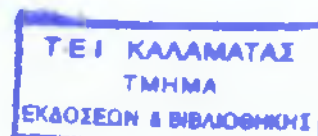


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ
ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΜΕ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ
ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΟΞΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΩΝ
ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ : Τσίγλης Γεώργιος
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κώτσιρας Αναστάσιος

Καλαμάτα 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν σήμερα ένα αναπόφευκτο περιβαλλοντικό επιζήμιο παραπροϊόν του ελαιολάδου, για όλες τις ελαιοπαραγωγικές χώρες. Τα κύρια φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά τους σε συνδυασμό με τις ιδιαίτερα υψηλές τιμές βιολογικής απαίτησης σε οξυγόνο (BOD) και της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο (COD), προσδίδουν σε αυτά ισχυρές φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και επιλογή μικροοργανισμών ικανών να αποδομούν τα ΥΑΕ αποτοξικοποιώντας τα. Για την απομόνωση στελεχών μυκήτων, ικανών να αναπτύσσονται σε ΥΑΕ, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εδάφους, από περιοχή γειτνιάζουσα με ελαιοτριβείο στη θέση Καλάμι του Νομού Μεσσηνίας.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση στελεχών μυκήτων με τη βοήθεια διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων και σε διαφορετικές θερμοκρασίες μυκηλιακής αύξησης. Συνολικά απομονώθηκαν 1506 στελέχη μυκήτων, στα οποία αξιολογήθηκε η μυκηλιακή αύξηση των απομονωθέντων στελεχών μυκήτων σε τριβλία που περιείχαν ως υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, με κύριο κριτήριο την ακτινωτή τους ανάπτυξη. Επίσης, επλέχθησαν στελέχη βάσει της ικανότητας τους τόσο να αποχρωματίζουν τα ΥΑΕ όσο και να σχηματίζουν πυκνό μυκήλιο.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν 46 στελέχη μυκήτων ως προς την ικανότητα τους να αποδομούν ΥΑΕ σε υγρές καλλιέργειες. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις 0, 5, 10, 15 και 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των ΥΑΕ με τα επλεγμένα στελέχη μυκήτων σε θερμοκρασία 25°C. Βάση των αποτελεσμάτων, ένα πλήθος οκτώ στελεχών προκάλεσε αποχρωματισμό στο στερεό υπόστρωμα ΥΑΕ, εντούτοις κατά την ανάπτυξη τους σε υγρές καλλιέργειες αντιστοίχων συγκεντρώσεων δεν παρατηρήθηκε μείωση του χρώματος των ΥΑΕ από κανένα στέλεχος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ορισμένα από τα επλεγμένα στελέχη μυκήτων έχουν την ικανότητα μείωσης της φυτοτοξικότητας, παρότι η ανάπτυξη και η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας ήταν ικανοποιητική.

Μετά από επώαση 28 ημερών παρατηρήθηκε μείωση των ολικών φαινολικών των ΥΑΕ στις καλλιέργειες των στελεχών Σ219, Σ303 και Σ318, τα οποία κατάφεραν να μειώσουν τα ολικά φαινολικά έως και 75% σε σχέση με αυτά του μάρτυρα. Στα συγκεκριμένα στελέχη προσδιορίστηκε ταυτόχρονα και δραστηριότητα των ενζύμων λακκάση ή/και Μπ-υπεροξειδάση.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σύντομο αυτό πρόλογο μου θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Αναστάσιο Κώτσιρα, καθηγητή του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, για την σημαντική του βοήθεια σε όλη την διαδικασία εκπόνησης της πτυχιακής μου μελέτης. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Γεωπόνο Βιοτεχνολόγο κ. Παναγιώτη Κάτσαρη Ειδικό επιστημονικό προσωπικό του (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.) Καλαμάτας για την πολύτιμη βοήθεια την οποία μου προσέφερε κατά την διεξαγωγή του πειράματος αλλά και κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η αποπεράτωση της καθώς επίσης και το προσωπικό του Ινστιτούτου Ελαίας Καλαμάτας.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω επίσης στον κ. Γεώργιο Ζερβάκη, προϊστάμενο του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Καλαμάτας κατά την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων για την διάθεση του εργαστηρίου του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., καθώς και για την βοήθεια που γενικότερα μου προσέφερε στα πλαίσια της διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής.

Τέλος με αφορμή το ότι η πτυχιακή μου μελέτη αυτή σημαίνει το τέλος των σπουδών μου θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στους γονείς μου οι οποίοι με στήριζαν ηθικά αλλά και οικονομικά σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	I
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	II
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	IV
1. Εισαγωγή	1
1.1. Τύποι ελαιουργείων.....	2
1.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων.....	5
1.2.1. Απόβλητα ελαιοτριβείων δύο φάσεων.....	5
1.2.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων τριών φάσεων.....	6
1.3. Ρυπογόνος δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και περιβάλλον.....	9
1.3.1. Αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ.....	10
1.3.2. Φυτοτοξική δράση αποβλήτων ελαιουργείων.....	11
1.4. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	12
1.4.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι.....	13
1.4.1.1. Προσθήκη ηλεκτρολυτών.....	13
1.4.1.2. Αντιδραστήριο Fenton.....	13
1.4.1.3. Προσρόφηση.....	13
1.4.1.4. Εξάτμιση.....	14
1.4.1.5. Επίπλευση.....	14
1.4.1.6. Θερμική συμπύκνωση.....	15
1.4.1.7. Υπερδιήθηση – Αντίστροφη ώσμωση.....	15
1.4.1.8. Ηλεκτρολυτική οξείδωση.....	15
1.4.1.9. Φυγοκέντρωση.....	16
1.4.1.10. Παραγωγή στερεών καυσίμων.....	16
1.4.2. Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου (βιομεθανοποίηση).....	16
1.4.3. Συγκομποστοποίηση.....	17
1.4.4. Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών.....	18
1.4.5. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες.....	19
1.4.6. Βιολογικές επεξεργασίες-αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών.....	20
1.4.6.1. Βακτήρια.....	20
1.4.6.2. Μύκητες – Ζύμες.....	21

1.5. Επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους.....	27
1.6. Δράση ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών των ΥΑΕ.....	29
1.6.1. Δράση του ενζύμου λακκάση.....	29
1.6.2. Δράση των υπεροξειδάσεων (Μπ-υπεροξειδάση και λιγνίνη υπεροξειδάση)...	32
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1. Εισαγωγή.....	35
2.2. Δειγματοληψία.....	35
2.3. Θρεπτικά υποστρώματα.....	35
2.3.1. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA).....	36
2.3.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	36
2.3.3. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Czapek Dox.....	37
2.3.4. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος από εκχύλισμα εδάφους (Soil Extract Agar - SEA).....	37
2.3.5. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Carboxymethyl Cellulose, CMC.....	37
2.3.6. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Soil Basidiomycete Isolation Medium, BSS2.....	38
2.4. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	39
2.5. Εκτίμηση πληθυσμού - Απομόνωση Στελεχών Μυκήτων.....	40
2.6. Αποθήκευση στελεχών μυκήτων.....	41
2.7. Μελέτη της ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών μυκήτων.....	41
2.7.1. Προσδιορισμός της μυκηλιακής ανάπτυξης.....	41
2.8. Σχεδιασμός πειράματος αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με επιλεγμένα στελέχη μυκήτων απομονωμένα από έδαφος-αποδέκτη ΥΑΕ.....	43
2.8.1. Διαδικασία.....	43
2.8.1.1. Διαδικασία παραλαβής επεξεργασμένου δείγματος υγρών αποβλήτων.....	44
2.8.1.2. Μέτρηση αποχρωματισμού.....	44
2.8.1.3. Προσδιορισμός δείκτη Βλαστικότητας.....	44
2.8.1.4. Μέτρηση βιομάζας.....	45
2.8.1.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	46
2.8.1.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση.....	46

2.8.1.7. Μελέτη της παρεμβολής του επεξεργασμένου υγρού αποβλήτου στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένης ή μη του Mn).....	46
2.8.1.8. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn).....	47
2.8.1.9. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση.....	47
2.8.1.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.....	48
2.8.1.11. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση.....	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3.1. Γενικά.....	49
3.2. Απαρίθμηση στελεχών μυκήτων σε διάφορα στερεά θρεπτικά υποστρώματα και διάφορες θερμοκρασίες επώασης.....	49
3.3. Απομόνωση στελεχών μυκήτων.....	51
3.4. Μορφολογία μυκηλίου των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.....	53
3.5. Αξιολόγηση επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε υγρές καλλιέργειες.....	57
3.5.1. Προσδιορισμός χρώματος ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων.....	57
3.5.2. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας σε επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που αναπτύσσονται σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.....	60
3.5.3. Προσδιορισμός μυκηλιακής βιομάζας επιλεγμένων στελεχών μυκήτων που αναπτύσσονται σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.....	63
3.5.4. Μέτρηση φαινολικών συστατικών κατά την ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.....	64
3.5.5. Προσδιορισμός της δράσεως ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση φαινολικών και άλλων συστατικών των ΥΑΕ.....	67
3.5.5.1. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου λακκάση σε υποστρώματα ΥΑΕ στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων.....	67
3.5.5.2. Προσδιορισμός της δράσης των ενζύμων υπεροξειδάση εξαρτωμένη και μη του Mn σε υποστρώματα ΥΑΕ στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων.....	68
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΥΑΕ: Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων

