί στην μηχανοποίηση (Queiro, 1998).

Στα σύγχρονα ελαιοτριβεία και πυρηνοελαιουργεία η εξαγωγή του ελαιολάδου βασίζεται κυρίως στις παρακάτω αρχές:

- Στην πίεση-σύνθλιψη
- Στη φυγοκέντρωση (συνεχές σύστημα). Εδώ διακρίνονται τα συστήματα τριών και δύο φάσεων.
- Στην εκχύλιση

Κατά την εφαρμογή του παραδοσιακού συστήματος (πιεστήριο) και του φυγοκεντρικού συστήματος τριών φάσεων προκύπτουν μία υδάτινη φάση και ένα στερεό παραπροϊόν, γνωστό ως πυρήνας, που με περαιτέρω εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (συνήθως εξάνιο) παραλαμβάνεται το πυρηνόξυλο και το πυρηνέλαιο. Τα υγρά που αποτελούν την υδάτινη φάση ονομάζονται υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Y.A.E.-olive-mill waste water, OMW στην διεθνή βιβλιογραφία) (Bohja *et al.*, 1995a; Hamdi, 1992). Τα απόβλητα αυτά, γνωστά ως λιόζουμα ή κατσιγάρος στη καθημερινή ζωή του Έλληνα αγρότη, απομακρύνονται στο χώρο πλησίον του ελαιοτριβείου συνήθως χωρίς καμία επεξεργασία. Στα ελαιοτριβεία που χρησιμοποιείται το σύστημα δύο φάσεων, το απόβλητο το οποίο προκύπτει είναι ημίρρευστο και ονομάζεται ελαιοπυρηνόλυμα, ενώ στη διεθνή ορολογία καλείται ως alpeorujo από την αντίστοιχη Ισπανική λέξη. Το παραδοσιακό σύστημα παράγει

Υ.Α.Ε. που παρουσιάζουν υψηλό COD, της τάξεως των 100-200 g l⁻¹ (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Κατά τον παραδοσιακό τρόπο εξαγωγής ελαιολάδου, ο ελαιόκαρπος εκπλένεται και υπόκειται σε σύνθλιψη υπό πίεση που σταδιακά φτάνει μέχρι και 300-500 Kg cm⁻² αναλόγως τα χαρακτηριστικά της ελιάς, όπως είναι ο βαθμός ωριμότητας του καρπού. Η ελαιοζύμη διαχωρίζεται από το στερεό υπόλειμμα, και κατόπιν με ιζηματογένεση παραλαμβάνεται από αυτήν το ελαιόλαδο, και απομακρύνονται τα φυτικά υγρά και τα υγρά έκπλυσης. Το ελαιόλαδο το οποίο εξάγεται είναι υψηλής ποιότητας λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας κάτω από την οποία πραγματοποιείται η εξαγωγή (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Όσον αφορά το φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων, η λειτουργία του στηρίζεται στο διαφορετικό ειδικό βάρος νερού και ελαιολάδου, βάση της πραγμάτωσης μίας συνεχούς διαδικασίας φυγοκέντρισης. Αρχικά, η ελαιοζύμη αραιώνεται με νερό και έπειτα τροφοδοτείται σε έναν οριζόντιας διάταξης φυγοκεντρητή, όπου πραγματοποιείται ένας πρώτος διαχωρισμός του κλάσματος του ελαίου από την ελαιοπυρήνα και το νερό. Κατόπιν, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση του ελαίου σε κάθετο φυγοκεντρητή για την παραλαβή του καθαρού ελαιολάδου (Bořja *et al.*, 1995a).

Κατά το σύστημα τριών φάσεων, πραγματοποιείται συχνά προσθήκη ζεστού νερού για την επίτευξη καλύτερης απόδοσης κατά την εξαγωγή ελαιολάδου, εντούτοις υψηλές θερμοκρασίες επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα του. Από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων, αφού καταναλώνεται από το εξαγωγικό αυτό σύστημα 1.25 έως 1.75 φορές περισσότερο νερό από εκείνο των παραδοσιακών πιεστηρίων, ακολουθούμενο από την απώλεια επωφελών συστατικών, όπως είναι τα φυσικά αντιοξειδωτικά, εξαιτίας του μεγαλύτερου ποσοστού των ουσιών αυτών που συμπαρασύρονται από την υδατική φάση και τη δημιουργία προβλημάτων διάθεσης των υγρών αυτών αποβλήτων (Κυριτσάκης, 1989; Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Η αποτυχία ανάπτυξης ενός κατάλληλου συστήματος αξιοποίησης των Υ.Α.Ε. οδήγησε στην υιοθέτηση του συστήματος δύο φάσεων, το οποίο χρησιμοποιεί μόνο το νερό της έκπλυσης για την μάλαξη της ελαιοζύμης και την εξαγωγή του ελαιολάδου. Σύμφωνα με το παραπάνω σύστημα οι δύο φάσεις που προκύπτουν είναι το ελαιόλαδο και ένα ημίρρευστο (σχεδόν στερεό) υπόλειμμα. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί μία, πιο αποτελεσματική μέθοδο, φυγοκέντρισης και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται σε περιοχές όπου τα αποθέματα νερού είναι μικρά (Albuquerque *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2000; Ntougias *et al.*, 2006). Όσον αφορά την εξαγωγή ελαιολάδου, ο οριζόντιος φυγοκεντρητής που χρησιμοποιείται στο σύστημα δύο

φάσεων παρουσιάζει παρόμοιες αποδόσεις με αυτές που προκύπτουν κατά την εφαρμογή του συστήματος τριών φάσεων (Albuquerque *et al.*, 2004).

1.2. Φυσικοχημική ανάλυση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Φυσικοχημική ανάλυση των Υ.Α.Ε. έδειξε ότι αποτελούνται από μια λιπαρή φάση (περίπου 20% του συνολικού περιεχομένου), ένα στερεό υπόλειμμα (πάνω από 30%) και μια υδατική φάση (περίπου 50%). Επιπροσθέτως, τα Υ.Α.Ε. περιέχουν μαλακούς ιστούς εξαιτίας της μάλαξης της ελαιοζύμης και ένα σταθερό γαλάκτωμα λαδιού (Bojja *et al.*, 1995b; Martin *et al.*, 1991).

Η σύσταση των Υ.Α.Ε. ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, την εδαφολογική σύσταση, τις κλιματολογικές συνθήκες, το χρόνο και τις τεχνικές συγκομιδής και τον αντίστοιχο τύπο του χρησιμοποιούμενου ελαιοτριβείου (Ntougias, 1999).

Περιέχουν πλήθος χημικών ενώσεων πολλές από τις οποίες είναι κοινές σε εκχυλίσματα φυτών και άλλες που παρατηρούνται μόνο στο απόβλητο αυτό. Γενικά, τα Υ.Α.Ε. φέρουν όξινο pH, μεταξύ 4.5-5.5, και υψηλό οργανικό φορτίο, εκ του οποίου, το 10% αποτελείται από φαινολικά συστατικά (Ntougias, 1999). Επίσης περιέχουν φλαβονοειδή και μη φαινολικά οξέα, καθώς και ανόργανα συστατικά όπως Ca, K και Na, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλή αγωγιμότητα (περίπου 10-16 mS cm⁻¹). Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές BOD (Biological oxygen demand) και COD (Chemical oxygen demand), έως 100 και 162 Kg l⁻¹ αντιστοίχως (Tsonis, 1988).

Καθώς τα Υ.Α.Ε. είναι φυσικά προϊόντα πλούσια σε οργανική ύλη και περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες K, P και άλλων στοιχείων, πολλοί ερευνητές έχουν εισηγηθεί τη χρήση τους ως λιπάσματα (Morisot & Tournier, 1986; Perez & Gollardo-Lara, F., 1987; Saiz-Jimenez *et al.*, 1987). Οι θετικές και αρνητικές επιδράσεις από την εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στη λίπανση του εδάφους εξαρτώνται από το ρυθμό και το χρόνο χορήγησης αυτών (Fiestas Ros de Ursinos, 1986; Morisot & Tournier, 1986). Εντούτοις, οι επιβλαβείς επιδράσεις των Υ.Α.Ε. στην ανάπτυξη των φυτών έχει αποθαρρύνει πολλούς ερευνητές στην πραγμάτωση περαιτέρω έρευνας.

Τα συστατικά των Υ.Α.Ε. μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών άμεσα και/ή έμμεσα μέσω της διατάραξης της μικροβιακής οικολογίας της ριζόσφαιρας και της εισαγωγής τοξινών. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την

παραγωγή ρυθμιστών ανάπτυξης, αντιβιοτικών και σταθεροποιητών εδάφους (Whitehead, 1964).

Οι φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των Υ.Α.Ε. έχουν αποδοθεί στα υπάρχουσα σε αυτά μονομερή φαινολικά συστατικά (Gonzales *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1986; Rodriguez *et al.*, 1988), ενώ το μαύρο χρώμα τους οφείλεται στην παρουσία πολυφαινολών (Carraso *et al.*, 1992; Ramos-Carmenzana *et al.*, 1996).

Η αφθονία σε οργανικά και ανόργανα συστατικά καθιστούν τα Υ.Α.Ε. μια πιθανή πηγή θρεπτικών στοιχείων και ενέργειας για μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Αν και αυτό είναι αλήθεια για πολλούς μικροοργανισμούς, ορισμένα από τα συστατικά τους, ιδιαίτερα τα φαινολικά, προκαλούν αναστολή ενάντια αρκετών βακτηρίων και μυκήτων εδάφους (Gonzales *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1987; Walter *et al.*, 1973).

1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Η αντιμικροβιακή δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων έχει συσχετισθεί ευρέως με το υψηλό φαινολικό τους φορτίο, που συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0.5 έως 24 g l⁻¹ (Bořja *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1990). Το ποσοστό φαινολικών συστατικών στα Υ.Α.Ε. εξαρτάται τόσο από το σύστημα εξαγωγής του ελαιολάδου όσο και το στάδιο συγκομιδής και το είδος του ελαιοκάρπου. Η εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων Υ.Α.Ε. σε χωματερές και ποτάμια που βρίσκονταν κοντά σε ελαιοτριβεία, αντί για την ολοκληρωτική τους διαχείριση, προκαλεί οικολογική διαταραχή και ρύπανση (Fountoulakis *et al.*, 2002; Kachourgi *et al.*, 2004).

Έχει αναφερθεί ότι η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους λιπαρών οξέων, αυξάνει επίσης την αντιμικροβιακή δράση των Υ.Α.Ε. Συγκεκριμένα, σε δόκιμες με στελέχη του βακτηρίου *Bacillus megaterium*, πάνω σε υποστρώματα φαινολικών και λιπαρών οξέων (εναλλάξ ή και τα δύο ταυτοχρόνως), παρατηρήθηκε ανασχεση της ανάπτυξης του παραπάνω μικροοργανισμού (Gonzalez-Lopez *et al.*, 1994; Martirani *et al.*, 1996).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Carraso *et al.* (1995), τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων που ερευνήθηκαν προκάλεσαν, εξαιτίας της αντιμικροβιακής τους δράσης, την ανασχεση διαφόρων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών όπως για παράδειγμα ανασχεση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

1.4. Φυτοτοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα Υ.Α.Ε. προκαλούν αναστολή της εκβλάστησης σπόρων και της ανάπτυξης νεαρών φυτών, διάφορων ειδών οπωροκηπευτικών. Η φυτοτοξικότητα των Υ.Α.Ε. οφείλεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά και στην ύπαρξη διαφόρων οργανικών οξέων (οξικό και μυρμηκικό οξύ) που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους (Aggelis *et al.*, 2003; Casa *et al.*, 2003; D' Annibale *et al.*, 2004b; Tsioulpas *et al.*, 2002), καθώς και στην υψηλή αλατότητα και στο υψηλό οργανικό τους φορτίο (Ntougias *et al.*, 2006).

Συνήθως, η φυτοτοξική δράση των Υ.Α.Ε., δεν είναι αποτέλεσμα μόνο των αυξημένων συγκεντρώσεων φαινολικών συστατικών, αλλά συχνά εμπλέκονται και οι άλλοι παράγοντες που αναφέρθηκαν. Αναφορικά, κατά την εφαρμογή Υ.Α.Ε. σε φυτά τομάτας και κολοκυθιού, παρατηρήθηκε σημαντική φυτοτοξική δράση, παρότι είχε προηγηθεί απομάκρυνση του φαινολικού τους φορτίου (Carasso *et al.*, 1992).

1.5. Χρήσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Τα Υ.Α.Ε. έχουν βρεθεί ότι περιορίζουν τη δράση του σημαντικότερου εχθρού της ελιάς, της μύγας *Dacus oleae*, έχοντας πιθανή εφαρμογή στη βιολογική καταπολέμηση του δάκου αντί των φυτοφαρμάκων (Lo Scalzo & Scarpati, 1993).

Τα φυσικά φαινολικά συστατικά των Υ.Α.Ε. είναι δυνατό να βρουν κάποια εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της αντιβακτηριακής/αντιοξειδωτικής τους δράσης (Tuncel & Nergiz, 1993).

Τα Υ.Α.Ε. δύναται επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεθανίου μέσω αναερόβιας ζύμωσης αποσκοπώντας στην παραγωγή ενέργειας. Βέβαια, η αργή διαδικασία της αναερόβιας ζύμωσης (5-40 ημέρες) και η αναστολή της μεθανογένεσης καθώς και το μεγάλο κόστος λόγω της απόλυτα ελεγχόμενης διαδικασίας, αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στην υιοθέτηση της εφαρμογής αυτής (Borja *et al.*, 1993; Fiestas, 1981).

Το γεγονός ότι οι μύκητες του γένους *Pleurotus* αναπτύσσονται σε υποστρώματα που περιέχουν Υ.Α.Ε., οδήγησε στη μελέτη της διάθεσης αυτών για την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών. Κατά την ανάπτυξη των μανιταριών αυτών προκαλείται μείωση του φαινολικού φορτίου και της τοξικότητας των Υ.Α.Ε., συμβάλλοντας στην αύξηση της απόδοσης

παραγωγής εδώδιμων μανιταριών και στη καλύτερη διαχείριση των αποβλήτων αυτών (Zervakis *et al.*, 1996).

Έχει βρεθεί ότι διάφορες ζύμες και μύκητες όταν αναπτύσσονται σε υποστρώματα Υ.Α.Ε. υψηλής περιεκτικότητας σε αναγωγικά και μη σάκχαρα (περίπου 8%), δύναται να παράγουν μονοκυτταρικές πρωτεΐνες (Fiestas Ros de Ursinos, 1977). Οι παραγόμενες κατ'αυτόν τον τρόπο πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής για ζώα. Εντούτοις, η ταχεία αποικοδόμηση των σακχάρων του ελαιοκάρπου κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του και διάφορα άλλα οικονομικοτεχνικά προβλήματα, καθιστούν προς το παρόν την εφαρμογή της μεθόδου ανέφικτη (Μιχελάκης, 2000).

1.6. Φυσικοχημικοί μέθοδοι αποδόμησης

Διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε. περιλαμβάνουν τεχνικές όπως η υπερδιήθηση, η αντίθετη ώσμωση, η αποτέφρωση, ο ενταφιασμός, η κατακρήμνιση με προσθήκη ηλεκτρολυτών και η θερμική συμπίκνωση.

Η κατακρήμνιση με προσθήκη ηλεκτρολυτών ασβεστίου, κυρίως CaO και Ca(OH)₂, προκαλεί σημαντική απομάκρυνση οργανικής ύλης, πλέον του 40% του βάρους του αποβλήτου. Εντούτοις, το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει, παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα με αποτέλεσμα να δημιουργείται πρόβλημα διάθεσης του προϊόντος της κατακρήμνισης (Fiestas & Borja, 1992).

Η αντίθετη ώσμωση έχει πάνω από 90% αποτελεσματικότητα στην απομάκρυνση της οργανικής ύλης, όμως παρουσιάζει μεγάλο κόστος και προβλήματα στη διάθεση του στερεού υπολείμματος που κατακρατείται (Fiestas & Borja, 1992).