OMW: Olive Mill Wastewater

ΒΟD: Biological Oxygen Demand-Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο

COD: Chemical Oxygen Demand-Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

TOC: Total Organic Carbon-Ολικός οργανικός άνθρακας

HBT: 1-hydroxybenzotriazol - 1-ύδροξυ-βένζο-τριαζόλη

LiP: Υπεροξειδάση της λιγνίνης

MnP: Υπεροξειδάση εξαρτώμενη του μαγγανίου

PDA: Potato Dextrose Agar

SEA: Soil Extract Agar

CMC: Carboxymethyl Cellulose

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

DMAB: 3 – dimethylaminobenzoic acid

MBTH: 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride

CFU: colony forming unit

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελιά (*Olea europaea* L.) συγκαταλέγεται μεταξύ των αρχαιότερων καλλιεργούμενων δένδρων στον κόσμο. Στη λεκάνη της Μεσογείου παράγεται το 98% των ελαιοκομικών προϊόντων, περίπου 2,5 εκατομμύρια τόνοι το χρόνο. Η Ελλάδα καταλαμβάνει, σε παγκόσμια κλίμακα, την τρίτη θέση στην παραγωγή ελαιολάδου, μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Ο συνολικός αριθμός των ελαιοδένδρων είναι περίπου 130.000.000 από τα οποία 112.000.000 αποτελούν συμπαγείς ελαιώνες, που παράγουν, σε ετήσια βάση, γύρω στους 350.000 τόνους ελαιολάδου (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης, 2000).

Στην Ελλάδα λειτουργούν περίπου 3000 ελαιουργεία και με δεδομένη την αυξομείωση που παρουσιάζει η ελαιοπαραγωγή από χρονιά σε χρονιά, υπολογίζεται ότι παράγονται κατά μέσο όρο 1.500.000 τόνοι υγρών αποβλήτων (λιόζουμο, κασίγαρος) και 400.000 τόνοι στερεών υπολειμμάτων-παραπροϊόντων ετησίως (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 1999, 2000). Σχεδόν ο συνολικός όγκος των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων (ΥΑΕ) ρίπτεται χωρίς να έχει υποστεί καμία επεξεργασία σε φυσικά και γεωργικά οικοσυστήματα και συγκεκριμένα σε χείμαρρους (58%) στο έδαφος (20%), στα ποτάμια και στη θάλασσα (12%) (Νταλής 1988).

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων (ΥΑΕ), προέρχονται από τους φυτικούς χυμούς του ελαιοκάρπου που απελευθερώνονται κατά τις φάσεις πλύσης, μάλαξης και διαχωρισμού του, καθώς και από το ζεστό ή κρύο νερό που προστίθεται κατά την παραγωγική διαδικασία. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους είναι:

Το σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα τους, η χαρακτηριστική οσμή, το όξινο pH, η υψηλή επιφανειακή τάση και ρυθμιστική ικανότητα, οι μεγάλες ποσότητες αιωρούμενων σωματιδίων που περιέχουν καθώς και η πλούσια σύστασή τους σε οργανικές ουσίες κυρίως σε φαινολικές ενώσεις (Balice & Cera 1984).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τον τεράστιο όγκο παραγωγής τους με εξαιρετικά άνιση ετήσια κατανομή (τρεις-τέσσερις χειμερινούς μήνες) και με τις αυξημένες τιμές βιολογικής και χημικής απαίτησης σε οξυγόνο αποδίδουν στα ΥΑΕ ένα υψηλό ρυπαντικό δυναμικό (Moreno *et al.* 1987) και επιβάλλουν την ανάπτυξη και εφαρμογή αυστηρών μέτρων διαχείρισης και επεξεργασίας τους.

Για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που συνδέονται με τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων και τον αποδοτικότερο και οικονομικότερο τρόπο διαχείρισής τους έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν μια σειρά διαφορετικών προσεγγίσεων.

1.1. Τύποι ελαιουργείων

Η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο διαμέσου των αιώνων πραγματοποιείται με τον κλασικό-παραδοσιακό τύπο ελαιοτριβείου (υδραυλικά πιεστήρια). Η ανάγκη όμως αύξησης της δυναμικότητας των ελαιουργικών συγκροτημάτων, της μείωσης του κόστους παραγωγής του ελαιολάδου οδήγησαν στην κατασκευή εξελιγμένων τύπων ελαιοτριβείων, των οποίων η λειτουργία βασίζεται στη χρήση μεικτών και φυγοκεντρικών συστημάτων. Τα πρώτα στάδια της μεθόδου εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, δηλαδή το σπάσιμο του καρπού και η μάλαξη της ελαιοζύμης, είναι ίδια και στους τρεις τύπους ελαιοτριβείων. Η διαφορά τους έγκειται στο στάδιο διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη.

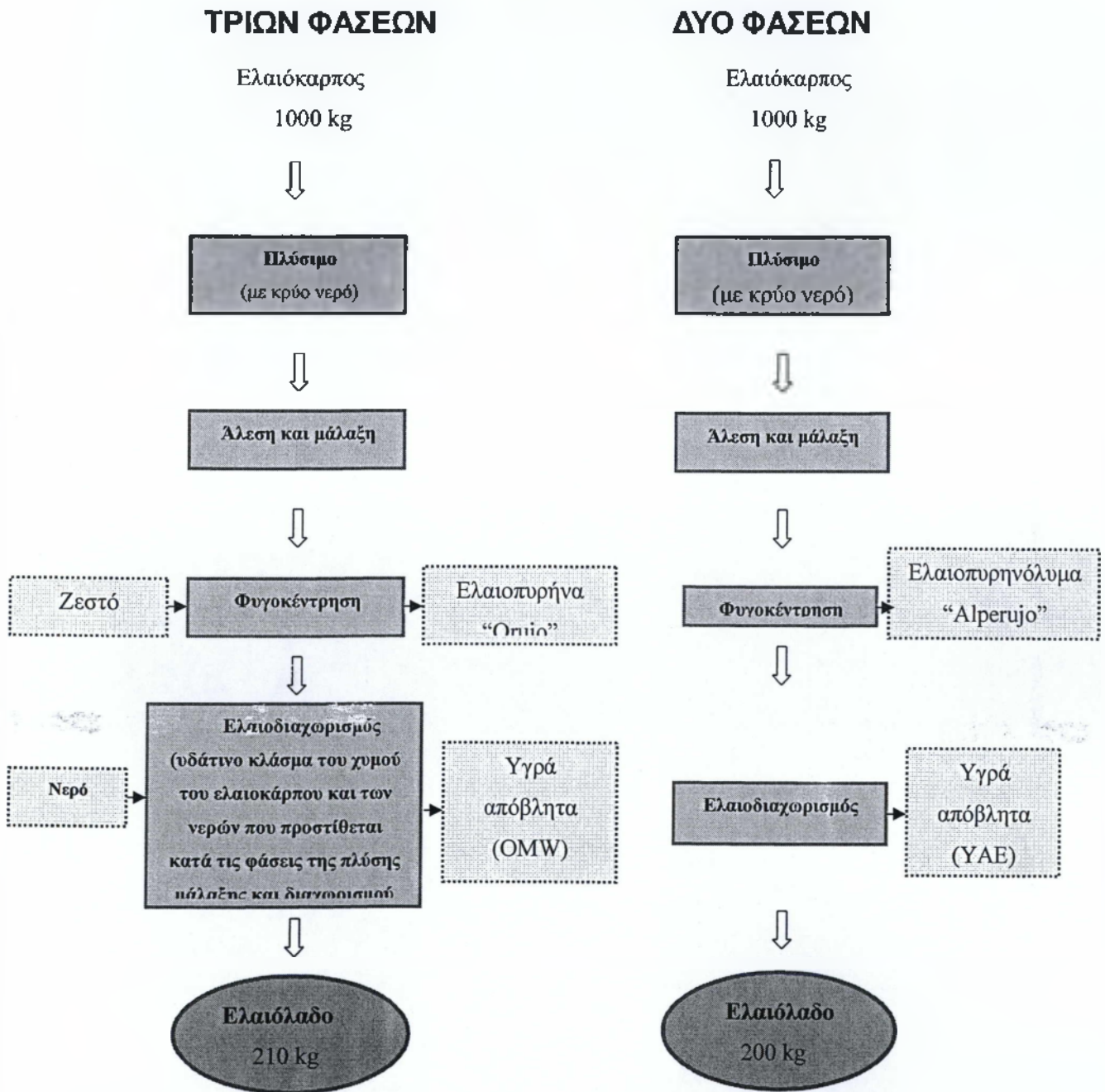
- Στα κλασικά-παραδοσιακά ελαιοτριβεία με την εφαρμογή υδραυλικής πίεσης, που ασκείται στην ελαιοζύμη, παραλαμβάνεται γαλακτώμα ελαίου και νερού (χυμώδης φάση) και ελαιοπυρήνας (ή πυρήνας ή λιοκόκκια) που αποτελείται από το αλεσμένο ενδοκάρπιο και άλλα στερεά υπολείμματα του ελαιοκάρπου όπως το εξωκάρπιο και το σαρκώδες μεσοκάρπιο (Κυριτσάκης 1989). Ο τελικός διαχωρισμός του γαλακτώματος ελαίου και νερού γίνεται με την εφαρμογή πιέσεως σε κάθετο διαχωριστήρα (Hamdi 1992).
- Στα μεικτού τύπου ελαιοτριβεία ο διαχωρισμός του ελαιολάδου επιτυγχάνεται αρχικά με την διαδικασία της αποστάλαξης, η οποία βασίζεται στη διαφορά της επιφανειακής τάσης (διαφορετική συνάφεια - *Sinolea*) μεταξύ φυτικών υγρών και ελαίου και στο ειδικό βάρος αυτών (φυγοκέντριση-decanter). Κατά τη μέθοδο κατεργασίας του ελαιοκάρπου, η ελαιοζύμη, μετά τη μάλαξη, οδηγείται στους ελαιοδιαχωριστήρες, που είναι κατασκευασμένοι από χαλύβδινα πλακίδια, και απαλλάσσεται από τις μεγαλύτερες ποσότητες του ελαιολάδου, που περιέχει, με τη μορφή πολύ μικρών ελαιοσταγονιδίων σε αντίθεση με τα φυτικά υγρά τα οποία σχηματίζουν μεγάλα σταγονίδια και απομακρύνονται (Μπαλατσούρας 1986). Συγκεκριμένα η ποσότητα του λαδιού, που συγκεντρώνεται σε αυτό το στάδιο επεξεργασίας, φθάνει το 70-80% εξαιτίας της μεγαλύτερης συνάφειάς του με το χάλυβα. Η εξαγωγή του ελαιολάδου, που παραμένει στην ελαιοζύμη, καθίσταται δυνατή με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, προκειμένου να παραληφθεί το καθαρό ελαιόλαδο (Κυριτσάκης 1989).

Η πρόοδος των μεθόδων παραγωγής του ελαιολάδου, η οποία έχει συντελεσθεί από το ξεκίνημά τους, είναι σημαντική δεδομένου ότι από το 1970 και μετά έγινε σε μεγάλο ποσοστό η αντικατάσταση των παραδοσιακών συστημάτων ασυνεχούς λειτουργίας από τα φυγοκεντρικά ελαιουργεία τριών φάσεων (three-phase centrifugation system). Βασικό στοιχείο, στο οποίο στηρίζεται η λειτουργία τους, είναι η διαφορά του ειδικού βάρους των συστατικών της ελαιοζύμης

(ελαιολάδου, υγρών και στερεών συστατικών). Στα συστήματα αυτά, μετά τη μάλαξη της ελαιοζύμης, πραγματοποιείται φυγοκέντριση δύο σταδίων. Μετά την αραίωση της ελαιοζύμης με ζεστό νερό και τη διοχέτευσή της σε ένα φυγοκεντρική οριζόντιας διάταξης, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τον ελαιοπυρήνα και το νερό, ακολουθεί η δεύτερη φυγοκέντριση για την εξαγωγή του καθαρού ελαιολάδου (Bojja *et al.* 1995). Η ποσότητα του νερού, που χρησιμοποιείται στα δύο στάδια διαχωρισμού του ελαιολάδου (decanter), έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Στην προσπάθειά μείωσης των ποσοτήτων των αποβλήτων αυτών, των οποίων η διάθεση έχει πολύ σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, εισήχθη, στις αρχές της δεκαετίας του ενενήντα, ένα νέο σύστημα διαχωρισμού του ελαιολάδου, το φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων (two-phase centrifugation system). Σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως στην Ισπανία και λιγότερο στην Ιταλία και στην Ελλάδα (Jones *et al.* 2000).

Έτσι από τις τρεις φάσεις των αρχικών φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων που είναι το ελαιόλαδο, ο ελαιοπυρήνας και τα υγρά απόβλητα, με τα διφασικά ελαιοτριβεία προκύπτει ο διαχωρισμός της ελαιοζύμης σε δυο φάσεις, το ελαιόλαδο (υγρή φάση) και το ελαιοπυρηνόλυμα (ημιστερεή) στο οποίο έχουν ενσωματωθεί ο ελαιοπυρήνας και τα φυτικά υγρά του καρπού. Χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η χρησιμοποίηση μικρότερων ποσοτήτων νερού για την αραίωση της ελαιοζύμης. Το νερό χρησιμοποιείται μόνο στον ελαιοδιαχωριστήρα και όχι κατά τη μάλαξη της ελαιοζύμης. Έτσι τελικά χρησιμοποιείται μέχρι 75-90% λιγότερο νερό, κάτι που έχει ως συνέπεια την παραγωγή συγκριτικά μικρότερων ποσοτήτων ελαιοπυρηνολύματος (αποβλήτων). Αναλυτικά ο τρόπος λειτουργίας των δυο φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων συστημάτων και η σύγκριση αυτών παρουσιάζεται στο Γράφημα 1 (Alburquerque *et al.* 2003).

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟ



Γράφημα 1: Σύγκριση διαδικασίας εξαγωγής ελαιολάδου σε φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών και δύο φάσεων (Alburquerque *et al.*, 2003).

1.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων

1.2.1. Απόβλητα ελαιοτριβείων δύο φάσεων

Αξίζει να σημειωθεί ότι και στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει στα ελαιουργεία η εγκατάσταση διφασικών διαχωριστών (ελαιοτριβεία δύο φάσεων), καθώς εκτιμάται ότι η υιοθέτηση τους θα αποτελέσει μια καλή λύση για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων, λόγω της μείωση του όγκου των αποβλήτων που παράγονται. Σε αντίθεση όμως με τη διαδεδομένη άποψη, τα ημίρρευστα αυτά απόβλητα μπορεί να είναι μικρότερα σε όγκο, εντούτοις δεν εμφανίζουν μείωση του ρυπαντικού φορτίου αλλά παρουσιάζουν αύξηση της συγκέντρωσης των τοξικών συστατικών τους ανά μονάδα όγκου.

Η κύρια σύσταση του αποβλήτου του διφασικού ελαιοτριβείου (ελαιοπυρηνόλυμα, «alpeorujo») είναι σχεδόν ίδια με τη σύσταση των ΥΑΕ, έχει pH όξινο και περιέχει λίπη, σάκχαρα, πηκτίνες, ταννίνες, κυτταρίνες, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, υδρογονάνθρακες και πολυφαινολικές ουσίες, οι οποίες λόγω της μεγάλης συγκέντρωσής τους καθιστούν το ελαιοπυρηνόλυμα έντονα φυτοτοξικό και με μεγάλη αντιμικροβιακή δράση (Albuquerque *et al.* 2003, Ntougias *et al.* 2006). Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ελαιοπυρηνόλυμα έχει πολύ υψηλή υγρασία (55-70%), ενώ αντίστοιχα τα στερεά απόβλητα των κλασικών ελαιοτριβείων έχουν υγρασία 20-25% και τα τριών φάσεων 40-45% (Alba *et al.* 1990). Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει την επεξεργασία του στα υφιστάμενα πυρηνελουργεία με τρόπο τεχνολογικά και οικονομικά αποτελεσματικό.