Η αποτέφρωση είναι αξιόπιστη αλλά ακριβή και πολύπλοκη μέθοδος, με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και μεγάλη εκπομπή ρύπων.

Ο ενταφιασμός παρουσιάζει προβλήματα στη διαχείριση μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων ελαιουργείων και στη μελλοντική ανάπλαση του χρησιμοποιούμενου χώρου.

Κατά τη φυσική εξάτμιση σε επιφάνειες συγκέντρωσης υδάτων (ανοιχτές δεξαμενές) μειώνεται σημαντικά ο όγκος του απόβλητου, λαμβάνοντας παράλληλα χώρα και μικρής κλίμακας βιοαποικοδόμηση (Fiestas & Borja, 1989). Εντούτοις παρουσιάζονται προβλήματα που σχετίζονται με τη διαχείριση του στερεού υπολείμματος και της υγιεινής του υλικού αυτού (Marinos, 1991).

1.7. Βιολογικοί μέθοδοι αποδόμησης

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων θεωρούνται από τα πιο ρυπογόνα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων και αποτελούν πηγή σημαντικών περιβαλλοντικών προβλημάτων. Καθώς οι κανονισμοί ασφάλειας του περιβάλλοντος έχουν γίνει περισσότερο αυστηροί, διαφορετικοί μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τη μεταχείριση των Υ.Α.Ε. (Panizza & Cerisola, 2006). Αυτοί οι μέθοδοι μπορούν να διακριθούν σε φυσικοχημικές (παράγραφος 1.6.) και βιολογικές, οι οποίες και αναλύονται στο κεφάλαιο αυτό.

Οι βιολογικές μέθοδοι βασίζονται σε αερόβια οξείδωση και αναερόβια χώνεψη που πραγματοποιούνται λόγω της δράσεως διαφόρων μικροοργανισμών (Hamdi & Ellouz., 1993: Paredes *et al.*, 2002). Το σημαντικό πλεονέκτημα είναι η περαιτέρω δυνατότητα αυτών να αξιοποιηθούν, όπως στις περιπτώσεις παραγωγής προϊόντων αερόβιας χώνεψης (κομπόστ), βιοαερίου, καθώς και στην απομόνωση πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, μορίων χρήσιμων στην βιομηχανία τροφίμων (Hafidi *et al.*, 2005).

Κατά την αερόβια οξείδωση, δύναται η αποδόμηση πλήθους πολυφαινολικών συστατικών (Bojja *et al.*, 1995a: Di Gioia *et al.*, 2001). Η μεγάλη μείωση του φαινολικού φορτίου μπορεί να αποδοθεί είτε σε μικροβιακό μεταβολισμό των φαινολών σαν πηγή ενέργειας ή στη μετατροπή τους κατά τη διάρκεια διαδικασιών χουμοποίησης (Hafidi *et al.*, 2004: Hamdi & Ellouz, 1993: Paredes *et al.*, 2002: Zaim *et al.*, 1994: Zenjari *et al.*, 2003).

Πειραματικής και πιλοτικής κλίμακας δοκιμασίες σε αραιωμένα Υ.Α.Ε. (Aveni, 1984) έδειξαν ότι η διαδικασία της αναερόβιας ζύμωσης ήταν αρκετά αποτελεσματική στην απομάκρυνση οργανικής ύλης, αφού προκάλεσε μείωση του οργανικού φορτίου κατά 80-85% σε μικρό χρονικό διάστημα. Ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις Υ.Α.Ε., η διαδικασία γινόταν ασταθής εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης διαφόρων ουσιών, κυρίως φαινολικών συστατικών (Bojja *et al.*, 1998). Κατά τη μελέτη των Υ.Α.Ε. σε βιοαντιδραστήρες υπό αναερόβιες συνθήκες (Boari *et al.*, 1984: Ozturk *et al.*, 1991) παρατηρήθηκε μείωση του COD κατά 70-75%. Λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση αναερόβιων φίλτρων πολυουρεθάνης (Carrieri *et al.*, 1988: Rozzi, 1989).

1.8. Παραδείγματα μικροοργανισμών στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε.

Τις τελευταίες δεκαετίες πολλοί μέθοδοι έχουν περιγραφεί και εφαρμοστεί για τη μείωση της τοξικότητας των Υ.Α.Ε., με κύριο σκοπό τη μετατροπή τους σε ύλη κατάλληλη

για αγροτικές εφαρμογές (Hamdi, 1993), εντούτοις καμία από αυτές τις μεθόδους δε χρησιμοποιούνται εξαιτίας των περιορισμών τους κατά την εφαρμογή τους σε ευρεία κλίμακα και του υψηλού τους κόστους (Hamdi, 1996). Ωστόσο, συνεχίζονται οι προσπάθειες για την εύρεση στελεχών μικροοργανισμών και μεθόδων ικανών να αποδοθούν αποτελεσματικά τα Υ.Α.Ε.

1.8.1. Αποδόμηση των Υ.Α.Ε. με τη χρήση βακτηρίων

Κατά τη μελέτη των Ayed & Hamdi (2003) σε Υ.Α.Ε. 10% v/v που επεξεργάστηκαν με το βακτήριο *Lactobacillus plantarum*, παρατηρήθηκε μείωση του COD κατά 55%, του χρώματος κατά 58% και των φαινολικών συστατικών κατά 46%. Επιπλέον, η ανάπτυξη του βακτηρίου στο υγρό αυτό απόβλητο προκάλεσε μείωση του pH από 6 σε 3.5 εξαιτίας της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Η απομάκρυνση του COD ήταν σε παρόμοιο ποσοστό με αυτήν του αποχρωματισμού, πράγμα που αποδόθηκε στην απομάκρυνση έγχρωμων φαινολικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους. Η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. plantarum* σε Υ.Α.Ε. προκάλεσε τον αποπολυμερισμό των πολυφαινολών, με παράλληλη παρεμπόδιση του πολυμερισμού διαφόρων μονομερών φαινολικών συστατικών. Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους του βακτηρίου αυτού σε συγκεντρώσεις υγρών απόβλητων μεγαλύτερων του 20% v/v, ενώ η ανάπτυξη του στις προαναφερθείσες συνθήκες ήταν υποβοηθούμενη από την προσθήκη 1 g l⁻¹ εκχυλίσματος ζύμης.

1.8.2. Αποδόμηση των Υ.Α.Ε. με τη χρήση ζυμών

Η ικανότητα μερικών επιλεγμένων ζυμών να αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, οδήγησε τον Gharsallah (1993) στη χρησιμοποίηση των ζυμών *Candida crusei*, *Saccharomyces chevalerie* και *Saccharomyces rouxii* αποσκοπώντας στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε..

Η επεξεργασία των Υ.Α.Ε. με τις παραπάνω ζύμες, επωαζόμενες σε σύστημα συνεχούς ροής, οδήγησε στη μείωση του COD κατά 40-50%. Ικανοποιητικότερα αποτελέσματα παρουσίασε η ζύμη *Saccharomyces rouxii*, της οποίας η ανάπτυξη στο απόβλητο δεν παρεμποδίστηκε σχεδόν από κανένα φαινολικό συστατικό των Υ.Α.Ε..

Επίσης, οι ζύμες *Candida tropicalis* και *Yarrowia lipolytica* έδειξαν θετικά αποτελέσματα κατά την αερόβια βιοαποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση των Υ.Α.Ε. (Di Gioia *et al.*, 2001: 2002: Ehaliotis *et al.*, 1999: Lanchiotti *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, οι Scioli & Vallaro (1997) έδειξαν ότι η ζύμη *Yarrowia lipolytica* παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε. κυρίως μειώνοντας τις τιμές BOD και COD αυτών. Έτσι, μελέτη στελεχών του είδους *Y. lipolytica* απέδειξε ότι ορισμένα από αυτά προκάλεσαν μείωση του COD μεταξύ 20 και 40% (Lanchiotti *et al.*, 2005). Στην αποδόμηση των Υ.Α.Ε. από τα στελέχη του γένους *Yarrowia* σημαντικό ρόλο παίζει η αυξημένη παραγωγή του ενζύμου τυροσινάση, γνωστό και ως πολυφαινολική οξειδάση που καταλύει την οξείδωση διαφόρων φαινολικών παρουσία μοριακού οξυγόνου (Van den Tempel & Jakobsen, 2000).

1.8.3. Αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων

Η δομή των αρωματικών ενώσεων που παρατηρούνται στα Υ.Α.Ε. είναι ανάλογη με αυτή της λιγνίνης. Η λιγνίνη είναι ένα φαινυλο-προπανοειδές πολυμερές δύσκολο να αποδομηθεί εξαιτίας της πολυπλοκότητας και της ετερογενούς του δομής (Kirk & Farrell, 1987). Μερικοί μόνο μικροοργανισμοί είναι ικανοί να αποδομούν τη λιγνίνη ικανοποιητικά, παράγοντας λιγνινολυτικά ένζυμα όπως υπεροξειδάση της λιγνίνης, υπεροξειδάση εξαρτώμενη του μαγγανίου και λακκάση (Hatakka, 1994). Πρόσφατα, μέσα από διάφορες εφαρμογές έχει παρατηρηθεί ότι τα παραγόμενα από μύκητες, κυρίως λευκής σήψεως, ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση βιομηχανικών αποβλήτων και ενός μεγάλου αριθμού ξενοβιοτικών ρύπων (D'Annibale *et al.*, 1998: Esposito *et al.*, 1991: Michel *et al.*, 1991: Reddy *et al.*, 1995).

Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *Geotrichum candidum* προκαλεί ικανοποιητική αποδόμηση διάφορων υγρών αποβλήτων και αποσταγμάτων (FitzGibson *et al.*, 1998), καθώς και αποχρωματισμό μελάσας και κάποιων κατηγοριών βαφών (Kim & Shoda, 1999a). Η ανάπτυξη του μύκητα *Geotrichum candidum* σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων προκάλεσε σημαντική μείωση του COD στις τρεις πρώτες ημέρες. Η μείωση αυτή συσχετίστηκε με αυτή του αποχρωματισμού, που υπολογίστηκε στο 65% για το COD και 75% για τον αποχρωματισμό. Ο αποχρωματισμός οφειλόταν κυρίως στην παραγωγή υπεροξειδασών από το μύκητα *Geotrichum candidum* (Kim & Shoda, 1999b). Ο βαθμός αποχρωματισμού των Υ.Α.Ε. από το μύκητα *Geotrichum candidum* ήταν μεγαλύτερος στα πιο αραιωμένα δείγματα Υ.Α.Ε. (Assas *et al.*, 2000), γεγονός που αποδόθηκε στην περιορισμένη του οξυγόνωση και

στην παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων, κυρίως φαινολικών, στα λιγότερο αραιωμένα δείγματα (Ritter *et al.*, 1990). Ο μύκητας *Geotrichum candidum* κατά την εφαρμογή του σε Υ.Α.Ε. προκάλεσε την υδρόλυση φαινολικών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους και την απομάκρυνση απλών φαινολικών ενώσεων. Αν και ο σχηματισμός μυκηλίου του μύκητα *Geotrichum candidum* δεν ήταν ικανοποιητικός τις πρώτες ημέρες, εντούτοις παρατηρήθηκε αποδόμηση πολυμερών φαινολικών ενώσεων και ικανοποιητικός αποχρωματισμός των Υ.Α.Ε. (Assas *et al.*, 2000).

Επίσης, στελέχη των γενών *Oxysporus*, *Schizophyllum*, *Hyphoderma* και *Ganoderma*, έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα τους να βιοαποικοδομούν τη λιγνίνη σε απόβλητα ελαιοτριβείων. Στη μελέτη αυτή το pH έπαιξε σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των ενζύμων λακκάση και λιγνίνη υπεροξειδάση και συνεπώς στο βαθμό αποδόμησης της λιγνίνης, αφού μείωση του pH κατά μισή μονάδα αύξησε την ενεργότητα των ενζύμων αυτών κατά 100% (Haddalin *et al.*, 2002).

Έχει αναφερθεί επίσης ότι ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* μπορεί να αποχρωματίσει ικανοποιητικά τα Υ.Α.Ε., κυρίως υπό καλή οξυγόνωση και παρουσία ουσιών όπως η βερατρυλική αλκοόλη που δρα ως επαγωγέας του λιγνινολυτικού μηχανισμού (Sayadi & Ellouz, 1992).

Οι Martinari *et al.* (1996) ανέφεραν ότι το μυκήλιο του μύκητα *Pleurotus ostreatus* είναι ικανό να απομακρύνει φαινολικά κατά την εφαρμογή του σε 10% v/v Υ.Α.Ε. απουσία προσθήκης θρεπτικών συστατικών. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η προσθήκη εξειδικευμένων οργανικών ουσιών ευνοεί την αύξηση του βαθμού αποχρωματισμού που προκαλείται από τον μύκητα *P. ostreatus* (Sayadi & Ellouz, 1993: 1995).

Τα δύο παραπάνω είδη μυκήτων προκαλούν ικανοποιητικό αποχρωματισμό των Υ.Α.Ε. παρουσία πρόσθετων θρεπτικών συστατικών (Kissi *et al.*, 2001). Οι μύκητες *Pleurotus ostreatus* και *Phanerochaete chrysosporium* προκάλεσαν 65% και 95% μείωση του χρώματος αντιστοίχως (Kissi *et al.*, 2001). Χαρακτηριστικά, ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* μείωσε περίπου κατά 50% το αρχικό χρώμα των Υ.Α.Ε. σε διάστημα 6 ημερών. Η μείωση που παρατηρήθηκε στα φαινολικά συστατικά και το COD ήταν 62% και 52% για το μύκητα *Pleurotus ostreatus*, ενώ η αντίστοιχη μείωση για το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* ήταν της τάξεως των 82% και 77% μετά από δεκαπενθήμερη περίοδο επώασης (Kissi *et al.*, 2001).

Ο μύκητας λευκής σήψης *Lentinula edodes* παράγει λιγνινολυτικά ένζυμα που δρουν από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του (Leatham, 1986). Το είδος αυτό προκαλεί την έκκριση των ενζύμων λακκάση και Mn-υπεροξειδάση (Buswell *et al.*, 1995). Προηγούμενες μελέτες

που περιελάμβαναν επώαση του μύκητα *L. edodes* σε Υ.Α.Ε. ανέφεραν την ικανοποιητική αποδόμηση του αποβλήτου αυτού, εντούτοις απαιτούνται ικανοποιητική οξυγόνωση του μέσου και προσθήκη πηγής άνθρακα για την υποβοήθηση της ανάπτυξης του (Vinciguerra *et al.*, 1995). Ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός των Υ.Α.Ε. που παρατηρήθηκε ήταν της τάξεως του 75%, ενώ η αντίστοιχη απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών πλησίασε το 80%. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η μεγαλύτερη μείωση φαινολικών παρατηρήθηκε σε διάστημα δύο ημερών από τον εμβολιασμό και κυμαινόταν από 60% έως 80% στις διαφορετικές καλλιέργειες του μύκητα (D'Annibale *et al.*, 1998).

Άλλα παραδείγματα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην μελέτη της αποδόμησης των Υ.Α.Ε. είναι οι μύκητες λευκής σήψεως *Trametes versicolor* και *Funalia trogii*. Αναλυτικά, οι μύκητες αυτοί προκάλεσαν μείωση του COD, των φαινολικών και του χρώματος κατά 63-70, 90-93 και 65-81% αντιστοίχως (Yesilada *et al.*, 1998).

Όσον αφορά το μύκητα λευκής σήψεως *Panus tigrinus* διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν αποτελεσματικός στη μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών σε Υ.Α.Ε. υψηλού οργανικού φορτίου ($COD > 85 \text{ g l}^{-1}$), εξαιτίας της αδυναμίας του μύκητα αυτού να αναπτυχθεί είτε παρουσία ή απουσία προσθήκης θρεπτικών συστατικών. Η απομάκρυνση των ολικών στερεών που σχετίζονται με το υψηλό οργανικό φορτίο των Υ.Α.Ε. οδήγησε σε σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου (κατά 88%) και του χρώματος (κατά 37%). Παρουσία Υ.Α.Ε. χαμηλού οργανικού φορτίου ($COD < 43 \text{ g l}^{-1}$), ο παραπάνω μύκητας απομάκρυνε αποτελεσματικά το φαινολικό φορτίο, μειώνοντας το σε διάστημα μικρότερο των 5 ημερών κατά 76-89%, ενώ ο αντίστοιχος αποχρωματισμός κατά την επώαση 15 ημερών ήταν της τάξεως του 65-72% (D'Annibale *et al.*, 2004a).

1.9. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση

Οι μύκητες λευκής σήψεως παράγουν εξωκυτταρικά οξειδωτικά ένζυμα που τους επιτρέπουν να αποδομούν τη λιγνίνη, ένα δυσκόλως αποδομούμενο πολυμερές συστατικό του ξύλου (Kirk & Farrell, 1987). Το ένζυμο λακκάση είναι ευρέως διαδεδομένο στα φυτά και στους μύκητες (κυρίως μύκητες λευκής σήψεως), διαδραματίζοντας έτσι ένα σημαντικό ρόλο στην απολιγνινοποίηση του ξύλου (Bourbonnais *et al.*, 1995; Reinhammar, 1984).

Τα Υ.Α.Ε. περιέχουν κατεχόλη, καφεϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη και άλλα τοξικά αρωματικά συστατικά (D'Annibale *et al.*, 2000), που αποτελούν εν δυνάμει επαγωγείς του ενζύμου λακκάση. Εκτός των φαινολικών συστατικών (Sethuraman *et al.*, 1998), ενώσεις

όπως η 2,5-ξυλιδίνη (Eggert *et al.*, 1996) και η βερατρυλική αλκοόλη (Mansur *et al.*, 1997) επαυξάνουν την παραγωγή του ενζύμου λακκάση. Εκτός από τη λίστα των παραπάνω ενδεχόμενων επαγωγέων, έχει πρόσφατα αποδειχτεί ότι κάποιες αλειφατικές αλκοόλες (Lee *et al.*, 1999) και λιγνινοκυτταρινούχα συστατικά (Lorenzo *et al.*, 2002) έχουν παρόμοια δράση.

Το ένζυμο λακκάση είναι μία οξειδάση πολυφαινολικών συστατικών που καταλύει την οξείδωση πολλών αρωματικών οργανικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικών, με ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου σε νερό (Thurston, 1994). Συγκεκριμένα, το ένζυμο λακκάση ανάγει το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας νερό και ταυτόχρονα πραγματοποιεί οξείδωση μέσω της απομάκρυνσης ενός ηλεκτρονίου από το αντίστοιχο αρωματικό υπόστρωμα (Thurston, 1994).

Η λακκάση (*p*-διφαινύλο οξειδοορεδοουκτάση, EC1.10.3.2.) ανήκει στην οικογένεια των πολυχαλκούχων οξειδασών που περιλαμβάνει ένζυμα όπως η ασκορβική οξειδάση (Solomon *et al.*, 1996). Η λακκάση αποτελείται από τέσσερα ενεργά κέντρα, κάθε ένα από το οποίο περιέχει ένα ιόν Cu (II), στα οποία πραγματοποιείται οξείδωση του υποστρώματος με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου και αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Dooley *et al.*, 1979: Ducros *et al.*, 1998: Messerschmidt, 1997: Messerschmidt & Huber, 1990: Solomon, *et al.*, 1996).

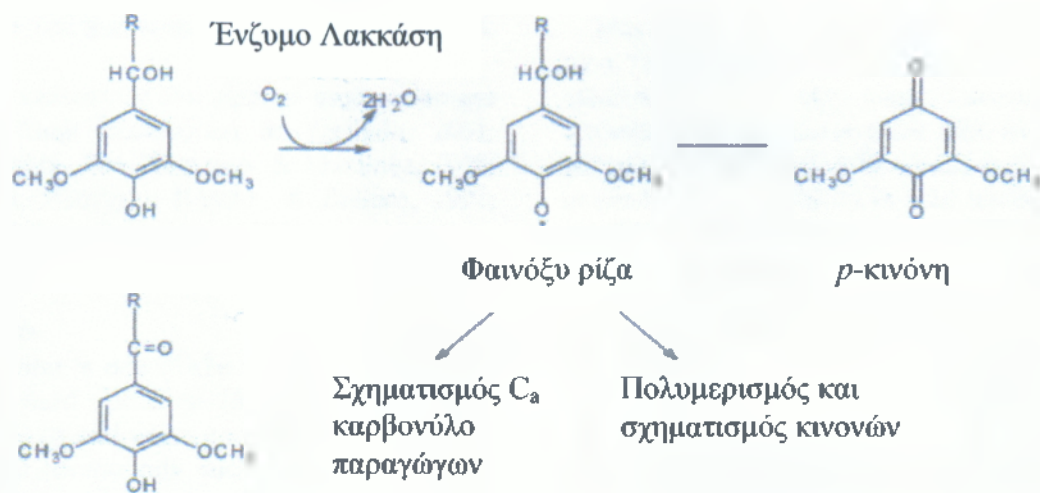
Τα τέσσερα ιόντα Cu (II) είναι γειτονικά και διανεμημένα σε διαφορετικές θέσεις και ταξινομούνται σε τρεις τύπους: τον τύπο 1 (T1) που εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, τον τύπο 2 (T2) που ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο και τον τύπο 3 (T3) που περιλαμβάνει δύο ιόντα Cu (II) και είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου (Attanasio *et al.*, 2005: Messerschmidt *et al.*, 1992).

Το ένζυμο λακκάση από είδος σε είδος παρουσιάζει διαφορετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής, που οφείλεται στη γενετική διαφοροποίηση των ειδών μυκήτων που την παράγουν. Ο μικρός αριθμός ουσιών που την αναστέλλουν και η υψηλή οξειδωτική δράση της (10-100 φορές υψηλότερη από τη δράση των ενζύμων λιγνίνη υπεροξειδάση ή Mn-υπεροξειδάση), καθιστούν τη λακκάση ιδανικό ένζυμο για την αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών (Crestini *et al.*, 2003).

Εντούτοις, η λακκάση έχει φτωχή λιγνινολυτική δράση, όμως η χρησιμοποίηση ενεργοποιητών (π.χ. διαφόρων ριζών), π.χ. προσθήκη της 1-ύδροξυ-βενζο-τριαζόλης (HBT), συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της δράσεως της. Έχει γίνει παγκοσμίως ενδιαφέροντος ο επαναπροσδιορισμός του τρόπου δράσεως της λακκάσης με την προσθήκη ενεργοποιητών και τη κατανόηση του μηχανισμού αυτού. Το μεγάλο ποσοστό της απολιγνινοποίησης που παρατηρείται κατά τη χρήση των ενεργοποιητών, οφείλεται κυρίως στη ικανότητα τους να

προκαλούν την οξείδωση των παράπλευρων, ως προς τον αρωματικό δακτύλιο, υποομάδων (Crestini *et al.*, 2003).

Στην Εικόνα 1.1. παρουσιάζεται η δράση του ενζύμου λακκάση, όπου ένα φαινολικό συστατικό υφίσταται οξείδωση, απομακρύνοντας ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζοντας μια φαινόξυ ρίζα, η οποία με τη σειρά της μπορεί είτε να μετασχηματιστεί σε κινόνη ή άλλες καρβονυλικές ενώσεις ή να προκαλέσει τον πολυμερισμό της ενδιάμεσης αυτής ρίζας (Gianfreda *et al.*, 1999).



Εικόνα 1.1. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση: οξείδωση φαινολικών συστατικών (Gianfreda *et al.*, 1999).

1.10. Μηχανισμοί δράσεως των ενζύμων Μn-υπεροξειδάση (MnP) και λιγνίνη υπεροξειδάση (LiP)

Οι μύκητες λευκής σήψεως που ανήκουν στο φύλο Basidiomycota, είναι οι κύριοι υπεύθυνοι της διάσπασης της λιγνίνης στο ξύλο (Buswell & Odier, 1987; Gold *et al.*, 1989; Kirk & Farrell, 1987). Οι αίμο-υπεροξειδάσες (Pox) καταλύουν την οξείδωση ενός μεγάλου εύρους οργανικών υποστρωμάτων με απώλεια ενός ηλεκτρονίου ανά μόριο. Ένζυμα της κατηγορίας των υπεροξειδασών που παράγονται από μύκητες, βακτήρια και φυτά παρουσιάζουν σχετική διαφοροποίηση από τις αντίστοιχες αίμο-υπεροξειδάσες ζωϊκής προελεύσεως (Welinder *et al.*, 1991). Σε αντιδιαστολή, οι παραγόμενες από μικροοργανισμούς υπεροξειδάσες παρουσιάζουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή και δράση με

εκείνη των αντίστοιχων υπεροξειδασών των φυτών (Welinder *et al.*, 1991). Φασματοσκοπικές μελέτες και αλληλουχίες cDNA αποκάλυψαν ότι η αίμο-δομή της εξαρτώμενης του μαγγανίου υπεροξειδάσης είναι παρόμοια με εκείνη των φυτών και άλλων μυκήτων (Banci *et al.*, 1992; Dunford & Stillman, 1976; Glenn & Gold, 1985; Harris *et al.*, 1991; Mino *et al.*, 1988; Pease *et al.*, 1989; Prinbow *et al.*, 1989).

Κατά τη καλλιέργεια μυκήτων λευκής σήψεως σε υποστρώματα πλούσια σε λιγνίνη έχει αναφερθεί η παραγωγή δύο εξωκυτταρικών αίμο-υπεροξειδασών, της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP) και της εξαρτώμενης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnP), που μαζί με ένα σύστημα παραγωγής H₂O₂, είναι τα κύρια ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνίνης (Buswell & Odier, 1987; Hammel & Moen, 1991; Kirk & Farrell, 1987; Kuwahara *et al.*, 1984; Tien, 1987; Wariishi *et al.*, 1991). Το ένζυμο MnP, αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους περίπου 46 KDa που περιλαμβάνει μια πορφυρική ομάδα (Glenn & Gold, 1985; Harris *et al.*, 1991; Leisola *et al.*, 1987; Mino *et al.*, 1988; Paszczynski *et al.*, 1986; Wariishi *et al.*, 1988).

Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της δράσης του ενζύμου αυτού, η σιδηρούχος Mn-υπεροξειδάση οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ένα σιδηρούχο-π-πορφυρικό κατιόν, γνωστό ως συστατικό I. Η Mn-υπεροξειδάση θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (II), καθώς παρουσία Mn (II) είναι εφικτή η πραγμάτωση δυο διαδοχικών αναγωγών, πρώτα του συστατικού I σε ένα συστατικό, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συστατικό II, και έπειτα πάλι σε ένζυμο σιδήρου (Serguei *et al.*, 1998).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η παραγωγή και έκκριση οξαλικού, γαλακτικού και μηλονικού σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (Barr *et al.*, 1992; Dutton *et al.*, 1992; Kuan & Tien, 1993; Wariishi *et al.*, 1992) προκαλεί την αύξηση της δράσεως του ενζύμου MnP (Glenn & Gold, 1985; Paszczynski *et al.*, 1986; Wariishi *et al.*, 1992). Με την προσθήκη τέτοιων ενώσεων σχηματίζονται σύμπλοκα που διευκολύνουν την οξείδωση του Mn (II). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπό προϋποθέσεις, μπορεί να αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπεροξικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου γνωστό και ως συστατικό III. Επιπλέον οξείδωση του συστατικού III από το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης. Αντιθέτως, ακολουθώντας άλλη πορεία, το συστατικό III (που αποτελεί κυρίως ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο) μπορεί να επανασηματίσει το αρχικό ένζυμο σιδήρου, είτε με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων ή με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου (Serguei *et al.*, 1998).

Η LiP και MnP παρουσιάζουν διαφορετική καταλυτική δράση. Η MnP χρησιμοποιεί το Mn (II) ως το κύριο συστατικό για την πραγμάτωση της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, ενώ η LiP παρουσιάζει τη δυνατότητα οξείδωσης υποστρωμάτων υψηλότερων δυναμικών οξειδοαναγωγής. Μελέτη της κινητικής του ενζύμου MnP έχει επιβεβαιώσει ότι το Mn δρα ως ένα οξειδοαναγωγικό ζεύγος παρά ως σύμπλοκο ιόν (Wariishi *et al.*, 1989). Κατά τη δράση της MnP πραγματοποιείται οξείδωση του Mn^{2+} σε Mn^{3+} , όπου το τελευταίο προκαλεί εν συνεχεία οξείδωση διάφορων φαινολικών υποστρωμάτων (Joshi & Gold, 1993) και λιγνίνης (Wariishi *et al.*, 1991). *In vitro* πειράματα με τα παραπάνω ένζυμα έχουν δείξει ότι μπορούν να αποπολυμερίσουν λιγνίνες (Hammel & Moen, 1991; Wariishi *et al.*, 1991), αν και οι λεπτομέρειες όσον αφορά το καταλυτικό τους ρόλο σε *in vivo* πειράματα είναι υπό συζήτηση (Sarkanen *et al.*, 1991). Τα λιγνινολυτικά αυτά ένζυμα έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη μυκήτων λευκής σήψεως, όπως για παράδειγμα από στελέχη των ειδών *Trametes versicolor* (Johansson & Nyman, 1993; Jonsson *et al.*, 1989) και *Phanerochaete chrysosporium* (Gold & Alic, 1993).

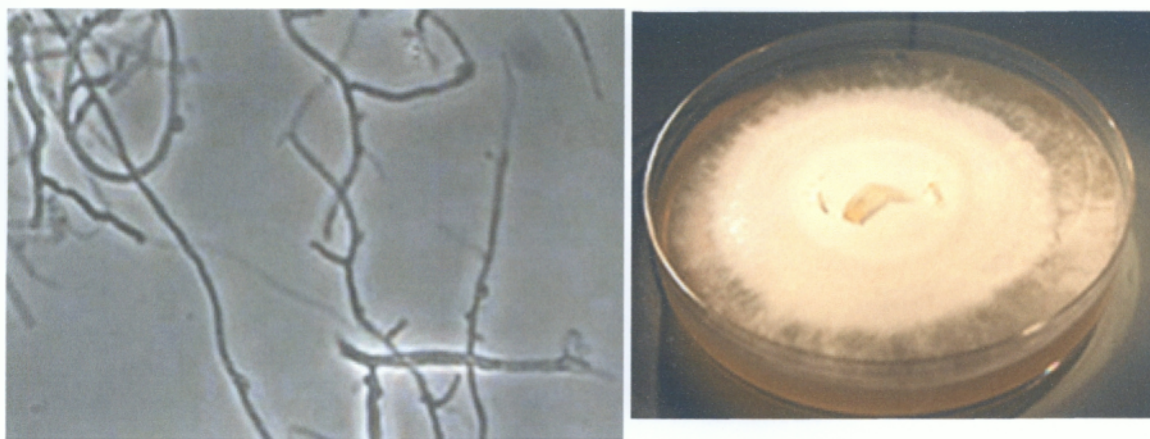
1.11. Το γένος *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm (1871)

Το γένος *Pleurotus* (oyster mushroom) ανήκει στην οικογένεια Polyporaceae (Fr.) Fr. του φύλου Lentineae Fayod, στελέχη του οποίου είναι κυρίως κατανεμημένα στο Βόρειο ημισφαίριο, σε περιοχές της Ευρώπης, της Βόρειας Αφρικής, της Ασίας και της Βόρειας Αμερικής (Singer, 1986). Η αναγνώριση των ειδών μέσα στο γένος *Pleurotus* είναι δύσκολη λόγω των μορφολογικών ομοιοτήτων και της επίπτωσης των διαφόρων περιβαλλοντικών επιδράσεων. Τα κυριότερα μέλη του γένους *Pleurotus* είναι τα είδη *P. ostreatus* και *P. eryngii*. Η ευρεία εξάπλωση της καλλιέργειας τωνμανιταριών που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην εύκολη και ταχεία ανάπτυξη τους σε πλήθος φθινηών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, όπως κορμούς δένδρων, πριονίδια, άχυρα και άλλα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (σιτηρών, βαμβακιού, καπνού κ.α.) (Ζερβάκης, 1998). Κυρίως αναπτύσσονται σε φυλλώδη εκτάσεις την άνοιξη και το φθινόπωρο, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου υπάρχουν λεύκες, βελανιδιές, οξιές και ιτιές που αποτελούν το πιο ευνοϊκό φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης τωνμανιταριών αυτών. Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε σωρούς προϊόντων αερόβιας ζύμωσης (κομπόστ) και σε υπολείμματα επεξεργασίας ξύλου (Stamets, 1993).