Στην Ισπανία έχουν σχεδιαστεί πρότυπες μονάδες επεξεργασίας του ελαιοπυρηνολύματος, όπου με φυγοκέντρησή του σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αφαιρεθεί υψηλό ποσοστό της υγρασίας και στη συνέχεια με χημική κατεργασία με εξάνιο γίνεται η συλλογή της ποσότητας του λαδιού που περιέχει, του πυρηνόξυλου και ενός ημιστερεού απόβλητου. Το ημιστερεό αυτό απόβλητο είναι δυνατό να αξιοποιηθεί υπό προϋποθέσεις ως καύσιμη ύλη για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (ο συγκεκριμένος τρόπος διαχείρισης έχει εφαρμοστεί στην Ισπανία σε πιλοτική κλίμακα). Επίσης διεξάγονται έρευνες διεθνώς για να ανακαλυφθούν τρόποι αξιοποίησης των αποβλήτων αυτών κυρίως με τη βιομετατροπή τους σε οργανικό εδαφοβελτιωτικό υλικό μέσω της θερμοφίλης αερόβιας ζυμώσεως (Jones *et al.* 2000).

1.2.2. Απόβλητα ελαιοτριβείων τριών φάσεων

Τα υγρά απόβλητα (ΥΑΕ) παράγονται κυρίως από τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και είναι γνωστότερα ως «λιόζουμα» ή «κατσιγάρος», ενώ στη ξένη βιβλιογραφία αναφέρονται ως Olive Mill Wastewater, OMW και προέρχονται από το υδάτινο κλάσμα των χυμών του ελαιοκάρπου και του νερού πλύσης, μάλαξης και διαχωρισμού του ελαιοκάρπου. Η σύνθεση του κατσιγαρού εξαρτάται κυρίως από τη μέθοδο παραλαβής του ελαιοκάρπου (Bořja *et al.* 1993), αλλά επηρεάζεται και από την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές συνθήκες, το στάδιο ωρίμανσης, την κατάσταση θρέψης, την προσβολή από εχθρούς και παθογόνα, από το σύστημα συλλογής και το χρόνο αναμονής του καρπού στο ελαιοτριβείο (Μπαλής και άλλοι 1991). Επιπλέον, τα κύρια φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του ποικίλλουν από ελαιοτριβείο σε ελαιοτριβείο (Bonari 1993).

Ο κατσιγάρος είναι ένα υγρό με σκούρο, θολό χρώμα, όξινο και με χαρακτηριστική οσμή στην οποία συμβάλλουν τα πτητικά οξέα που περιέχει (Moreno *et al.* 1987). Η τιμή του pH κυμαίνεται από 4 έως 6 (όξινο), παρουσιάζει υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και επιφανειακή τάση, περιέχει λεπτά οργανικά τεμαχίδια υπό μορφή αιωρήματος και είναι πλούσιο σε οργανικές ουσίες (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 1999, 2000). Σε γενικές γραμμές, η περιεκτικότητα σε νερό κυμαίνεται μεταξύ 83% και 94%, σε οργανικές ενώσεις μεταξύ 4% και 16% και σε ανόργανα άλατα μεταξύ 0,4% και 2,5% (Cabrega *et al.* 1997). Το σύνολο των συστατικών του οργανικού κλάσματος των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων μπορεί να διακριθεί σε τρεις γενικές κατηγορίες:

- Σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες (σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα).
- Βιοαποδομήσιμα πολυμερή (πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες)
- Δυσκόλως βιοαποδομήσιμα συστατικά (πολυφαινολικές ενώσεις, ταννίνες, πηκτίνες, λιπαρές ουσίες) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Γενικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)	ΚΥΡΙΕΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Νερό (%)	83-92		Varquez <i>et al.</i> 1976, Codounis <i>et al.</i> 1983, Niaounakis & Halvadakis 2006
Σάκχαρα (%)	2.0-8.0	γλυκόζη, μαλτόζη, ραφινόζη, ραμνόζη, σακχαρόζη, κ.α.	
Οργανικά οξέα (%)	0.5-1.5	γαλακτικό, γλυκερινικό, κιτρικό, μηλικό, οξαλικό, οξικό, τρυγικό, φουμαρικό	
Πηκτίνες, ταννίνες (%)	0.4-1.5		
Πολυαλκοόλες (%)	0.5-1,5	γλυκερόλη	
Πολυφαινόλες (g l ⁻¹)	3-24	Φλαβονοειδή : απεγίννη, κερσετίνη, λουτεολίνη, ρουτίνη Φαινόλες : βανιλικό, 2,6-διυδροξυβενζοϊκό, βερατρικό, καφεϊκό, κουμαρικό, κινναμικό, πυροκατεχικό, πρωτοκατεχικό, <i>p</i> -υδροξυβενζοϊκό, συριγγικό, 3,4,5-τριμεθοξυβενζοϊκό, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, φερουλικό, ελαιοευρωπαϊνή, κ.α.	Fiestas 1986, Martinez <i>et al.</i> 1986, Varquez <i>et al.</i> 1976, Codounis <i>et al.</i> 1983, Niaounakis & Halvadakis 2006
Λίπη (g l ⁻¹)	0.3-23	Υπολείμματα ελαίου	Fiestas 1986, Martinez <i>et al.</i> 1986, Niaounakis & Halvadakis 2006.
Αλατα	5-15	N (g l ⁻¹)	
	0.3-1.1	P (g l ⁻¹)	
	2.7-7.2	K (g l ⁻¹)	
	0.12-0.75	Ca (g l ⁻¹)	
	0.10-0.40	Mg (g l ⁻¹)	
	0.04-0.90	Na (g l ⁻¹)	
Ηλ. Αγωγιμότητα (dS m ⁻¹)	8-22		
PH	4-6		
BOD ₅ (g l ⁻¹)	35-100		
COD (g l ⁻¹)	40-195		
Στερεά ολικά (%)	5.5-17.6		

Τα μη φαινολικά οργανικά οξέα που αναφέρονται να εμπλέκονται στη μεγάλη τοξικότητα των ΥΑΕ (γαλακτικό, γλυκερινικό, κιτρικό, μηλικό, οξαλικό, οξικό, τρυγικό, φουμαρικό) αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του οργανικού κλάσματος των αποβλήτων, ίσο με το 1.5% του βάρους του (Varquez *et al.* 1976, Codounis *et al.* 1983).

Το πιο σημαντικό μέρος του οργανικού κλάσματος από ποσοτικής απόψεως, καταλαμβάνουν τα σάκχαρα, ενώ οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες, μολονότι υποδεέστερες ποσοτικά, από ποιοτικής απόψεως είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, διότι σε αυτά οφείλονται οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτικά προϊόντα και περιλαμβάνουν, απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, φαινολο-αλκοόλες και φλαβονοειδή (Niaounakis & Halvadakis 2006).

Το κλάσμα των φαινολών παρουσιάζει ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον διότι: περιορίζει το φάσμα και τη δράση των μικροοργανισμών εκείνων που θα μπορούσαν να εγκατασταθούν και να αποδομήσουν τα άλλα συστατικά, προσδίδει στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι φυτών και ευαίσθητων ζωικών οργανισμών και βιοαποδομείται με βραδύ σχετικά ρυθμό από εξειδικευμένες, αλλά σχετικά ολιγάριθμες ομάδες οργανισμών (Perez *et al.* 1986, Yesilada *et al.* 1998, Gonzalez *et al.* 1990).

Στον Πίνακα 1, αναφέρονται τα πλέον χαρακτηριστικά από τα φαινολικά συστατικά που έχουν ανιχνευθεί στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Σ' αυτά προστίθενται και πολυμερείς ουσίες καστανόμαυρου χρώματος που σχηματίζονται δευτερογενώς μέσω ενζυμικών αντιδράσεων που αρχίζουν αμέσως από την έκθλιψη του ελαιοκάρπου (Saiz-Jimenez *et al.* 1986).

Επιπλέον τα ΥΑΕ εμφανίζουν υψηλό οργανικό φορτίο, όπως δείχνουν οι μετρήσεις των τιμών σε BOD (Biological Oxygen Demand-Βιολογική απαίτηση σε οξυγόνο), COD (Chemical Oxygen Demand-Χημική απαίτηση σε οξυγόνο) και TOC (Total Organic Carbon-Ολικός οργανικός άνθρακας), το οποίο συμβάλει σημαντικά στην ρυπογόνο τους ισχύ (Πίνακας 1).

Επίσης πρέπει να αναφερθεί πως και τα ανόργανα στοιχεία που περιέχονται στο κλάσμα των ΥΑΕ (δηλ. άλατα καλίου, φωσφόρου, νατρίου, μαγνησίου κ.λ.π.), παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως λιπαντικά στοιχεία και αναφέρονται ποσοτικά και αναλυτικά στον Πίνακα 1. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του καλίου είναι πολύ μεγαλύτερη από το άθροισμα των συγκεντρώσεων όλων των άλλων ανόργανων στοιχείων (Fiestas 1986, Martinez *et al.* 1986).