Εξαιτίας της μεγάλης ικανότητας τους να αποδομούν λιγνίνη, στελέχη του γένους *Pleurotus*, έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιοαποικοδόμηση ρύπων, όπως διοξινών και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) (Hirano *et al.*, 2000; Kubatova *et al.*, 2001).

1.12. Το είδος *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1921)

Ο Βασιδιομύκητας *Trametes versicolor* (Εικόνα 1.2.) είναι γνωστός στη ξένη βιβλιογραφία ως «Turkey tail fungus» και αναπτύσσεται σε επικαλυμμένους σωρούς (Overholts, 1967). Το ελικοειδές του βασιδιοκάρπιο μπορεί να φτάσει τα 10 cm με πάχος 0.5 cm (Overholts, 1967). Η επιφάνεια του φέρει σειρές με εναλλασσόμενες σκούρες και ανοιχτού χρώματος ομόκεντρες ζώνες, των οποίων οι υφές ποικίλουν από μαλακές έως βελούδινες. Εξαιτίας της επίδρασης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η έκθεση στον ήλιο παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία (Overholts, 1967: [http://www.grzyby.pe/gatunki/Trametes versicolor.htm](http://www.grzyby.pe/gatunki/Trametes%20versicolor.htm)). Το εσωτερικό αυτού είναι χρώματος κίτρινου-άσπρου και περιέχει πολλά μικρά, κυλινδρικά ή γωνιακά τμήματα (3-5 ανά mm). Τα ώριμα βασιδιοσπόρια είναι υαλώδη μεγέθους 2-6 μm. Ο μύκητας *Trametes versicolor* παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό σύστημα υφών (Εικόνα 1.2.) με υφές πάχους 3-10 μm χωρίς την παρουσία σφιχτών ενώσεων.



Εικόνα 1.2. *Trametes versicolor* (C. von Linnaeus) C.G. Lloyd 1921 (Lloyd, 1921).

Ο μύκητας *Trametes versicolor* συναντάται ευρέως σε εύκρατα και υποτροπικά δάση, αλλά και σε άλλα σημεία του πλανήτη όπου δρα ως αποικοδομητής του ξύλου (Overholts, 1967: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/aug97.html). Ο μύκητας *Trametes versicolor* προκαλεί το βιοαποπολυμερισμό του ξύλου, ανήκοντας στους βασιδιομύκητες λευκής σήψης.

Ο μύκητας *Trametes versicolor* παράγει πλήθος ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνοκελλουλόζης του ξύλου, όπως είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), η εξαρτώμενη του μαγγανίου υπεροξειδάση (MnP) (Johansson & Nyman, 1993), η λακκάση (Johannes & Majcherczyk, 2000), η καρβοδιμέθυλο κυτταρινάση και η δευδρογονάση της κελλοβιόζης (Dumonceaux *et al.*, 1998). Επίσης προκαλεί την έκκριση ενός χαμηλού μοριακού βάρους γλυκοπεπτιδίου που έχει την ιδιότητα να παράγει ρίζες υδροξυλίου, που εμπλέκονται στην πραγμάτωση της αντίδρασης Fenton (Tanaka *et al.*, 1999).

Οι μηχανισμοί οι οποίοι ελέγχουν τη λιγνινολυτική δράση του μύκητα *Trametes versicolor* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τα κυριότερα ισοένζυμα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP) και της εξαρτώμενης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnP) βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα (Johansson & Nyman, 1996). Η αντιγραφή της δευδρογονάσης της κελλοβιόζης καταστέλλεται από την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Stapleton & Dobson, 2003: Stapleton *et al.*, 2004). Εσωκυτταρικές και εξωκυτταρικές πρωτεάσες εμπλέκονται στην ρύθμιση της δραστηριότητας της λακκάσης και της υπεροξειδάσης (Stazczak *et al.*, 2000). Τα περιέχοντα Cu (II) ενζυμικά συστήματα tahA και CtaA ρυθμίζουν την παραγωγή του ενζύμου λακκάση ελέγχοντας την εσωκυτταρική διαθεσιμότητα του Cu^{+2} που απαιτείται για τη δόμηση της (Uldscheid *et al.*, 2002: Uldscheid *et al.*, 2003). Ο μύκητας *Trametes versicolor* εκκρίνει ως προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού οξαλικό οξύ που συμπλέκεται ενδεχομένως με τοξικά μέταλλα και σταθεροποιεί το Mn^{+3} που προκύπτει από τη δράση της MnP (Jarosz-Wilkolazka & Gadd, 2003).

Η λακκάση που παράγεται από το μύκητα *Trametes versicolor* μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αποδόμηση δυσκόλως αποικοδομούμενων ουσιών όπως είναι πολύχλωριομένα φαινύλια (Keum, 2004), βαφές υφασμάτων (Adosinda *et al.*, 2003: Blázquez *et al.*, 2004: Libra *et al.*, 2002: Liu *et al.*, 2004) και πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (Field *et al.*, 1992: Johannes & Majcherczyk, 2000: Sack *et al.*, 1997). Το παραγόμενο από το μύκητα *Trametes versicolor* ένζυμο λακκάση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή (Aktas & Tanyolaç, 2003: Mai, *et al.*, 2000) ή αποδόμηση (Milstein *et al.*, 1992) συνθετικών πολυμερών.

Επίσης έχει προταθεί για τη βιομηχανία ανακύκλωσης και παραγωγής χάρτου ο σχεδιασμός συστημάτων επεξεργασίας στα οποία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ο μύκητας *Trametes versicolor* (Addleman *et al.*, 1995: Bourbonnais *et al.*, 1995: Dorado *et al.*, 2000: Katagiri *et al.*, 1995: Reid, 1998). Επιπλέον, έχει προταθεί η χρήση του μύκητα αυτού στη παραγωγή ή αποδόμηση αντιβιοτικών (Hundt *et al.*, 2000: Mikolasch & Schauer, 2003), στην παραγωγή καρτενοειδών (Zorn *et al.*, 2003) και στη βιοαποικοδόμηση υψηλού μοριακού βάρους στερεών υπολειμμάτων της βιομηχανίας πετρελαίου (van Hamme *et al.*, 2003).

1.13. Το είδος *Agrocybe cylindraceae* (DC.) Gillet (1874)

Το είδος *Agrocybe cylindraceae* ανήκει στο φύλο Basidiomycota, τάξη Basidiomycetes, οικογένεια Coprinaceae. Συνώνυμα του παραπάνω είδους είναι τα *Agaricus comatus*, *Agaricus cylindricus*, *Agaricus ovatus*, *Coprinus comatus* var. *ovatus* και *Coprinus ovatus*. Στη ξένη βιβλιογραφία είναι γνωστό με την ονομασία "Shaggy Inkcap".

Συναντάται ευρέως σε δενδρώδεις καλλιέργειες και δάση. Υποστρώματα που θεωρούνται κατάλληλα για την ανάπτυξη του παραπάνω είδους είναι ξυλώδη μέρη και φύλλα. Η ανάπτυξη του μύκητα *Agrocybe cylindraceae* ευνοείται τους μήνες Ιούλιο έως τον Δεκέμβριο παρουσιάζοντας τη μέγιστη συγκομιδή τους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβριο (<http://www.nifg.org.uk/species/atlas2.htm?item=NBNSYS0000021409>).



Εικόνα 1.3. Το είδος *Agrocybe cylindraceae* (<http://www.nifg.org.uk/species/atlas2.htm?item=NBNSYS0000021409>)

1.14. Το είδος *Inonotus andersonii* (Ellis & Everh) Černý (1963)

Το είδος *Inonotus andersonii* ανήκει στο φύλο Basidiomycota, τάξη Agaricales, οικογένεια Bolbitiaceae. Τα βασιδιοκάρπια είναι ετήσια και τις περισσότερες των περιπτώσεων εμφανίζονται σε όλη την επιφάνεια του ξύλου, αλλά κυρίως στα κλαδιά. Αναπτυσσόμενα κάτω από το φλοιό προκαλούν αποσύνθεση αυτού. Το χρώμα τους κυμαίνεται από σκούρο χρυσο-καφετί (λόγω της μεγάλης εναπόθεσης σπορίων) ως σκούρο καφέ-μαύρο (στα μεγαλύτερης ηλικίας σημεία του βασιδιοκάρπιου).

Οι εμπιερόμενες σκελετικές υφές έχουν παχύ τοίχωμα και είναι χρώματος καφέ. Ορισμένες από αυτές φέρουν δευτερεύουσα σέπτα διαμέτρου 3-6 μm. Τα βασίδια είναι μεγέθους 14-17 x 5-6.5 μm. Τα βασιδιοσπόρια είναι χρώματος κίτρινου ως κιτρινοπράσινου (<http://www.cbs.knaw.nl/scripts/Aphyllorphorales.dll/ShowName?N1=13669>) με παχύ τοίχωμα σχήματος οβάλ ως ελλειψοειδές και μέγεθος 5-8 x 4-6 μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Στελέχη μικροοργανισμών-Σκοπός πειράματος

Για την πραγμάτωση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη βασιδιομυκήτων καθώς και ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Οι επιλεγμένοι αυτοί μικροοργανισμοί είναι τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614 (Baldrian), *Agrocybe cylindraceae* IK1123 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557.

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων τόσο με την προσθήκη εκχυλισμάτων καλλιέργειας μυκήτων υπό την επίδραση ή μη του ενζύμου καταλάση ή θερμικής επεξεργασίας, όσο και με την εφαρμογή των ενζύμων λακκάση (εμπορικό σκεύασμα) στα υγρά αυτά απόβλητα. Κατά τη μελέτη της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας, των ολικών φαινολικών συστατικών και του βαθμού αποχρωματισμού τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της δράσεως των ενζύμων λακκάση και Μπ-υπεροξειδάση των προστιθέμενων εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την ανάπτυξη των παραπάνω τεσσάρων στελεχών σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη μυκήτων *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614 (Baldrian), *Agrocybe cylindraceae* IK1123 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557. Η όλη πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v (50 ml ανά φιάλη) που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά (12 επαναλήψεις) και επωάστηκε επί χρονικού διαστήματος πέντε (5) εβδομάδων. Προς διευκόλυνση, ο χειρισμός αυτός θα καλείται ως «initial». Με το πέρας των πέντε εβδομάδων, οι καλλιέργειες διηθήθηκαν με τη βοήθεια ηθμού, παραλαμβάνοντας το

υπερκείμενο-εκχύλισμα ενώ το αντίστοιχο μυκήλιο απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο-εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για την πραγμάτωση των παρακάτω χειρισμών:

A) Προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v. Προς διευκόλυνση, ο χειρισμός αυτός θα καλείται ως «extract».

B) Προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v παρουσία 50 U ml⁻¹ ενζύμου καταλάση. Προς διευκόλυνση, ο χειρισμός αυτός θα καλείται ως «catalase».

Γ) Προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v το οποίο υπόκειντο σε θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες. Προς διευκόλυνση, ο χειρισμός αυτός θα καλείται ως «Heat».

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v (50 ml ανά φιάλη) που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά (12 επαναλήψεις) και επώαστηκε επί χρονικού διαστήματος εννέα (9) ημερών. Προς διευκόλυνση, ο χειρισμός αυτός θα καλείται ως «T9».

Επίσης, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v (50 ml ανά φιάλη) αποτέλεσε το τυφλό (blank), ενώ Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v που περιείχαν 0.15 M H₂O₂ και Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v που περιείχαν 0.35 U ml⁻¹ ενζύμου λακκάση (JenaBios, Germany) χρησιμοποιήθηκαν ως χειρισμοί καλούμενοι προς διευκόλυνση ως «H₂O₂» και «laccase» αντίστοιχα.

Όλες οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο παραπάνω πείραμα έλαβαν μέρος σε 0, 3, 6 και 9 ημέρες μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος ή τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Για κάθε χειρισμό, εκτός του αρχικού, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις.

2.3. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Υ.Α.Ε.

Υλικά και όργανα

- ◆ Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων
- ◆ Οξείδιο του ασβεστίου (CaO)
- ◆ Μαγνητικός αναδευτήρας
- ◆ Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- ◆ Ηθμός

- ◆ Άγαρ
- ◆ Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 ml
- ◆ Τρυβλία Petri
- ◆ Κωνικές φιάλες των 1000 ml
- ◆ Αυτόκαυστο
- ◆ Απιονισμένο νερό

Πειραματική πορεία

Αρχικά, αποθηκευμένη στους 5 °C ποσότητα Υ.Α.Ε. αφέθηκε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραπάνω ποσότητα υπέστη προσθήκη CaO έως ότου το pH ρυθμιστεί στην τιμή 6. Ακολούθησε απομάκρυνση υπό ανάδευση τυχόν στερεών υπολειμμάτων με διήθηση. Η αποκτηθείσα ποσότητα υγρών αποβλήτων αποτέλεσε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Α.Ε. συγκέντρωσης 100% v/v. Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα 25 και 50% v/v μετά από αραιώση.

Για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε προσθήκη 17 gr άγαρ ανά λίτρο υγρού θρεπτικού υποστρώματος Υ.Α.Ε. Τα παρασκευασμένα θρεπτικά υποστρώματα τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C σε πίεση 1.2 Atm.

Μετά την έξοδο του από το αυτόκαυστο, το υπόστρωμα παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για λίγα λεπτά και έπειτα τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri.

2.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Υλικά και όργανα

- ◆ Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- ◆ Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- ◆ Κυψελίδες
- ◆ Αντιδραστήριο Follin-Ciocalteu (MERCK)
- ◆ 20% w/v Na₂CO₃
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 1 ml

- ◆ Ακρορύγχια μικροπιπετών
- ◆ Απιονισμένο νερό-Υδροβολέας

Πειραματική πορεία

Σε ογκομετρικές φιάλες των 25 ml τοποθετήθηκε ποσότητα απιονισμένου νερού και εν συνεχεία με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας του 1 ml τοποθετήθηκαν 1.25 ml αντιδραστηρίου Follin-Ciocalteu σε κάθε ογκομετρική φιάλη. Ακολούθησε προσθήκη 0.25 ml δείγματος Υ.Α.Ε. (κατόπιν 1:1 v/v αραιώσεως με απιονισμένο νερό) και 3.75 ml Na₂CO₃ 20% w/v σε κάθε ογκομετρική φιάλη. Με τη βοήθεια του υδροβολέα πραγματοποιήθηκε προσθήκη απιονισμένου ύδατος έως τη χαραγή και ανάδευση των προς ανάλυση δειγμάτων.

Με το πέρας 2 ωρών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων κατόπιν ρυθμίσεως του φασματοφωτόμετρου στα 760 nm.

2.5. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας

Υλικά και όργανα

- ◆ Διηθητικό χαρτί
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- ◆ Σπόροι κάρδαμου (*Lepidium sativum* L.)
- ◆ Πόσιμο νερό
- ◆ Τρυβλία Petri
- ◆ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ◆ Ακρορύγχια μικροπιπετών

Πειραματική πορεία

Τρία διηθητικά χαρτιά προστέθηκαν καταλλήλως στο εσωτερικό ενός τρυβλίου Petri και στην επιφάνεια αυτών προστέθηκαν 25 σπόροι καρδάμου (*Lepidium sativum* L.), οι οποίοι διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος κατάλληλης αραιώσης (1:1 v/v Υ.Α.Ε.: H₂O). Κατόπιν τοποθετήθηκε το σκέπασμα του τρυβλίου και τα τρυβλία επικαλύφθηκαν εξωτερικά με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί έτσι ώστε να διατηρηθεί η υγρασία τους. Οι σπόροι

αφέθηκαν να βλαστήσουν στους 25 °C επί τρεις ημέρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για το μάρτυρα με τη διαφοροποίηση ότι η ποσότητα του δείγματος αντικαταστάθηκε με αντίστοιχη ποσότητα πόσιμου νερού. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα. Με το πέρας των τριών ημερών μετρήθηκε το μήκος της ρίζας και ο αριθμός των εκβλαστημένων σπόρων.

Ο δείκτης βλαστικότητας επί της εκατό (% GI) δίνεται από την παρακάτω σχέση:

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

2.6. Μέτρηση αποχρωματισμού

Υλικά και όργανα

- ◆ Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- ◆ Κυψελίδες
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιολιτριβείων
- ◆ Απιονισμένο νερό-Υδροβολέας
- ◆ Μικροφυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraecus instruments)
- ◆ Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5 ml (Eppendorfs)

Πειραματική πορεία

Σε σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5 ml (Eppendorf) τοποθετήθηκε ποσότητα των προς ανάλυση δειγμάτων και του μάρτυρα και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές επί 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδες και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 500, 525 και 600 nm κατόπιν κατάλληλης ρυθμίσεως του φασματοφωτόμετρου.

Σε πυκνά δείγματα πραγματοποιήθηκε 1:1 v/v αραιώση για τη μέτρηση της απορροφήσεως.

2.7. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση

Υλικά και όργανα

- ◆ Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 1 ml
- ◆ Ακρορύγχια μικροπιπετών
- ◆ Κυψελίδες
- ◆ 1.5 mM ABTS (2,2 – azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfolic acid)
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- ◆ 0.1 M τρυγικό νάτριο pH 4.5
- ◆ Χρονόμετρο

Πειραματική πορεία

Κατά τη διαδικασία υπολογισμού της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα των διαφόρων χειρισμών. Αναλυτικά σε κάθε κυψελίδα τοποθετήθηκαν 0.8 ml δείγματος και 1.2 ml τρυγικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M. Εν συνεχεία τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο και προστέθηκε ποσότητα 0.4 ml ABTS συγκέντρωσης 1.5 mM με σκοπό την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση στα 425 nm όπου λαμβάνονταν μετρήσεις κάθε 20 sec.

Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

2.8. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn)

Υλικά και όργανα

- ◆ Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)

- ◆ Αυτόματη πιπέτα 1 ml
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 200 μl
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 10 μl
- ◆ Ακρορύγχια μικροπιπετών
- ◆ Κυψελίδες
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- ◆ 0.1 M ηλεκτρικό-γαλακτικό νάτριο pH 4.5
- ◆ 25 mM 3-διμέθυλοαμινοβενζοϊκό οξύ (3-dimethylaminobenzoic acid, DMAB)
- ◆ 1 mM 3-μέθυλο-βενζοθειαζολινο-υδραζονο-HCL (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride, MBTH)
- ◆ 10 mM υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

Πειραματική πορεία

Κατά τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) προστέθηκαν σε κυψελίδες 1 ml ηλεκτρικού-γαλακτικού νατρίου, 0.2 ml DMAB, 0.1 ml MBTH και 0.66 ml δείγματος. Ακολούθως, για την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενζυμικής δράσεως με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου λαμβάνοντας μετρήσεις κάθε 20 sec στα 590 nm.

Η ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) υπολογίζεται ως ακολούθως:

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

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

2.9. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Υλικά και όργανα

- ◆ Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 1 ml
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 200 μl
- ◆ Αυτόματη πιπέτα 10 μl
- ◆ Ακρορύγχια μικροπιπετών
- ◆ Κυψελίδες
- ◆ Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- ◆ 0.1 M ηλεκτρικό-γαλακτικό νάτριο pH 4.5
- ◆ 25 mM 3-διμέθυλοαμινοβενζοϊκό οξύ (3-dimethylaminobenzoic acid, DMAB)
- ◆ 1mM 3-μέθυλο-βενζοθειαζολινο-υδραζονο-HCL (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrason-hydrochloride, MBTH)
- ◆ 10 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)
- ◆ 20 mM MnSO₄.H₂O

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση προστέθηκαν σε κυψελίδες 1 ml ηλεκτρικού-γαλακτικού νατρίου, 0.2 ml DMAB, 0.1 ml MBTH, 0.01 MnSO₄.H₂O και 0.66 ml δείγματος. Ακολούθως, για την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενζυμικής δράσεως με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου λαμβάνοντας μετρήσεις κάθε 20 sec στα 590 nm.

Η ενεργότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται ως ακολούθως:

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

όπου E (lt/mol.cm)=32.9 lt/mol.cm

Η ενεργότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της τιμής της AP (Independent peroxidase). Συνεπώς:

$$\mathbf{Mn-peroxidase\ activity = AR - AP}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

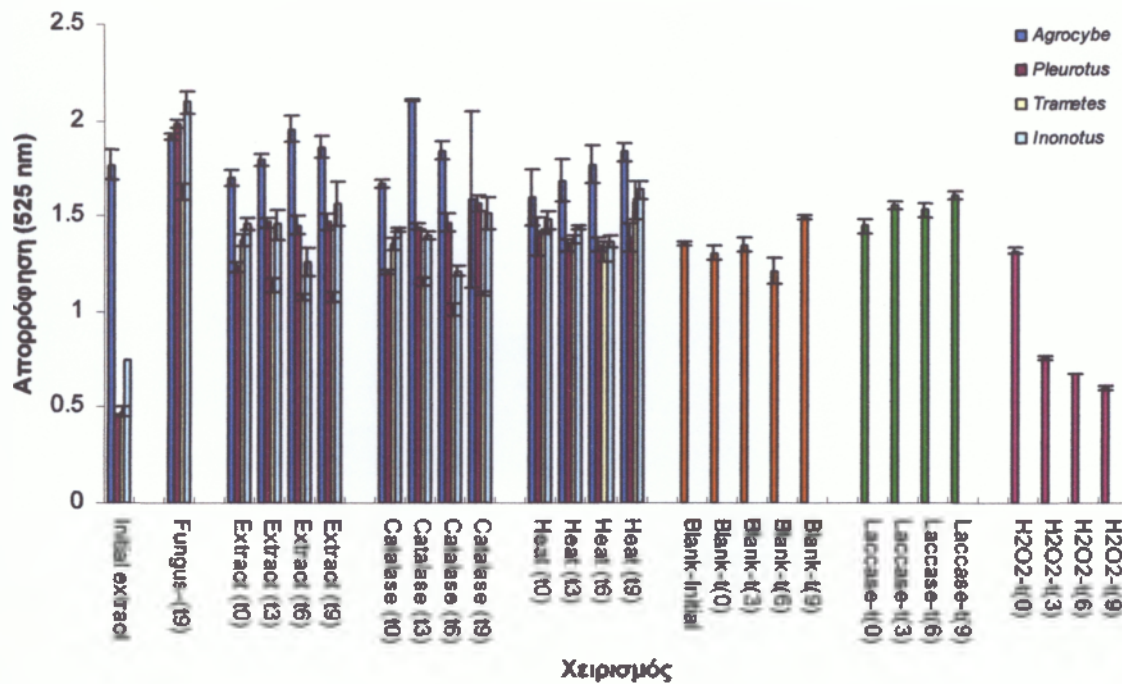
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη μυκήτων *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614, *Agrocybe cylindraceae* IK1123 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557. Η πειραματική διαδικασία διάρκεσε 9 ημέρες, λαμβάνοντας μετρήσεις κάθε τρεις ημέρες. Οι χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στην παράγραφο 2.1. Σε κάθε χειρισμό μετρήθηκε ο βαθμός αποχρωματισμού, το ολικό φαινολικό φορτίο, ο δείκτης βλαστικότητας, καθώς και οι ενεργότητες των ενζύμων λακκάση (φαίνυλο οξειδάση), υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενη του Mn) και Mn-υπεροξειδάση. Επιπλέον, στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω μετρήσεις μόνο τη χρονική στιγμή T9 (εννέα ημέρες μετά τον εμβολιασμό).

3.1. Μελέτη του βαθμού αποχρωματισμού σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείων

Κατά τη μελέτη του βαθμού αποχρωματισμού, στο αρχικό εκχύλισμα (“Initial culture”) παρατηρήθηκαν μικρές τιμές απορρόφησης για τα Υ.Α.Ε. που επώαστηκαν με τα στελέχη των γενών *Pleurotus*, *Trametes* και *Inonotus*, ενώ το χρώμα στο εκχύλισμα που προέκυψε από επώαση Υ.Α.Ε. με το στέλεχος *Agrocybe cylindraceae* IK1123 ήταν υψηλό. Στους χειρισμούς “Extract”, “Catalase”, “Heat” και “Laccase”, καθώς και στους μάρτυρες (“Blank”), δεν παρατηρήθηκε μεταβολή χρώματος σε συνάρτηση με το χρόνο (Διάγραμμα 3.1). Μικρή αύξηση του χρώματος του εκχυλίσματος παρατηρήθηκε κατά τον εμβολιασμό του υποστρώματος (Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v) με τα τέσσερα στελέχη και για επώαση εννέα ημερών (χειρισμός “Fungus-t9”). Επίσης, στους χειρισμούς με προσθήκη του ενζύμου λακκάση (εμπορικό σκεύασμα) σε υπόστρωμα Υ.Α.Ε. δεν παρατηρήθηκε αποχρωματισμός (Διάγραμμα 3.1). Σε αντιδιαστολή, δραστική μείωση χρώματος (μείωση κατά 50% περίπου) παρατηρήθηκε σε χρονικό διάστημα 3 ημερών κατά την προσθήκη 0.15 M H₂O₂ σε

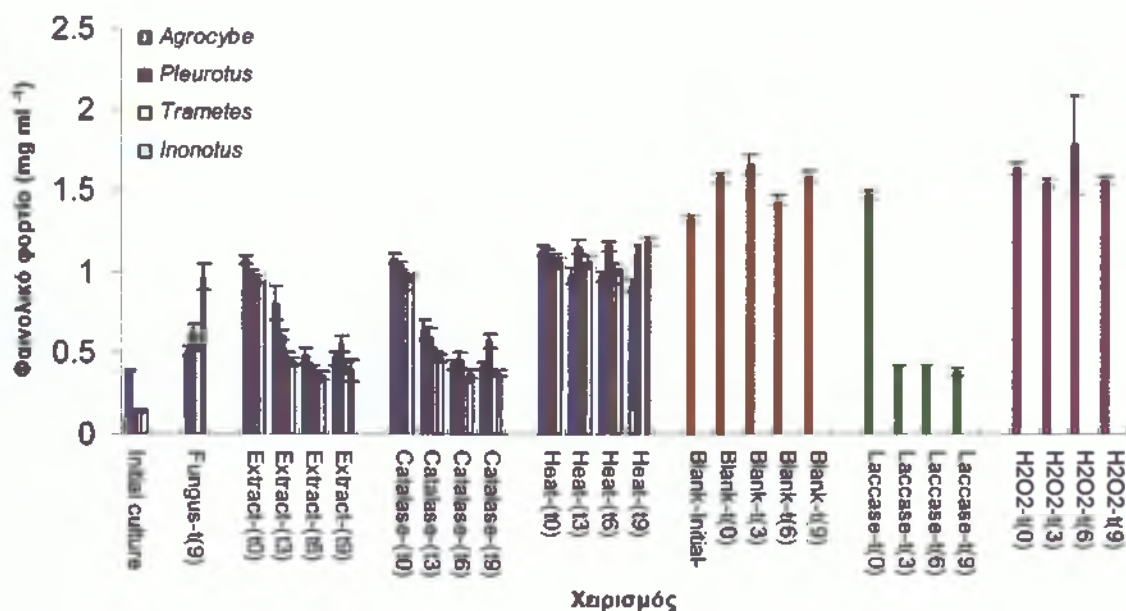
υπόστρωμα Υ.Α.Ε., ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντικός αποχρωματισμός κατά το διάστημα t(3)-t(9) για τον ίδιο χειρισμό (Διάγραμμα 3.1).



Διάγραμμα 3.1. Προσδιορισμός χρώματος ($A_{525 \text{ nm}}$) σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-t(9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: “Heat”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: “Blank”, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany): H₂O₂, Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποία προστέθηκε 0.15 M H₂O₂.

3.2. Μελέτη του βαθμού μείωσης των ολικών φαινολικών συστατικών σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

Κατά τον προσδιορισμό του φαινολικού φορτίου, στο αρχικό εκχύλισμα (“Initial culture”) παρατηρήθηκαν μικρές τιμές για το φαινολικό φορτίο Υ.Α.Ε. που επώαστηκαν με τα στελέχη των γενών *Pleurotus*, *Trametes* και *Inonotus* (0.12, 0.14 και 0.15 mg φαινολικών ml⁻¹ καλλιέργειας αντίστοιχα) ενώ το ολικό φαινολικό φορτίο στο υπόστρωμα που προέκυψε από την επώαση Υ.Α.Ε. με το στέλεχος *Agrocybe cylindraceae* IK1123 ήταν τουλάχιστον 2.6 φορές μεγαλύτερο (0.39 mg φαινολικών ml⁻¹ εκχυλίσματος), αν και κατά πολύ μικρότερο σε σχέση με τον μάρτυρα (“Blank”), τουλάχιστον κατά 70.8%. Επίσης, σημαντική μείωση των φαινολικών, σε σχέση με το μάρτυρα, παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα (Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v) που επώαστηκε με τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Agrocybe cylindraceae* IK1123 για διάστημα εννέα ημερών (χειρισμός “Fungus-t9”). Στο χειρισμό αυτό, η αντίστοιχη μείωση των φαινολικών συστατικών ήταν μικρότερη για το στέλεχος *Inonotus andersonii* CCBAS-557 (μείωση κατά 27.2%). Δραστική μείωση του φαινολικού φορτίου (μείωση κατά 70.7%) παρατηρήθηκε σε χρονικό διάστημα 3 ημερών κατά την προσθήκη του ενζύμου λακκάση σε υπόστρωμα Υ.Α.Ε. (χειρισμός “Laccase-t3”), ενώ καμία μείωση δεν παρατηρήθηκε κατά το επόμενο χρονικό διάστημα (Διάγραμμα 3.2). Καμία μείωση στο φαινολικό φορτίο δεν προσδιορίστηκε κατά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου σε Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, καθώς επίσης και στους χειρισμούς κατά τους οποίους τα εκχυλίσματα υπέστησαν θέρμανση. Μείωση του φαινολικού φορτίου κατά παρόμοιο τρόπο παρατηρήθηκε στους χειρισμούς “Extract” και “Catalase”. Στους χειρισμούς αυτούς, η μείωση του φαινολικού φορτίου ολοκληρώθηκε σε διάστημα τριών (3) ημερών για τα στελέχη *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557, και έξι (6) ημερών για τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15 και *Agrocybe cylindraceae* IK1123 αντίστοιχα, όπου παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα όλων των στελεχών μείωση του φαινολικού φορτίου περίπου στο ήμισυ της αρχικής τιμής (Διάγραμμα 3.2).