Οι ταννίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα υδατοδιαλυτών φυτικών πολυφαινολών που έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις με πρωτεΐνες και πηκτίνες με τέτοιο τρόπο ώστε να τις μετατρέπουν σε ανθεκτικές στην βιοαποδόμηση (Balice *et al.* 1988).

1.3. Ρυπογόνος δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων συγκαταλέγονται στα βεβαρημένα από άποψη ρυπαντικού φορτίου απόβλητα. Ανάλογα με τις τεχνικές έκθλιψης του ελαιοκάρπου, 0.5-0.8 m³ ΥΑΕ διατίθενται στο περιβάλλον ανά τόνο παραγόμενου ελαιολάδου για τα φυγοκεντρικού τύπου ελαιοτριβεία (Τσιουπλάς *et al.* 2002). Η συνήθη, αν και επιλήψιμη πρακτική, είναι η απόρριψη τους σε πλησίον των ελαιοτριβείων υδάτινους και χερσαίους αποδέκτες, όπως ποτάμια, χείμαρρους και έδαφος.

Η ρυπογόνος και φυτοτοξική δράση τους από έρευνες που έχουν γίνει αποδείχθηκε ότι οφείλεται στις φαινολικές ουσίες και στα λιπαρά οξέα που περιέχουν παρεμποδίζοντας τη σωστή ανάπτυξη ορισμένων φυτών επιδρώντας αρνητικά στη φυσιολογία τους, ενώ ο σχηματισμός ελαιώδους κρούστας στην επιφάνεια του νερού, παρεμποδίζει τη διάλυση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου στο νερό (Chtourou *et al.* 2004).

Όπως προαναφέρθηκε, στη ρυπογόνο δράση των ΥΑΕ συμβάλουν και οι υψηλές τιμές τους σε BOD και COD (Fiestas 1986, Martinez *et al.* 1986). Το BOD (Biological Oxygen Demand-Βιολογική απαίτηση σε οξυγόνο) είναι μια παράμετρος υπολογισμού της οργανικής ρύπανσης και εκφράζει την ποσότητα του βάρους του διαλυμένου οξυγόνου που χρειάζονται για να διασπαστούν από μικροοργανισμούς του εδάφους οι βιοαποδομήσιμες ουσίες που περιέχονται σε συγκεκριμένο όγκο δείγματος. Η τιμή του για τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων κυμαίνεται περίπου στα 100 Kg/m³ (Bořja *et al.* 1994). Το COD (Chemical Oxygen Demand) είναι μια άλλη παράμετρος η μέτρηση της οποίας είναι απαραίτητη λόγω του δεδομένου ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ είναι μη βιοαποδομήσιμο (Korsidas 1992). Συγκεκριμένα το COD μετρά το οξυγόνο που απαιτείται για να οξειδωθεί από ένα ισχυρό οξειδωτικό η οργανική ύλη που περιέχεται στο δείγμα. Η τιμή του COD για τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων είναι περίπου 220 Kg/m³ (Bořja *et al.* 1994).

Έτσι λοιπόν η απόρριψη ανεπεξέργαστων ελαιόζουμων σε υδάτινους αποδέκτες δημιουργεί καταστροφικές συνθήκες διαβίωσης για τους περισσότερους οργανισμούς λόγω έλλειψης οξυγόνου. Η διαφορά τιμών μεταξύ του βιολογικά και χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD και COD) φανερώνει πόσο δύσκολα γίνεται η αποδόμηση έστω μέρους του οργανικού φορτίου των λιόζουμων κατά την διοχέτευση τους στο φυσικό περιβάλλον. Στα θετικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων αναφέρονται η απουσία συνθετικών οργανικών ενώσεων υψηλού περιβαλλοντικού κινδύνου, βαρέων μετάλλων, αμιάντου ή άλλων μη βιοαποδομήσιμων συνθετικών οργανικών ενώσεων.

Γενικότερα οι πιθανές αρνητικές επιδράσεις των ΥΑΕ στο περιβάλλον σχετίζονται με:

Την εκδήλωση έντονων φυτοτοξικών φαινομένων στη βλάστηση των φυτών, λόγω των πτητικών λιπαρών οξέων και φαινολών που περιέχουν, με καταστροφή ή μείωση της έκτασης οποιασδήποτε αγροτικής καλλιέργειας

Εκδήλωση τοξικών φαινομένων στην υδρόβια πανίδα και χλωρίδα λόγω των υψηλών τιμών BOD και COD

Ρύπανση επίγειων και υπόγειων υδάτινων όγκων και θαλασσών, λόγω της παρεμπόδισης οξυγόνωσης των υδάτινων αυτών αποδεκτών εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας τους σε λιπαρές ουσίες

Αισθητική και ποιοτική υποβάθμιση των επιφανειακών νερών και θαλασσών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε χρωστικές ουσίες

Ενοχλήσεις των κατοίκων σε αστικές περιοχές λόγω της έντονης δυσσομίας που εκλύουν (Niaounakis & Halvadakis 2006).

1.3.1. Αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ

Η τοξικότητα και η υψηλή αντιβακτηριακή δραστηριότητα των υγρών απόβλητων των ελαιοτριβείων καθώς και το έντονο σκούρο χρώμα του αποδίδονται στη συνεργιστική δράση διαφόρων φαινολικών και μη ουσιών (Moreno *et al.* 1990, Capasso *et al.* 1992). Οι φαινολικές ουσίες με χαμηλό μοριακό βάρος ευθύνονται για τις δύο πρώτες ιδιότητες των ΥΑΕ, ενώ αυτές με μεγαλύτερο μοριακό βάρος προκαλούν συνήθως το σκούρο χρώμα του.

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκε κατά το παρελθόν ως δείκτης το βακτήριο *Bacillus megaterium* ATCC 33085, εξαιτίας της αυξημένης ευαισθησίας που παρουσιάζουν τα σποριογόνα βακτήρια του εδάφους απέναντι στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Σε μελέτη των Gonzalez *et al.* (1990) ερευνήθηκε η παρεμποδιστική δράση των ΥΑΕ και διαφόρων μεμονωμένων φαινολικών συστατικών κατά της ανάπτυξης μικροοργανισμών, όπως είναι το βακτήριο *Bacillus megaterium*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιοτοξικότητας των ΥΑΕ. Στην ίδια μελέτη επισημαίνεται ότι οι φαινολικές ουσίες δεν αποτελούν από μόνες τους ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus megaterium*, αλλά σε συνδυασμό με την ύπαρξη λιπαρών οξέων κυρίως (λινολενικό, λαυρικό, λινελαϊκό και μυριστικό) και ενός μικρού ποσοστού γαλακτωματοποιημένου ελαίου (περίπου 0.5%).

Σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι αρκετές φαινολικές ουσίες παρουσίασαν βακτηριοστατική δράση παρεμποδίζοντας έτσι τη σποριογένεση στην περίπτωση του βακτηρίου *Bacillus megaterium* (Rodriguez *et al.* 1988).

Οι Ragazzi & Veroneze (1967) θεώρησαν σαν υπεύθυνες ουσίες της αντιμικροβιακής δράσης την κατεχόλη και τα οξέα καφεικό και προκατεχικό μαζί με τις αλκοόλες β-αιθυλο-υδροξυφαινόλη και 3,4-αιθυλο-διυδροξυφαινόλη έναντι των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*.

Η ύπαρξη της ελευρωπαϊνης και των προϊόντων υδρόλυσης αυτής (τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη) σχετίζονται επίσης με την αντιμικροβιακή δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Fleming *et al.* 1973).

1.3.2. Φυτοτοξική δράση αποβλήτων ελαιοτριβείων

Η φυτοτοξική δράση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων είναι γενικά αποδεκτό μετά από πολυάριθμες μελέτες ότι δεν είναι εξειδικευμένη έναντι ορισμένων φυτών αλλά γενική και οφείλεται στην ύπαρξη φαινολικών ενώσεων, πτητικών οξέων και πολυαλκοόλων μικρού μοριακού βάρους καθώς και στην υψηλή αλατότητα και στο υψηλό οργανικό τους φορτίο (Aggelis *et al.* 2003, Casa *et al.* 2003). Η ανεξέλεγκτη απόρριψη τους σε καλλιεργούμενες εκτάσεις εκφράζεται με φυτρωτική ανάσχεση των σπερμάτων των φυτών και νέκρωση των φυτών με επιφανειακό ριζικό σύστημα.

Η άρδευση με ελαιόζουμα προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών, οι οποίες συνδέονται με το όξινο pH των λιόζουμων, την υψηλή τους συγκέντρωση σε άλατα και τις ανταγωνιστικές επιδράσεις ορισμένων ανόργανων αλάτων ή την τοξικότητα ορισμένων ιόντων που περιέχουν (Paredes *et al.* 1999).

Οι De Dios Perez *et al.* (1986) μετά από μελέτες αναφέρουν ότι τα φρέσκα απόβλητα χωρίς καμία επεξεργασία παρουσίασαν μεγαλύτερη φυτοτοξική δράση σε σχέση με επεξεργασμένα απόβλητα ή απόβλητα ελαιοτριβείων αποθηκευμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα φυτά που παρουσίασαν την μεγαλύτερη ευαισθησία και στους τρεις τύπους αποβλήτων είναι η τομάτα (*Solanum lycopersicum* L.) και η σίκαλη (*Lolium perenne* L.). Αντιθέτως, κατά την εφαρμογή ΥΑΕ σε καλλιέργειες κριθαριού (*Hordeum vulgare* L.) και φασολιού (*Phaseolus vulgare* L.) προκαλεί σχεδόν μηδαμινή ανάσχεση.

Σε άλλη μελέτη (Carpasso *et al.* 1992) αναφέρεται ότι κατά την εφαρμογή των ΥΑΕ σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.) και κολοκυθιάς (*Curcubita pepo* L.), παρατηρήθηκε σημαντική φυτοτοξική δράση, παρότι είχε προηγηθεί απομάκρυνση των πολυφαινολικών τους συστατικών.

Επίσης οι Flouri *et al.* (1990) αναφέρουν έντονη φυτοτοξική δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στη βλάστηση των σπόρων φυτών μαρουλιού (*Lettuce romana* L.) και κάρδαμου (*Lepidium sativum* L.) ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Ο Fiestas Ros de Ursimos (1986) κατόπιν μελετών σημειώνει ότι οι θετικές ή αρνητικές επιδράσεις των ΥΑΕ εξαρτώνται από τη δοσολογία εφαρμογής τους και το χρόνο που μεσολαβεί μέχρι τη σοδιά. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Bonari *et al.* (1993) μετά από τριετή πειραματισμό της φυτοτοξικής δράσης των αποβλήτων σε καλλιέργειες αγρωσταδών φυτών. Μετά από τη μεσολάβηση 60 ημερών από τη φύτευσή τους, υπό συνεχή άρδευση με ΥΑΕ, δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιπτώσεις στη βλαστικότητα και στην πρώιμη ανάπτυξη των φυτών, εφόσον κατά τον χειρισμό η ποσότητα των ΥΑΕ δεν ξεπέρασε τα 8 m³ ανά στρέμμα. Ταυτόχρονα δηλώνουν ότι η εφαρμογή αποβλήτων ελαιοτριβείων στο έδαφος μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην γονιμότητα του εδάφους (Piotrowska *et al.* 2006).

1.4. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Το πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος από την απόρριψη των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ερευνάται ήδη από την δεκαετία του '50 (Fiestas Ros de Ursinos 1953). Διάφορα πειράματα και μεθοδολογίες έχουν εφαρμοστεί στην προσπάθεια εξεύρεσης μιας ασφαλούς και αποτελεσματικής λύσης για τη διαχείριση των αποβλήτων των ελαιουργείων, χωρίς όμως να έχουν βρεθεί λύσεις ευρείας αποδοχής.

Κατά καιρούς έχουν δοκιμασθεί διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας όπως συνοψίζεται από τους Οιχαλιώτη & Ζερβάκη (1999, 2000):

- α. Φυσικοχημικές μέθοδοι
- β. Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου (βιομεθανοποίηση)
- γ. Συγκομποστοποίηση
- δ. Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών
- ε. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες
- στ. Βιολογικές επεξεργασίες-αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών
- ζ. Περιορισμός του χρησιμοποιούμενου νερού με τη χρήση ελαιοτριβείων δύο φάσεων.

1.4.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι

Διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν κυρίως πειραματικά στο παρελθόν προσπάθησαν να δώσουν λύσεις στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Οι χειρισμοί αυτοί παρατίθενται στις παραγράφους που ακολουθούν.

1.4.1.1. Προσθήκη ηλεκτρολυτών

Η πιο παλιά και απλή φυσικοχημική μέθοδος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η προσθήκη διαφόρων πολυηλεκτρολυτών, όπως $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και CaO (Fiestas 1997). Η χρήση των παραπάνω βοηθά τη ρύθμιση του pH των ΥΑΕ και επιτυγχάνει τη δέσμευση των διαλυμένων οργανικών υλών από τα κατακρημνιζόμενα άλατα. Η μέθοδος αυτή ενώ μπορεί να προκαλέσει μείωση του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ κατά 60-70%, η εφαρμογή της μειονεκτεί λόγω του στερεού υπολείμματος που παράγεται μετά το πέρας της επεξεργασίας τους (σε ποσοστό 20% της αρχικής ποσότητας των αποβλήτων).

1.4.1.2. Αντιδραστήριο Fenton

Μια άλλη μέθοδος είναι η επεξεργασία των ΥΑΕ με το αντιδραστήριο Fenton. Η χημική οξείδωση του οργανικού φορτίου που προκαλείται, επιτυγχάνεται μέσω των ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ένα σιδηρούχο άλας ($\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$) (Baldrian *et al.* 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι δύσκολο να εφαρμοστεί για την αποδόμηση αποβλήτων υψηλού φαινολικού φορτίου εξαιτίας της ύπαρξης υδροξυομάδων στον αρωματικό τους δακτύλιο που τους προσδίδει σταθερότητα. Επίσης, η διάσπαση του οργανικού φορτίου συνοδεύεται από παραγωγή τοξικών συστατικών, ενώ τέλος είναι δύσκολο να καθορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton (όπως το pH, η θερμοκρασία, οι αρχικές συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του σιδηρούχου άλατος) (Filipakourou *et al.* 1999, Gemjak *et al.* 2003).

1.4.1.3. Προσρόφηση

Η μέθοδος της προσρόφησης στηρίζεται στην προσθήκη ενεργού άνθρακα σε ΥΑΕ, προκαλώντας τον αποχρωματισμό αυτών. Αποτελέσματα ερευνών αναφέρουν ελαφριά αφαίρεση

1.4.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι

Διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν κυρίως πειραματικά στο παρελθόν προσπάθησαν να δώσουν λύσεις στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Οι χειρισμοί αυτοί παρατίθενται στις παραγράφους που ακολουθούν.

1.4.1.1. Προσθήκη ηλεκτρολυτών

Η πιο παλιά και απλή φυσικοχημική μέθοδος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η προσθήκη διαφόρων πολυηλεκτρολυτών, όπως $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και CaO (Fiestas 1997). Η χρήση των παραπάνω βοηθά τη ρύθμιση του pH των ΥΑΕ και επιτυγχάνει τη δέσμευση των διαλυμένων οργανικών υλών από τα κατακρημιζόμενα άλατα. Η μέθοδος αυτή ενώ μπορεί να προκαλέσει μείωση του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ κατά 60-70%, η εφαρμογή της μειονεκτεί λόγω του στερεού υπολείμματος που παράγεται μετά το πέρας της επεξεργασίας τους (σε ποσοστό 20% της αρχικής ποσότητας των αποβλήτων).

1.4.1.2. Αντιδραστήριο Fenton

Μια άλλη μέθοδος είναι η επεξεργασία των ΥΑΕ με το αντιδραστήριο Fenton. Η χημική οξείδωση του οργανικού φορτίου που προκαλείται, επιτυγχάνεται μέσω των ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ένα σιδηρούχο άλας ($\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$) (Baldrian *et al.* 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι δύσκολο να εφαρμοστεί για την αποδόμηση αποβλήτων υψηλού φαινολικού φορτίου εξαιτίας της ύπαρξης υδροξυομάδων στον αρωματικό τους δακτύλιο που τους προσδίδει σταθερότητα. Επίσης, η διάσπαση του οργανικού φορτίου συνοδεύεται από παραγωγή τοξικών συστατικών, ενώ τέλος είναι δύσκολο να καθορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton (όπως το pH, η θερμοκρασία, οι αρχικές συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του σιδηρούχου άλατος) (Filirakopoulou *et al.* 1999, Gemjak *et al.* 2003).

1.4.1.3. Προσρόφηση

Η μέθοδος της προσρόφησης στηρίζεται στην προσθήκη ενεργού άνθρακα σε ΥΑΕ, προκαλώντας τον αποχρωματισμό αυτών. Αποτελέσματα ερευνών αναφέρουν ελαφριά αφαίρεση

των χρωστικών ουσιών των υγρών αποβλήτων μετά από προσρόφηση ενεργού άνθρακα σε δόσεις μέχρι 10 g Γ¹ αποβλήτου (Shammas 1984). Η μέθοδος αν και συνεπάγεται μικρό χώρο εγκατάστασης, έχει μικρή αποτελεσματικότητα και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό.