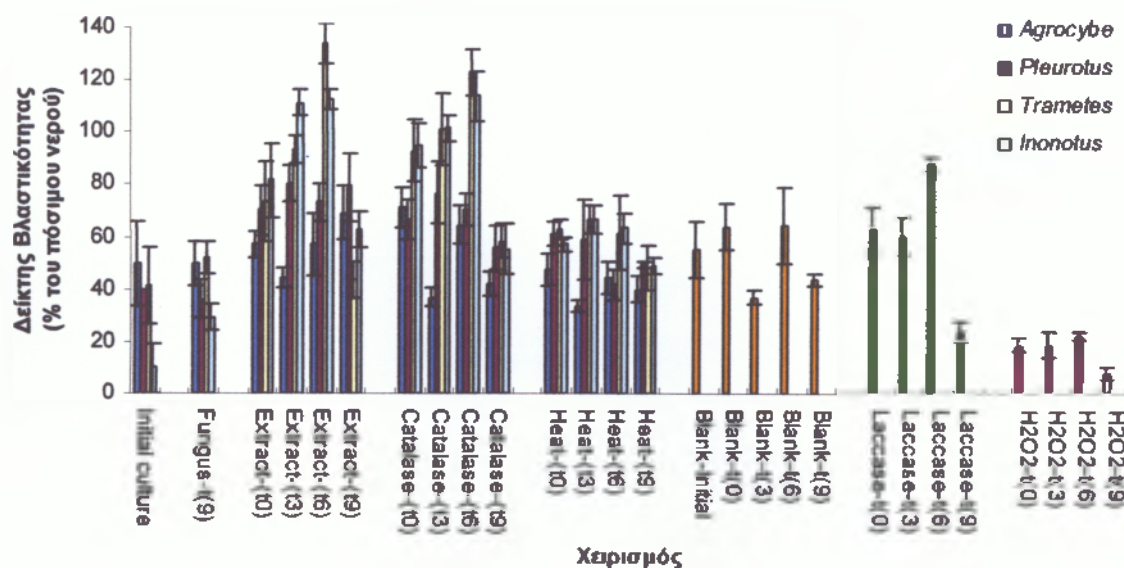


Διάγραμμα 3.2. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: "Initial culture", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: "Fungus-(19)", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: "Catalase", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: "Heat", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: "Blank", αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany): H₂O₂, Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποία προστέθηκε 0.15 M H₂O₂.

3.3. Μελέτη του δείκτη βλαστικότητας σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

Καμία μεταβολή σε συνάρτηση με το χρόνο δεν παρατηρήθηκε κατά τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας σε Υ.Α.Ε. που υπέστησαν θερμική επεξεργασία

(Διάγραμμα 3.3). Ο δείκτης βλαστικότητας μεταβλήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο στους χειρισμούς “Extract” και “Catalase”, όπου καμία σημαντική μεταβολή δε διαπιστώθηκε στους χειρισμούς που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα που προέκυψαν από την επώαση των στελεχών *Pleurotus ostreatus* P15 και *Agrocybe cylindraceae* IK1123, ενώ αύξηση στο δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε μέχρι τη χρονική περίοδο t(6) στους χειρισμούς που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα που προέκυψαν από την επώαση των στελεχών *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557, ενώ οι τιμές του δείκτη βλαστικότητας την περίοδο t(9) για τους παραπάνω χειρισμούς μειώνονταν και επανέρχονταν στις αρχικές τιμές (Διάγραμμα 3.3). Κατά τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε τις έξι (6) πρώτες ημέρες σε Υ.Α.Ε. στα οποία προστέθηκε το ένζυμο λακκάση, ενώ σημαντική μείωση του δείκτη βλαστικότητας (κατά 62.1%) προσδιορίστηκε τη χρονική στιγμή t(9) (Διάγραμμα 3.3). Σημαντική μείωση του δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε σε Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v αμέσως μετά την προσθήκη 0.15 M H₂O₂ (μείωση του δείκτη τουλάχιστον κατά 50%), με τη μέγιστη μείωση αυτού να παρουσιάζεται τη χρονική στιγμή t(9) (μείωση του δείκτη βλαστικότητας τουλάχιστον κατά 80%) (Διάγραμμα 3.3).



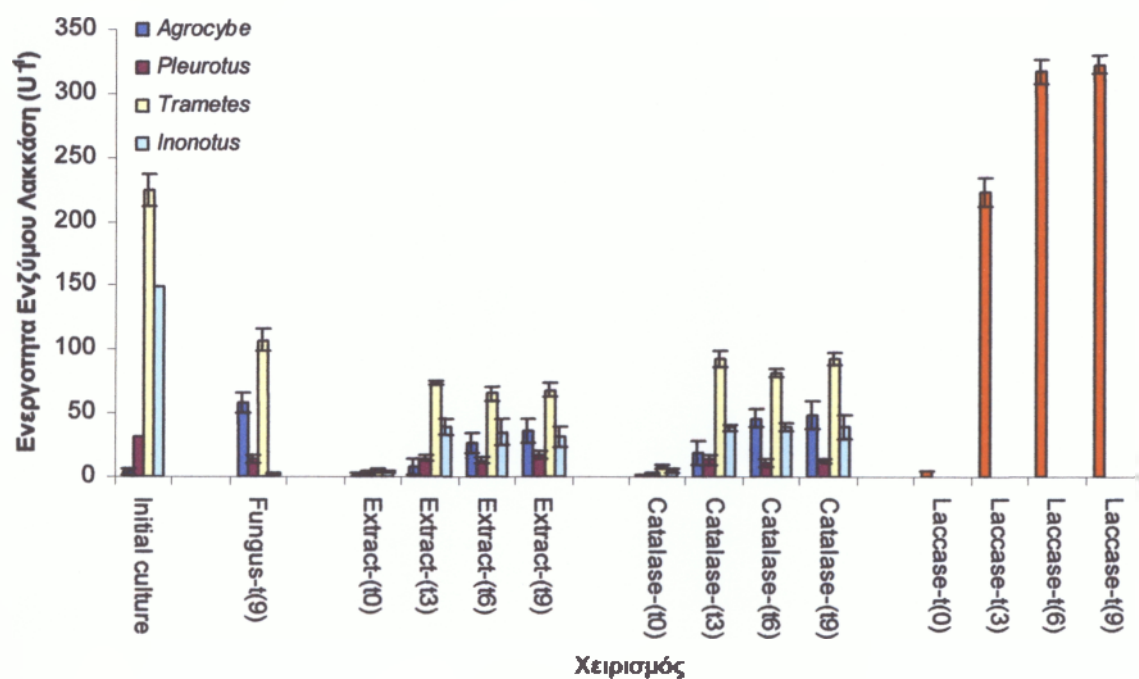
Διάγραμμα 3.3. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5)

εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: "Fungus-(19)", Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: "Catalase", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: "Heat", χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος ("Initial culture") από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, το οποίο μετέπειτα υπέστη θέρμανση στους 80 °C επί 2 ώρες: "Blank", αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany): H₂O₂, Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στα οποία προστέθηκε 0.15 M H₂O₂.

3.4. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση μεταβλήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο στους χειρισμούς "Extract" και "Catalase" (Διάγραμμα 3.4). Με εξαίρεση την χρονική στιγμή t(0) όπου τα επίπεδα της ενεργότητας του ενζύμου αυτού που προσδιορίστηκαν για τα τέσσερα στελέχη βασιδιομυκήτων ήταν αμελητέα, οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση κατά το διάστημα t(3) με t(9) ήταν σταθερές για την περίπτωση των χειρισμών που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα Υ.Α.Ε. που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15, *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557, ενώ για την αντίστοιχη περίπτωση του χειρισμού που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα Υ.Α.Ε. που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με το στέλεχος *Agrocybe cylindraceae* IK1123 παρατηρήθηκε μικρή διαδοχική αύξηση των τιμών της ενεργότητας του ενζύμου αυτού. Στο διάστημα αυτό η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση στους χειρισμούς που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα Υ.Α.Ε. που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με το στέλεχος *Trametes versicolor* CCBAS-614 ήταν υψηλότερη (65.5-92.5 U l⁻¹), ακολουθούμενη από τους χειρισμούς που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα Υ.Α.Ε. που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με το στέλεχος *Inonotus andersonii* CCBAS-557 (35.1-39.7 U l⁻¹). Στις αρχικές καλλιέργειες ("Initial culture") παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση για τα Υ.Α.Ε. που επώαστηκαν με τα στελέχη των γενών *Trametes* και *Inonotus* (224.5 και 148.3 U l⁻¹ αντίστοιχα), ενώ οι αντίστοιχες τιμές στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την επώαση Υ.Α.Ε. με τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15 και *Agrocybe cylindraceae* IK1123 ήταν 30.8

και 4.4 U l^{-1} (Διάγραμμα 3.4). Επίσης, οι υψηλότερες τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση (107.5 και 57.7 U l^{-1} αντίστοιχα) παρατηρήθηκαν κατά τον εμβολιασμό του υποστρώματος (Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως $25\% \text{ v/v}$) με τα στελέχη *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Agrocybe cylindraceae* IK1123 κατόπιν επώασης εννέα ημερών (χειρισμός “Fungus-t9”) (Διάγραμμα 3.4). Δραστική αύξηση (κατά 97.9%) της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση παρατηρήθηκε σε χρονικό διάστημα 3 ημερών μετά την προσθήκη εμπορικού σκευάσματος του ενζύμου αυτού σε υπόστρωμα Υ.Α.Ε. (χειρισμός “Laccase-t3”), ενώ κατά το επόμενο χρονικό διάστημα οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση ήταν παρόμοιες με την αρχική τιμή της ενεργότητας προ της προσθήκης του ενζύμου αυτού σε Υ.Α.Ε. (Διάγραμμα 3.4).

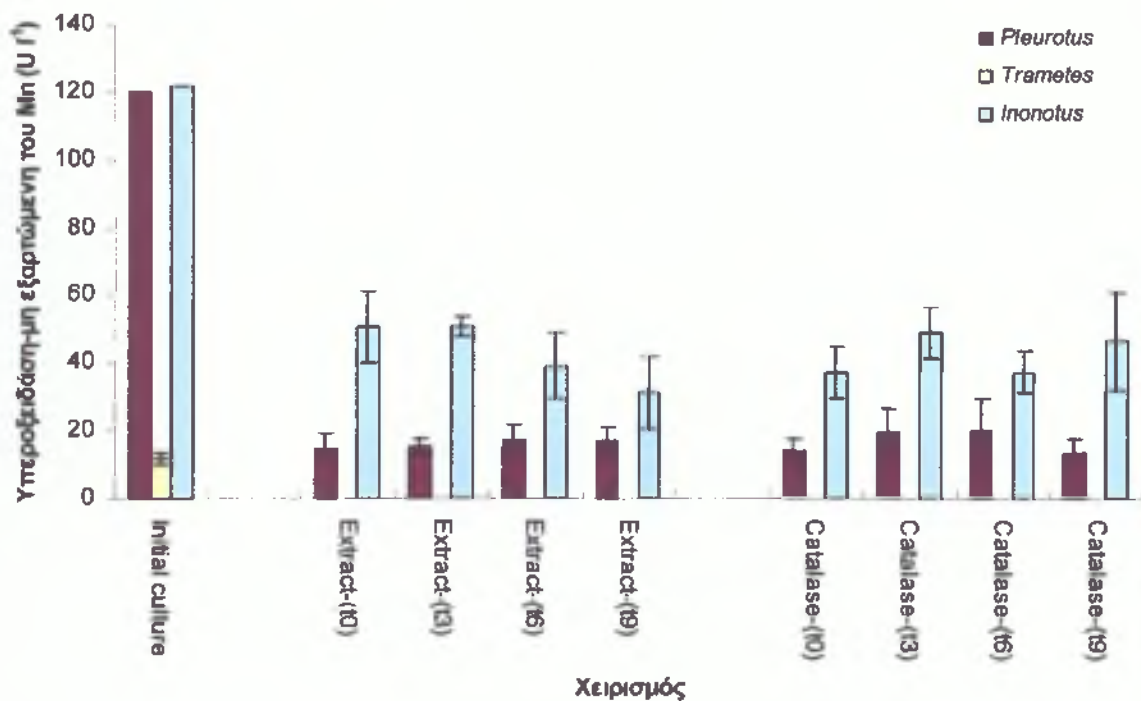


Διάγραμμα 3.4. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Agrocybe*», *Agrocybe cylindraceae* IK1123: «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως $25\% \text{ v/v}$ που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-t(9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως $25\% \text{ v/v}$ που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως $25\% \text{ v/v}$:

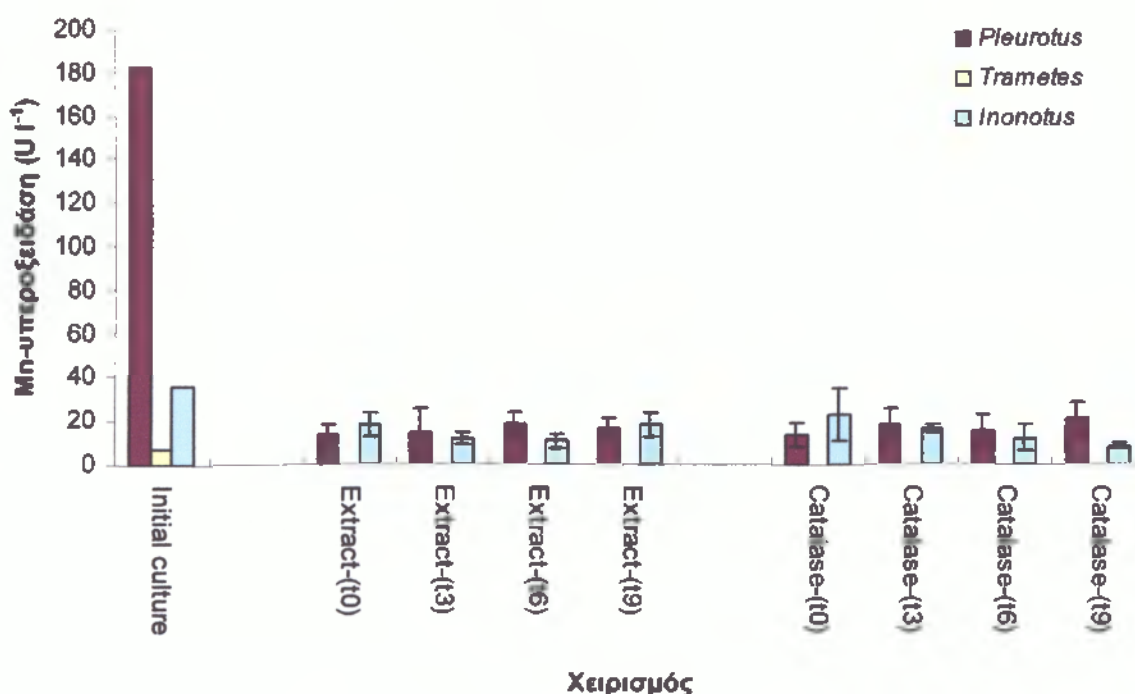
“Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση: Laccase, αποστειρωμένο Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v στο οποίο προστέθηκε ενζύμου λακκάση (0.35 U ml⁻¹ - JenaBios, Germany).

3.5. Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

Η ενεργότητα των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση για τους χειρισμούς “Extract” και “Catalase” προσδιορίστηκε μόνο στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την επώαση Υ.Α.Ε. με τα στελέχη *Inonotus andersonii* CCBAS-557 και *Pleurotus ostreatus* P15. Η ενεργότητα των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση δε μεταβλήθηκε στους χειρισμούς “Extract” και “Catalase” στο χρονικό διάστημα των εννέα ημερών (Διαγράμματα 3.5 και 3.6), αν και μικρή τάση προς μείωση της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την επώαση Υ.Α.Ε. με το στέλεχος *Inonotus andersonii* CCBAS-557. Στην περίπτωση των χειρισμών “Extract” και “Catalase” με το στέλεχος *Inonotus andersonii* CCBAS-557, οι τιμές της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση ήταν υψηλότερες και ίδιες αντίστοιχα με εκείνες των χειρισμών “Extract” και “Catalase” με το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* P15. Στο αρχικό εκχύλισμα (“Initial culture”) παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) για τα Υ.Α.Ε. που επώαστηκαν με τα στελέχη των γενών *Pleurotus* και *Inonotus* (119.9-122 U l⁻¹), ενώ υψηλή τιμή ενεργότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (182.9 U l⁻¹) προσδιορίστηκε μόνο σε Υ.Α.Ε. που επώαστηκαν με το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* P15 (Διαγράμματα 3.5 και 3.6). Καμία ενεργότητα των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση δεν προσδιορίστηκε κατά τον εμβολιασμό του υποστρώματος (Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v) με τα τέσσερα στελέχη βασιδιομυκήτων της παρούσας μελέτης μετά από επώαση εννέα (9) ημερών (χειρισμός “Fungus-t9”) (Διαγράμματα 3.5 και 3.6).