1.4.1.4. Εξάτμιση

Στην προσπάθεια διαχείρισης των ΥΑΕ αρκετοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη μέθοδο της εξάτμισης. Με την συγκεκριμένη μέθοδο τα απόβλητα τοποθετούνται σε μεγάλες τεχνητές δεξαμενές ώστε με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας να επιτυγχάνεται εξάτμιση και αποξήρανση των ΥΑΕ, το δε στερεό υπόλειμμα που απομένει έχει τη δυνατότητα λόγω συστάσεως να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Ο Escolano Bueno (1975) ήταν από τους πρώτους που εφάρμοσε την μέθοδο, ισχυριζόμενος ότι μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε ελαιοτριβεία μεσαίου μεγέθους (παραγωγή ΥΑΕ έως 3 τόνους ανά χρόνο). Ο μεγάλος όγκος των δεξαμενών που απαιτείται, το μεγάλο χρονικό διάστημα (7-8 μήνες) που χρειάζεται για να φτάσουμε στο στάδιο της αποξήρανσης, η έκλυση δυσάρεστων οσμών και το υψηλό κόστος μεταφοράς των ΥΑΕ από τα ελαιοτριβεία στις δεξαμενές εξάτμισης, καθιστούν την καθολική εφαρμογή της μεθόδου αυτής πρακτικά αδύνατη για την ολοκληρωμένη διαχείριση των ΥΑΕ (Cabrega *et al.* 1996). Η μέθοδος αυτή, τυγχάνει, υπό προϋπόθεση, εφαρμογή σε περιοχές με ξηροθερμικό κλίμα, όπως η Κρήτη, όπου η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου οδήγησε σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Μαρίνος 1991).

1.4.1.5. Επίπλευση

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε διάφορα είδη βιομηχανικών αποβλήτων. Στα απόβλητα μετά από την κατεργασία τους με θρομβωτικά μέσα, πραγματοποιείται διοχέτευση υπό πίεση λεπτών φυσαλίδων αέρα ή μίγματος CO₂ και αέρα, οι οποίες προσκολλώνται στις λιπαρές ουσίες και στα στερεά σωματίδια των αποβλήτων, παρασύροντας αυτά στην επιφάνεια, από όπου απομακρύνονται (Μάτης 1981). Εντούτοις, η αποδοτικότητα της μεθόδου ήταν μη ικανοποιητική κατά την εφαρμογή της σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Curi *et al.* 1980).

1.4.1.6. Θερμική συμπίκνωση

Η εφαρμογή της μεθόδου θερμικής συμπίκνωσης βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιούνται ειδικοί εξατμισοποιητές, με τους οποίους επιχειρείται συμπίκνωση των ΥΑΕ με εξάτμιση. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η μείωση του όγκου των αποβλήτων (έως 75%), η επανάκτηση του λαδιού που περιέχεται στα ΥΑΕ σε ποσοστό 0.1-0.3% και η δυνατότητα χρησιμοποίησης του εξατμισμένου-συμπυκνωμένου νερού στο ίδιο ελαιοτριβείο (Amirante 1983). Παρόλα αυτά, το μεγάλο κόστος εφαρμογής της μαζί με τη διαχείριση του στερεού υπολείμματος που παράγεται προβάλλουν ως τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής.

1.4.1.7. Υπερδιήθηση – Αντίστροφη ώσμωση

Μια άλλη μέθοδος επεξεργασίας είναι η υπερδιήθηση, κατά την οποία γίνεται χρήση μεμβρανών, ικανών να διαχωρίσουν τα διαλυμένα από τα αιωρούμενα συστατικά των ΥΑΕ με βάση τις διαστάσεις των μεγαλομοριακών οργανικών ενώσεων. Η ωθούσα δύναμη διαχωρισμού είναι η υδραυλική πίεση, η ίδια που εφαρμόζεται και στη μέθοδο αντίστροφης ώσμωσης. Η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιείται στα συστήματα αντίστροφης ώσμωσης επιτρέπει τη διέλευση του νερού, ενώ είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα οργανικά και ανόργανα συστατικά των αποβλήτων. Οι οσμωτικές μεμβράνες χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση αμινοξέων, βιταμινών, απλών σακχάρων ή και ανόργανων συστατικών. Από τα επεξεργασμένα απόβλητα με μια από τις δύο παραπάνω μεθόδους μπορούν να παραληφθούν ανθοκυανίνες, φυσικές χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ το συμπύκνωμα της υπερδιήθησης κατόπιν ειδικής ξηράνσεως έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή (Ισραηλίδης & Κωδούνης 1982). Οι μέθοδοι είναι πρακτικά δύσκολο να εφαρμοστούν λόγω του μεγάλου ενεργειακού κόστους και κόστους αγοράς των ημιπερατών μεμβρανών.

1.4.1.8. Ηλεκτρολυτική οξείδωση

Ο Βλυσσίδης (1997) πειραματίστηκε με μια άλλη φυσικοχημική μέθοδο που βασίζεται στην ηλεκτρολυτική οξείδωση των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων χρησιμοποιώντας ως άνοδο Τί/Ρι και ως κάθοδο ανοξειδωτο χάλυβα. Η μέθοδος αυτή δε δύναται να εφαρμοστεί σε ευρεία

κλίμακα, παρά μόνο εργαστηριακά, παρότι εμφάνισε μείωση του COD κατά 93%, λόγω των ενεργειακών ποσοτήτων που απαιτούνται.

1.4.1.9. Φυγοκέντρωση

Κατά το παρελθόν είχε επιχειρηθεί η φυγοκέντρωση σε δείγματα ΥΑΕ, αποσκοπώντας στη διαχείριση των αποβλήτων αυτών (Vaccarino *et al.* 1986). Εντούτοις, οι Κουτσαυτάκης & Στεφανουδάκη (1991) αναφέρουν ότι η εφαρμογή της απλής φυγοκέντρωσης των ΥΑΕ ως μεθόδου διαχείρισης είναι προβληματική λόγω του σχηματισμού των κολλοειδών και του μεγάλου κόστους λειτουργίας των διαχωριστήρων.

1.4.1.10. Παραγωγή στερεών καυσίμων

Τα υγρά απόβλητα που υπόκεινται στην συγκεκριμένη επεξεργασία, παρουσιάζουν τη δυνατότητα της καλύτερης ζύμωσης αγροτικών ή δασικών υπολειμμάτων χαμηλής πυκνότητας, με απώτερο σκοπό την παραγωγή ενός προϊόντος ομοιογενών τεμάχιων σφαιρικής ή κυβικής μορφής. Ο Μιχελάκης & Κουτσαυτάκης (1989) αναφέρουν ότι σε μια περίπτωση εφαρμογής της μεθόδου στην Ισπανία, όπου σαν πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν ΥΑΕ (κατά 40%), δασική βιομάζα (κατά 40%) και στερεά αστικά υπολείμματα (κατά 20%), η ενεργειακή απόδοση ήταν της τάξεως των 4500 Kcal/Kg. Εντούτοις, περαιτέρω έρευνες δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

1.4.2. Αναερόβια ζύμωση των ΥΑΕ για παραγωγή βιοαερίου (βιομεθανοποίηση)

Η αναερόβια ζύμωση είναι μια μέθοδος επεξεργασίας αποβλήτων υψηλού ρυπαντικού φορτίου (COD 5-40 g l⁻¹) με την οποία επιδιώκεται η αποδόμηση των αποβλήτων αυτών και παράλληλα η βιομετατροπή των οργανικών ουσιών τους σε μεθάνιο (Aggelis *et al.* 2001).

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε μια πολύκροκη βιοχημική διεργασία που πραγματοποιείται σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες απουσία οξυγόνου κατά την οποία οι οργανικές ουσίες των αποβλήτων αποδομούνται και διασπώνται σε μικρότερα μόρια με τη συμβολή μεθανογόνων βακτηρίων. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η συνεχής έκλυση βιοαερίου (μίγμα μεθανίου 65% και διοξειδίου του άνθρακα 35%) το οποίο είναι ενεργειακά αξιοποιήσιμο και η παραγωγή επεξεργασμένης υλός (βιολογικής λάσπης), η οποία λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά μπορεί μετά από ειδική επεξεργασία να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα.