Διάγραμμα 3.5. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση.



Διάγραμμα 3.6. Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Μπ-υπεροξειδάση σε πειραματικούς χειρισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. «*Pleurotus*», *Pleurotus ostreatus* P15: «*Trametes*», *Trametes versicolor* CCBAS-614: «*Inonotus*», *Inonotus andersonii* CCBAS-557: “Initial culture”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα πέντε (5) εβδομάδων, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των επιμέρους χειρισμών: “Fungus-(t9)”, Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v που εμβολιάστηκε με κάθε ένα από τα στελέχη ξεχωριστά και επώαστηκε επί χρονικό διάστημα εννέα (9) ημερών: Extract, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v: “Catalase”, χειρισμός κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 ml εκχυλίσματος (“Initial culture”) από κάθε στέλεχος μύκητα σε 30 ml Υ.Α.Ε συγκεντρώσεως 25% v/v, παρουσία 50 U ml⁻¹ του ενζύμου καταλάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συζήτηση

Διάφοροι βασιδιομύκητες και κυρίως μύκητες λευκής σήψεως έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν στην αποδόμηση τοξικών προς το περιβάλλον αποβλήτων όπως υπολείμματα βιομηχανιών τροφίμων, φυτοφάρμακα κ.α. (Field *et al.*, 1992; Sack *et al.*, 1997; Sayadi & Ellouz, 1995; Tortella *et al.*, 2005; van Hamme *et al.*, 2003). Η αποδόμηση τους οφείλεται κυρίως στην παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων όπως φαινυλοξειδάσες, υπεροξειδάσες εξαρτώμενες και μη του Mn, λιγνίνη-υπεροξειδάσες και υπεροξειδάσες της βερατρυλικής αλκοόλης (Kirk & Farrell, 1987; Thurston, 1994). Η παρούσα μελέτη αποβλέπει α) στη μελέτη της δράσεως διαφόρων λιγνινολυτικών ενζύμων και κυρίως των ενζύμων λακκάση και Mn-υπεροξειδάση, β) στη μελέτη του ρόλου του H₂O₂ στον αποχρωματισμό και στην αποδόμηση των υγρών αποβλήτων και γ) στη μελέτη της ικανότητας εκχυλισμάτων που παράγονται κατά την ανάπτυξη βασιδιομυκήτων σε Υ.Α.Ε. σε σχέση πάντοτε με την ικανότητα αποδόμησης αυτών. Επιπλέον, η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη συγκριτική μελέτη της δράσης διαφόρων μυκήτων λευκής σήψεως (στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *Trametes versicolor*, *Inonotus andersonii* και *Pleurotus ostreatus*) σε σχέση με τη δράση άλλων βασιδιομυκήτων (στην κατηγορία αυτή ανήκει το είδος *Agrocybe cylindraceae*).

Βάση των πειραματικών δεδομένων διαπιστώθηκε ότι τυχόν ποσότητες H₂O₂ που μπορεί να υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου δεν προκαλούν χημική αποδόμηση των υγρών αυτών αποβλήτων, αφού καμία απόκλιση δεν προσδιορίστηκε για τις διάφορες φυσικοχημικές και βιοχημικές παραμέτρους (ενζυμική δράση) που υπολογίστηκαν στους χειρισμούς «Extract» και «Catalase».

Προσθήκη H₂O₂ συγκεντρώσεως 0.15 M προκάλεσε αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου που όμως συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της τοξικότητας των αποβλήτων αυτών, πιθανόν λόγω της οξειδωσης έγχρωμων οργανικών συστατικών σε πιο τοξικές ενώσεις π.χ. σχηματισμός κέτο- και καρβόξυ- ενώσεων (Jaouani *et al.*, 2006). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη ενός μηχανισμού ενεργών ριζών που με την

πραγμάτωση αλυσιδωτών αντιδράσεων προκαλεί τη μετατροπή διαφόρων οργανικών ουσιών σε σύντομο χρονικό διάστημα (σε χρόνο μικρότερο των τριών ημερών).

Η δράση του ενζύμου λακκάση φαίνεται να μην προκαλεί αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, αφού καμία μεταβολή του χρώματος αυτού δεν παρατηρήθηκε τόσο στην περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος όσο και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των τεσσάρων στελεχών βασιδιομυκήτων. Στην περίπτωση του στελέχους *Agrocybe cylindraceae* IK1123 παρατηρήθηκε, στα πρώτα πειραματικά στάδια, μικρή αύξηση του χρώματος των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε στο πολυμερισμό διαφόρων ενώσεων (Farnet *et al.*, 2000) είτε στη μετατροπή ουσιών σε πιο έγχρωμες ενώσεις (Thurston, 1994).

Προσθήκη εμπορικού σκευάσματος του ενζύμου λακκάση προκάλεσε ραγδαία μείωση των φαινολικών σε χρόνο μικρότερο των τριών ημερών, ενώ οι ποσότητες του ενζύμου λακκάση που παρήχθησαν από τα στελέχη των γενών *Pleurotus* και *Agrocybe* προκάλεσαν μείωση του φαινολικού φορτίου κατά τον ίδιο βαθμό αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (σε χρόνο 3-6 ημερών). Όπως στην περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος, η δράση του ενζύμου λακκάση που παρήχθη από τα στελέχη των γενών *Trametes* και *Inonotus* προκάλεσε δραστική μείωση των φαινολικών (εντός 3 ημερών). Εν συγκρίσει με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την επώαση των τεσσάρων στελεχών βασιδιομυκήτων σε Υ.Α.Ε. συγκεντρώσεως 25% v/v επί χρονικού διαστήματος 9 ημερών, η προσθήκη εκχυλίσματος ήταν αποτελεσματικότερη όσον αφορά τη μείωση των φαινολικών συστατικών αφού μέσα σε διάστημα μικρότερο των 6 ημερών μειώθηκε το φαινολικό φορτίο κατά μεγαλύτερο βαθμό από ότι στον χειρισμό «Fungus».

Όσον αφορά τη μελέτη του δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε αύξηση αυτού μόνο στην περίπτωση των χειρισμών που περιελάμβαναν τα εκχυλίσματα των στελεχών *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557 για διάστημα 6 ημερών, ενώ τη χρονική στιγμή t(9) παρατηρήθηκε αύξηση της φυτοτοξικότητας στα εκχυλίσματα των στελεχών αυτών. Για τη μελέτη του δείκτη βλαστικότητας σε Υ.Α.Ε. στα οποία είχε προηγηθεί προσθήκη του ενζύμου λακκάση (εμπορικού σκευάσματος) δεν παρατηρήθηκε αύξηση του δείκτη βλαστικότητας, αντιθέτως την χρονική στιγμή t(9) παρατηρήθηκε μείωση αυτού σε μεγάλο βαθμό, προφανώς οφειλόμενη στο ότι τα τελικά προϊόντα της οξείδωσης που προκάλεσε το ένζυμο λακκάση ήταν πιο τοξικά (Jaouani *et al.*, 2006).

Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση τόσο στην περίπτωση της παραγόμενης ποσότητας του ενζύμου αυτού από τα στελέχη βασιδιομυκήτων όσο και στην περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος ήταν σταθερή. Οι μικρές τιμές της ενεργότητας του ενζύμου

λακκάση που ελήφθησαν κυρίως κατά το χρόνο t(0) και σε μικρότερο βαθμό στο χρόνο t(3) μπορούν να αποδοθούν σε συμμετοχή του ενζύμου αυτού σε διαδικασίες πολυμερισμού οργανικών ενώσεων των Υ.Α.Ε. (Farnet *et al.*, 2000) ή σε προσωρινή δέσμευση του εξαιτίας του υψηλού φορτίου πολυφαινολών (Jaouani *et al.*, 2006).

Μέρος της ενεργότητας των ενζύμων Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn μειώθηκε κατά την πραγμάτωση των χειρισμών σε σχέση με τις αρχικές καλλιέργειες. Έτσι, δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα των παραπάνω ενζύμων στους χειρισμούς που πραγματοποιήθηκαν με εκχυλίσματα που παράχθηκαν κατά την ανάπτυξη του στελέχους *Trametes versicolor* CCBAS-614, ενώ παράλληλα οι αντίστοιχες ενεργότητες των ενζύμων αυτών που παράχθηκαν από την ανάπτυξη των μυκήτων λευκής σήψεως *Pleurotus ostreatus* P15 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557 κυμαινόταν σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τις αρχικές καλλιέργειες. Στο σημείο αυτό τονίζεται ότι οι υπολειπόμενες ενεργότητες των ενζύμων Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn που ανιχνεύτηκαν στους χειρισμούς 'Extract' για τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* P15 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557 παρέμεναν σταθερές για όλο το διάστημα των 9 ημερών. Η αδυναμία προσδιορισμού της ενεργότητας των ενζύμων Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn, στην περίπτωση των υποστρωμάτων Υ.Α.Ε. και των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την ανάπτυξη του στελέχους *Agrocybe cylindraceae* IK1123, μπορεί να αποδοθεί στη μη παραγωγή του ενζύμου αυτού εξαιτίας της ταξινομικής του θέσης, αφού το στέλεχος αυτό ανήκει μεν στο φύλλο Basidiomycota αλλά όχι στην κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψεως (Alexopoulos *et al.*, 1996). Η παραγωγή των ενζύμων Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn δεν είναι συνήθη στην περίπτωση των μυκήτων λευκής σήψεως που αναπτύσσονται σε υποστρώματα υψηλού φαινολικού φορτίου όπως είναι τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Aggelis *et al.*, 2002; 2003). Εντούτοις, υπεροξειδάσες (εξαρτώμενες και μη του Mn) έχουν ανιχνευθεί κατά την ανάπτυξη των ειδών *Trametes versicolor* (Johansson & Nyman, 1993) και *Pleurotus ostreatus* (Aggelis *et al.*, 2002).

Όσον αφορά την αποδόμηση των Υ.Α.Ε. με τα εκχυλίσματα που παράχθηκαν από τα είδη βασιδιομυκήτων της παρούσας μελέτης, τα στελέχη *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Inonotus andersonii* CCBAS-557 παρουσιάζουν καλύτερη βιοποικοδομητική δράση αφού προκάλεσαν μεγάλη μείωση του φαινολικού φορτίου, σημαντικό αποχρωματισμό και αύξηση του δείκτη βλαστικότητας (τις πρώτες 6 ημέρες επώασης με εκχυλίσματα αυτών), ενώ παράλληλα διατηρούσαν υψηλές και σταθερές τις τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση. Επίσης, στην περίπτωση του στελέχους *Inonotus andersonii* CCBAS-557

παρατηρήθηκαν και υψηλές ενεργότητες των ενζύμων Μπ-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Μπ στα εκχυλίσματα αυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Addleman, K., Dumonceaux, T., Paice, M.G., Bourbonnais, R., Archibald, F.S., 1995. Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hardwood kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3687-3694.
- Adosinda, M., Martins, M., Lima, N., Armando, J.D.S., João Queiroz, M., 2003. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere* **52**, 967-973.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., Zervakis, G., 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.
- Aktas, N., Tanyolaç, A., 2003. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology* **87**, 209-214.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* **91**, 195-200.
- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M., 1996. Introductory mycology. Wiley & Sons, New York.
- Assas, N., Marouani, L., Hamdi, M., 2000. Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering* **22**, 503-507.
- Attanasio, A., Diano, N., Gramo, V., Stefano, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Fraconte, L., Di Martino, S., Canciglia, P., Mita, D.G., 2005. Nonisothermal bioreactors in the treatment of vegetation waters from olive oil: laccase versus syringic acid as bioremediation model. *Biotechnology Progress* **21**, 806-815.

Aveni, A., 1984. Biogas recovery from olive mill wastewater by anaerobic digestion. In: *Anaerobic digestion of carbohydrate hydrolysis of waste*, pp. 489-491 (Edited by Ferrero, G.L., Ferrantii, M.P., Neveau, H.). Elsevier, USA.

Ayed, L., Hamdi, M., 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 59-65.

Banci, L., Bertini, I., Pease, E.A., Tien, M., Turano, P., 1992. H¹-NMR investigation of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - a comparison with other peroxidases. *Biochemistry* **31**, 10009-10017.

Barr, D.P., Shah, M.M., Grover, T.A., Aust, S.D., 1992. Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**, 480-485.

Blanquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* **38**, 2166-2172.

Boari, G., Brunetti, A., Passino, R., Rozzi, A., 1984. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Agricultural Wastes* **10**, 161-175.

Borja, R., Martin, A., Fiestas, J.A., 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., Garrido, S.E., Martinez, L., Ramos-Comenzana, A., 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., Alonso, V., Garcia, I., Banks, C.J., 1995a. Influence of different aerobic pre-treatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research* **29**, 489-495.

Borja, R., Martin, A., Banks, C.J., Alonso, V., Chica, A., 1995b. A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environmental Pollution* **88**, 13-18.

Borja, R., Alba, J., Mancha, A., Martin, A., Alonso, V., Sánchez, E., 1998. Comparative effect of different aerobic pretreatments on the kinetics and macroenergetic parameters of anaerobic digestion of olive mill wastewater in continuous mode. *Bioprocess Engineering* **18**, 127-134.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1876-1880.

Buswell, J.A., Odier, E., 1987. Lignin biodegradation. *CRC Critical Review in Biotechnology* **6**, 1-60.

Buswell, J.A., Cai, Y., Chang, S.T., 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 81-88.

Cappaso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F., 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewaters. *Phytochemistry* **31**, 4125-4128.

Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., Cristinzio, G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 393-398.

Carrieri, C., Balice, V., Rozzi, A., 1988. Comparison of three anaerobic treatment processes on olive mill effluents. Proceedings of the International Conference on Environmental Protection, Ischia, Italy.

Casa, R., D'Annibale, A., Rieruccetti, F., Stazi, S.R., Sermanni, G.G., 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.

Černý, (Ellis & Everh.) (1963). *Inonotus andersonii*. *Česká Mykol.* **17**, 1.

Crestini, C., Jurasek, L., 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., Crestini, C., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G., 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology* **61**, 209-218.

D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G., 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* **77**, 265-273.

D'Annibale, A., Ricci, M., Quaratino, D., Federici, F., Fenice, M., 2004a. *Panus tigrinus* efficiently removes, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* **155**, 596-603.

D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., Marabottini, R., 2004b. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* **54**, 887-894.

Di Gioia, D., Fava, F., Bertin, L., Marchetti, L., 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of monocyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 619-626.

Di Gioia, D., Barberio, C., Spagnesi, S., Marchetti, L., Fava, F., 2002. Characterization of four olive-mill wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Archives of Microbiology* **178**, 208-217.

Dooley, D.M., Rawlings, J., Dawson, J.H., Stephens, P.J., Andréasson, L.E., Malmström, B.G., Gray, H.B., 1979. Spectroscopic studies of *Rhus vernicifera* and *Polyporus versicolor* laccase-electronic-structures of the copper sites. *Journal of American Chemical Society* **101**, 5038-5046.

Dorado, J., Claassen, F.W., van Beek, T.A., Lenon, G., Wijnberg, J.B.P.A., Sierra-Alvarez, R., 2000. Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *Journal of Biotechnology* **80**, 231-240.

Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., Davies, G.J., 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution. *Nature Structural Biology* **5**, 310-316.

Dumonceaux, T.J., Bartholomew, K.A., Charles, T.C., Moukha, S.M., Archibald, F.S. 1998. Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene* **210**, 211-219.

Dunford, H.B., Stillman, J. S., 1976. Function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* **19**, 187-251.

Dutton, M.V., Evans, C.S., Atkey, P.T., Wood, D.A., 1992. Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 5-10.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1151-1158.

Ehaliotis, C., Papadopoulou, K., Kotsou, M., Mari, I., Balis, C., 1999. Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 301-311.

Esposito, E., Canhos, P.V., Duran, N., 1991. Screening of lignin degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional carbon source. *Biotechnology Letters* **13**, 571-576.

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.

Field, J.A., Dejong, E., Costa, G.F., Debont, J., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2219-2226.

Fiestas Ros De Ursinos, J.A., 1977. Depuracion de aguas residuales en las industrias de aceitunas y aceites de oliva. *Grasas y Aceites* **28**, 113-121.

Fiestas Ros De Ursinos, J.A., 1981. Différentes utilisations des margines, pp. 93-100. In: *Proceedings of Séminaire International sur la Valorisation des Sous-Produits de l'Olivier*. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Tunisie.

Fiestas Ros De Ursinos, J.A., 1986. Vegetation water used as a fertilizer, pp. 321-330. In: *International Symposium on olive by-products valorization*. Seville-Spain, March 1986.

Fiestas, J.A., Borja, R., 1989. Aprovechamiento y depuración integral del alpechín: estado actual y perspectivas. *Nuestra Comunidad* **6**, 40-48.

Fiestas, J.A., Borja, R., 1992. Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites* **43**, 101-106.

FitzGibbon, F., Singh, D., McMullan, G., Marchant, R., 1998. The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. *Process Biochemistry* **33**, 799-803.

Fotopoulos, C., Liodakis, G., Tzouvelekas, V., 1998. Changing policy agenda for European agriculture: its implications for the Greek olive oil sector, pp. 79-84. In *CAP Reform: The Southern Products*, ed. Tracy, M. Genappe, Belgium: EC Agricultural Policy Studies.

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

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

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M., 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* **3**, 1-25.

Gillet, D.C., 1874. *Agrocybe cylindraceae*. *Hyménomycètes* (Alençon) 106.

Glenn, J. K., Gold, M.H., 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(ii)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242**, 329-341.

Gold, M.H., Alic, M., 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* **57**, 605-622.

Gold, M.H., Wariishi, H., Valli, K., 1989. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symposium Series* **389**, 127-140.

Gonzales, M.D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Crmenzana, A., 1990. Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere* **20**, 423-432.

Gonzalez-Lopez, J., Bellido, E., Benitez, C., 1994. Reduction of total polyphenols in olive mill wastewaters by physico-chemical purification. *Journal of Environmental Science Health Part A* **29**, 851-865.

Haddalin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S., Robinson, R.K., 2002. Biodegradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresource Technology* **82**, 131-137.

Hafidi, M., Ait Badi, G., Chetoui, A., 2004. Traitments des effluents liquides d'huileries d'olives par des microorganismes aérobie. *Agrochimica XLVIII*, 1-12.

Hafidi, M., Amir, S., Revel, J.P., 2005. Structural characterisation of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Process Biochemistry* **40**, 2615-2622.

Hamdi, M., 1992. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters 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., Ellouz, R., 1993. Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidizes bed process. *Environmental Technology* **19**, 183-188.

Hamdi, M., 1996. Anaerobic digestion of Olive Mill Wastewaters. *Process Biochemistry* **31**, 105-110.

Hammel, K.E., Moen, M.A., 1991. Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **13**, 15-18.

Harris, R.Z., Wariishi, H., Gold, M.H., Ortiz de Montellano, P.R., 1991. The catalytic site of manganese peroxidase. Regiospecific addition of sodium azide and alkylhydrazines to the heme group. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8751-8758.

Hatakka, A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 125-135.

Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 1958-1962.

Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M.K., Schauer, F., 2000. Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4157-4160.

Jaouani, A., Tabka, M.G., Penninckx, M.J., 2006. Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere* **62**, 1421-1430.

Jarosz-Wilkolazka, A., Gadd, G.M., 2003. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* **52**, 541-547.

Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 524-528.

Johansson, T., Nyman, P.O., 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*, I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 49-56.

Johansson, T., Nyman, P.O., 1996. A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* **170**, 31-38.

Jones, C.E., Murphy, P.J., 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.

Jonsson, L., Karlsson, O., Lundquist, K., Nyman, P.O., 1989. *Trametes versicolor* ligninase: isozyme sequence and substrate specificity. *FEBS Letters* **247**, 143-146.

Joshi, D., Gold, M.H., 1993. Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1779-1785.

Iconomou, D., Christou, M., Bokas, M., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S., 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the progress. *Water Research* **37**, 3897-3904.

Kachouri, F., Hamdi, M., 2004. Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 841-845.

Katagiri, N., Tsutsumi, Y., Nishida, T., 1995. Correlation of brightening with cumulative enzyme-activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white-rot fungi in the solid-state fermentation system. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 617-622.

Keum, Y.S., Li, Q.K., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* **56**, 23-30.

Kim, S.J., Shoda, M., 1999a. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnology and Bioengineering* **62**, 114-119.

Kim, S.J., Shoda, M., 1999b. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1029-1035.

Kirk, T.K., Farrell, R., 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**, 465-505.

Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G., 2001. Roles of two white-rot basidiomycetes fungi in decolorisation and detoxification of olive mill wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 221-226.

Kuan, I.C., Tien, M., 1993. Stimulation of Mn peroxidase activity: A possible role for oxalate in lignin biodegradation *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **90**, 1242-1246.

Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., Sasek, V., 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* **43**, 207-215.

Kumm, Fr.P., 1871. *Pleurotus. Führer für Pilzfreunde* (Zwickau) **24**, 104.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* **169**, 247-250.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. Guerzoni, M.E., 2005. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* **96**, 317-322.

Leatham, G.F., 1986. The lignolytic activities of *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**, 51-58.

Lee, I.Y., Jung, K.H., Lee, C.H., Park, Y.H., 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes vesicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters* **21**, 965-968.

Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., Fiechter, A., 1987. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 419-424.

Libra, J.A., Borchert, M., Banit, S., 2002. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile condition. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 736-744.

Liu, W., Chao, Y., Yang, X., Bao, H., Qian, S., 2004. Biodegradation of azoanthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31**, 127-132.

Lloyd, L., 1921. *Trametes versicolor*. *Mycological Notes* **65**, 1045.

Lo Scalzo, R., Scarpati, M.L., 1993. A new secoiridoid from olive wastewaters. *Journal of Nature Products* **56**, 621-623.

Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S.R., Sanroman, A., 2002. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* **82**, 109-113.

Mai, C., Milstein, O., Hüttermann, A., 2000. Chemoenzymatical grafting of acrylamide onto lignin. *Journal of Biotechnology* **79**, 173-183.

Mansur, M., Suarez, T., FernandezLarrea, J.B., Brizuela, M.A., Gonzalez, A.E., 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2637-2646.

Marinos, E., 1991. Laggoning concentration of olive oil processing wastewaters. Proceedings of International Conference on olive oil processing wastewater treatment methods. Hania, Crete, Greece.

Martin, A., Borja, R., Garcia, I., Fiestas, J.A., 1991. Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process Biochemistry* **26**, 101-107.

Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., 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.

Messerschmidt, A., Huber, R., 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modeling and structure relationships. *European Journal of Biochemistry* **187**, 341-352.

Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., 1992. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **224**, 179-205.

Messerschmidt, A., 1997. Multi-copper oxidases, ed. Messerschmidt, A. World Scientific Publishing Co., River Edge, NJ, USA.

Michel, F.C., Dass, S.B., Gulkcand, E.A., Reddy, C.A., 1991. Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerpchaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2368-2375.

Mikolasch, A., Schauer, F., 2003. Biotransformation of N-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides and kinetic studies by using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Journal of Basic Microbiology* **43**, 508-521.

Milstein, O., Gersonde, R., Huttermann, A., Chen, M.J., Meister, J.J., 1992. Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft-copolymers. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3225-3232.

Mino, Y., Wariishi, H., Blackburn, N.J., Loehr, T.M., Gold, M.H., 1988. Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 7029-7036.

Moreno, E., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A., Martinez, J., 1987. Antimicrobial effect of wastewater from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios* **51**, 169-174.

Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A., 1990. Antibacterial activity of washwater from olive mills. *Encyclopaedie of Environmental Control Technology* **3**, 731-736.

Morisot, A., Tournier, J.P., 1986. Répercussions agronomique de l'épanadage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agromonie* **6**, 235-241.

Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2006. Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey. Elsevier Publishers Waste Management Series 5, Second Edition.

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

Ntougias, S., Zervakis, G.I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., Papadopoulou, K.K., 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology* **157**, 376-385.

Overholts, L.O., 1967. *The Polyporaceae of the U.S. Alaska and Canada*, pp. 342-344. University Michigan Press, Second Edition, USA.

Ozturk, I., Sakar, S., Ubay, G., Eroglu, V., 1991. Anaerobic treatment of olive mill effluents. Proc. 46th Industrial Waste Conf. Purdue University, West Lafayette, IN, USA.

Panizza, M., Cerisola, G., 2006. Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. *Water Research* **40**, 1179-1184.

Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J., Roig, A., 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology* **85**, 1-8.

Paszczynski, A., Huynh, V.B., Crawford, R., 1986. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **244**, 750-765.

Pease, E.A., Andrawis, A., Tien, M., 1989. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Primary structure deduced from cDNA sequence *Journal of Biological Chemistry* **264**, 13531-13535.

Perez, J.D., Esteban, E., Gomez, M., 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 Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **21**, 349-357.

Perez, J.D., Gallardo-Lara, F., 1987. Effects of the application of wastewater from olive processing on soil nitrogen transformation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **18**, 1031-1039.

Prinbow, D., Mayfield, M.B., Nipper, V.J., Brown, J.A., Gold, M H., 1989. Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 5036-5040.

Quero, M.C., 1998. Problems facing the olive oilsector in Spain, pp. 85-91. In *CAP Reform: The Southern Products*, ed. Tracy, M. Genappe, Belgium: EC Agricultural Policy Studies.

Ramos-Carmenzana, A., Juarez-Jiménez, B., Garcia-Pareja, P., 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 283-290.

Reddy, C.A., 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 320-328.

Reid, I.D., 1998. Fate of residual lignin during delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2117-2125.

Reinhammar, B., 1984. Laccase, pp.1-35. In: Copper proteins and copper enzymes, vol. 3, ed. Lontie, R.. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

Ritter, D., Jaklin-Farcher, S., Messner, K., Stachelberger, H., 1990. Polymerisation and depolymerisation of lignosulfonate by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on foam. *Journal of Biotechnology* **13**, 229-241.

Rodriguez, M.M., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A., Martinez, J., 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill wastewaters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 219-225.

Rozzi, A., Passino, R., Limoni, M., 1989. Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactor. *Process Biochemistry* **4**, 68-74.

Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F., Fritsche, W., 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3919-3925.

Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W., Gomez-Alarcon, G., 1987. Sludge from the wastewater of the olive processing industry: A potential soil fertilizer?. *The Science of the Total Environment* **52**, 445-452.

Sarkanen, S., Razal, R.A., Piccariello, T., Yamamoto, E., Lewis, N.G., 1991. Lignin peroxidase toward a clarification of its role *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3636-3643.

Sayadi, S., Ellouz, R., 1992. Decolorization of olive mill wastewaters by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**, 813-817.

Sayadi, S., Ellouz, R., 1993. Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **57**, 141-146.

Sayadi, S., Ellouz, R., 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1098-1103.

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

Serguei, L., Timofeevski, N., Reading, S., Aust, S.D., 1998. Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemistry and Biophysics* **356**, 287-295.

Sethuraman, A., Akin, D.E., Eisele, J.G., Eriksson, K.E.L., 1998. Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Canadian Journal of Microbiology* **44**, 872-885.

Singer, R., 1986. The Agaricales in modern taxonomy, pp. 174-179, 4th ed.. Koeltz Scientific Books, Germany.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* **96**, 2563-2605.

Stamets, P., 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press, USA.

Stapleton, P.C., Dobson, A.D., 2003. Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. *FEMS Microbiology Letters* **221**, 167-172.

Stapleton, P.C., O'Mahony, J., Dobson, A.D.W., 2004. Real-time PCR analysis of carbon catabolite repression of cellobiose dehydrogenase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Canadian Journal of Microbiology* **50**, 113-119.

Staszczak, M., Zdunek, E., Leonowicz, A., 2000. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effects of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *Journal of Basic Microbiology* **40**, 51-63.

Tanaka, H., Hakuna, S., Enoki, A., 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* **75**, 57-70.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.

Tien, M., 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **15**, 141-168.

Tortella, G.R., Diez, M.C., Duran, N., 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* **31**, 197-212.

Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Agellis 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.

Tsonis, S., 1988. Elaboration of olive oil mill wastewaters. Ph. D. thesis, Civil Engineering Department of Patras University, Greece.

Tuncel, G., Nergiz, C., 1993. Antimicrobial effects of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology* **17**, 300-302.

Uldschmid, A., Engel, M., Dombi, R., Marbach, K., 2002. Identification and functional expression of *tahA*, a filamentous fungal gene involved in copper trafficking to the secretory pathway in *Trametes versicolor*. *Microbiology* **148**, 4049-4058.

Uldschmid, A., Dombi, R., Marbach, K., 2003. Identification and functional expression of *ctaA*, a P-type ATPase gene involved in copper trafficking in *Trametes versicolor*. *Microbiology* **149**, 2039-2048.

Van de Tempel, T., Jakobsen, M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal* **10**, 263-270.

van Hamme, J.D., Wong, E.T., Dettman, H., Gray, M.R., Pickard, M.A., 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1320-1324.

Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Delle Monache, G., Sermanni, G.G., 1995. Correlated effects during the bioconversion of waste olive water by *Lentinula edodes*. *Bioresource Technology* **51**, 221-226.

Walter, W.M.J.R., Fleming, H.P., Etchells, J.L., 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology* **26**, 773-776.

Wariishi, H., Akileswaran, L., Gold, M.H., 1988. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized and the catalytic cycle. *Biochemistry* **27**, 5365-5370.

Wariishi, H., Dunford, H.B., MacDonald, I.D., Gold, M.H., 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3335-3340.

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1991. *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **176**, 269-275.

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of reactors. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 23688-23695.

Welinder, K.G., 1991. Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta* **1080**, 215-220.

Whitehead, D.C., 1964. Identification of *p*-hydroxybenzoic, vanilic, *p*-coumaric and ferulic acids in soils. *Nature* **202**, 417-418.

Yesilada, O., Sik, S., Sam, M., 1998. Biodegradation of olive mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 37-42.

Zaim, H., Baily, J.R., Codomier, L., 1994. Influence d'une argile sur la formation des substances parahumiques d'origine microbienne. *Agrochimica* **39**, 18.

Zenjari, I., Hafidi, M., El Hadrami, I., Baily, J.R., Nejmeddine, A., 1999. Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol. *Agrochimica* **XLIII**, 277-287.

Zervakis, G., Yiatras, P., Balis, C., 1996. Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 237-243.

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Berger, R.G., 2003. Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**, 331-336.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ζερβάκης, Ι.Γ., 1998. Εισαγωγή στη Μυκητολογία και στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών.

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

Μιχελάκης, Ν., 2000. Απόβλητα ελαιουργείων-Οικονομική εφικτότητα των μεθόδων διαχείρισης των αποβλήτων, σελίδες 150-157. Ελαιοκομία-αφιέρωμα. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία.

Μπαλατσούρας, Γ.Δ., 1995. Σύγχρονη Ελαιοκομία-Το Ελαιόλαδο. Αθήνα.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

<http://www.nifg.org.uk/species/atlas2.htm?item=NBNSYS0000021409>

http://www.grzyby.pl/gatunki/Trametes_versicolor.htm

http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/aug97.html

<http://www.cbs.knaw.nl/scripts/Aphyllophorales.dll/ShowName?Nr=13669>