Οι Fiestas *et al.* (1982) ήταν από τους πρώτους ερευνητές που μελέτησαν την αναερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων αναφέροντας τη μείωση του οργανικού φορτίου (BOD_5) κατά 80% και παράλληλα την παραγωγή 0.85 m³ βιοαερίου, περιεκτικότητας 80 και 20% σε CH₄ και CO₂, αντίστοιχα ανά Kg αποβλήτου. Η ποσότητα του βιοαερίου που παράχθηκε αναφέρθηκε ότι δύναται να καλύπτει ενεργειακά της ανάγκες της μονάδας βιομεθανοποίησης.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στον Ελλαδικό χώρο είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας ζύμωσης των ΥΑΕ με παράλληλη μείωση του οργανικού φορτίου. Συγκεκριμένα, ο Νταλής (1989) αναφέρει ότι τα αρχικά συνολικά απόβλητα τοποθετούνται απ' ευθείας σε βιοαντιδραστήρα αναρροής για να υποβληθούν σε αναερόβια ζύμωση, χωρίς να απαιτείται με ασβέστη ρύθμιση του pH και αφαίρεση του ελαιώδους στρώματος. Μετά από χρόνο παραμονής πέντε ημερών των ΥΑΕ στον βιοαντιδραστήρα διαπιστώθηκε αποδόμηση κατά 75-80% του αρχικού οργανικού ρυπαντικού φορτίου τους και παράλληλα παραγωγή 1280 m³ βιοαερίου ή 895 m³ μεθανίου ημερησίως.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα οι Georgakakis & Dalis (1993) μελέτησαν στην περιοχή Πεζών Κρήτης την εφαρμογή ενός συστήματος αναερόβιας βιολογικής επεξεργασίας ΥΑΕ που στηριζόταν στην απόδοση δύο διαφορετικών τύπων χωνευτήρων με παράλληλη παραγωγή βιοαερίου. Η παραγόμενη ενέργεια ήταν 4,45 m³ βιοαερίου ανά m³ αποβλήτου, ποσότητα αρκετή για να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη αναγκών θέρμανσης 15 στρεμμάτων θερμοκηπίου.

Οι μέθοδοι βιομεθανοποίησης όμως παρουσιάζουν και μειονεκτήματα όπως, τη χρησιμοποίηση εξοπλισμού και εγκαταστάσεων μεγάλου κόστους, την απαίτηση εξειδικευμένου προσωπικού, το μεγάλο χρόνο παραμονής των αποβλήτων στον αντιδραστήρα, την πρόκληση ανεπιθύμητων οσμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και τέλος τη διάθεση του υπολείμματος, το οποίο για να διατεθεί απευθείας στο περιβάλλον χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία (Borja *et al.* 1993, Georgakakis & Dalis 1993, Ramos-Cornezana *et al.* 1995).

1.4.3. Συγκομποστοποίηση

Η μέθοδος της συγκομποστοποίησης στηρίζεται στη συνεχή ή διακοπτόμενη αναπλήρωση με απόβλητα των εξατμιζόμενων ποσοτήτων νερού, λόγω της θερμότητας η οποία εκλύεται κατά τη θερμόφιλη φάση της αερόβιας χώνευσης των στερεών οργανικών υλικών. Το ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα εφοδιάζεται με οργανικό υλικό που διατηρεί τη μικροβιακή δράση και κατά συνέπεια και τη θερμοκρασία σε υψηλά επίπεδα, απ' ετέρου δε επιταχύνεται η διαδικασία εξάτμισης του

περιεχομένου στα απόβλητα νερού, λόγω επιμήκυνσης της θερμοφιλης φάσης και της θερμότητας που εκλύεται. Μετά την ολοκλήρωση της θερμοφιλης φάσης και της φάσης ωρίμανσης προκύπτει ένα ποιοτικά αξιόλογο οργανοχουμικό λίπασμα (Μπαλής 1983, Μπαλής και άλλοι 1991). Το τελικό προϊόν εφαρμόστηκε σε διαφορετικές καλλιέργειες φυτών σε διάφορες αναλογίες με θεμιτά αποτελέσματα με δυνατότητα βελτίωσης του, όσον αφορά τον έλεγχο της ωριμότητας του, το βαθμό σταθεροποίησης του και τη φυτοτοξικότητά του πριν από οποιαδήποτε γεωργική χρήση. Η δυνατότητα εφαρμογής των κομποστών αυτών στα εδάφη είναι πιο ασφαλής σε σχέση με τις κομπόστες που προέρχονται από αστικά απορρίμματα λόγω της απουσίας βαρέων μετάλλων, τοξικών συνθετικών οργανικών ενώσεων και τέλος την απουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή ιών επικίνδυνων για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Στην συγκομποστοποίηση με λιόζουμα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα γεωργικά στερεά υπολείμματα όπως είναι φύλλα και κλαδιά ελιάς, υπολείμματα βαμβακιού, άχυρα σιταριού, άχυρα καλαμποκιού, δασικά υπολείμματα και εκχυλισμένος ελαιοπυρήνας (πυρηνόξυλο) (Paredes *et al.* 1987, Ntougias *et al.* 2003, 2006a).

Η χρήση του πυρηνόξυλου για τη διαχείριση των λιόζουμων μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία ώστε με την τεχνική της συγκομποστοποίησης πυρηνόξυλου με λιόζουμα, να παραχθεί ως τελικό προϊόν ένα μη φυτοτοξικό βελτιωτικό εδάφους με επισχετικές ιδιότητες (Καντουλάκης *et al.* 2005, Ntougias *et al.* 2003, 2006a, Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 1999, 2000). Το περιεχόμενο του συγκεκριμένου βελτιωτικού εδάφους αποτελείται από τα χουμικά συστατικά της κομποστοποίησης, ένα πλήθος μικροοργανισμών καθώς και τα λιπαρά στοιχεία των ΥΑΕ, που συμβάλλουν στην αύξηση της γονιμότητας του εδάφους (Balis *et al.* 1991).

Άλλες μελέτες (Zervakis & Balis 1996, Zervakis *et al.* 1996) έδειξαν ότι το εμπλουτισμένο με ελαιόζουμο πυρηνόξυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή εδωδιμων μανιταριών *Pleurotus*, αναδεικνύοντας το σαν ένα εναλλακτικό μέσο καλλιέργειας τους.

Μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η ανάγκη πλήρους και αυτοματοποιημένου ελέγχου των συνθηκών που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία, όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και το ποσοστό O_2/CO_2 ανεβάζοντας σημαντικά το κόστος εφαρμογής (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 2000).

1.4.4. Παραγωγή βιοαποδομήσιμων υλικών

Ο Sainz-Jimenez και οι συνεργάτες του (1986) χαρακτήρισαν μια σειρά από πολυμερείς ουσίες που βρέθηκαν σε μη κατεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων καθώς και στα υπολείμματα

αυτών που μένουν μετά την εξάτμιση τους σε δεξαμενές. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή πολύ-β-υδροξυ βουτυρικού οξέος και πολυσακχαριτών που παράχθηκαν από την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών σε ΥΑΕ. Ο σχηματισμός του βιοπολυμερούς πολύ-β-υδροξυ βουτυρικού οξέος προήλθε από την ανάπτυξη του βακτηρίου *Azotobacter chroococcum* σε ΥΑΕ, (Martinez-Toledo *et al.* 1995), ενώ το βακτήριο *Xanthomonas campestris* (Lopez-Lopez 1994), παρήγαγε, κατά την επώαση του σε ΥΑΕ, ξανθάνη, που χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Η παραγωγή βιοαποδομήσιμων πολυμερών από τη χρήση των ΥΑΕ χαρακτηρίζεται ως ενδιαφέρουσα μέθοδος, λόγω του χαμηλού κόστους απόκτησης τους.

1.4.5. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες

Η άκριτη εισαγωγή των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων στο οικοσύστημα (κοντινούς χειμάρρους, ξερορέματα, θάλασσες ή λίμνες) προκαλεί επιβάρυνση του περιβάλλοντος (Ζερβάκης 1999). Το μέγεθος της οικολογικής καταστροφής (υδάτινη πανίδα και χλωρίδα), που συντελείται διαφέρει ανάλογα με τον υδάτινο αποδέκτη και τη δυνατότητα αυτοκαθαρισμού του. Η ιδιάζουσα σύσταση (υψηλό φαινολικό και λιπαρό φορτίο) των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων ασκεί μια επιλεκτική δράση στους μικροοργανισμούς του εδάφους ευνοώντας την ανάπτυξη εκείνων των στελεχών που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα συστατικά του (Paredes *et al.* 1987, Piotrowska *et al.* 2006).

Η διάθεση των ΥΑΕ στο έδαφος μπορεί να εφαρμοστεί υπό προϋποθέσεις, αφού στη σύστασή τους δεν περιέχονται ουσίες υψηλής επικινδυνότητας, όπως βαρέα μέταλλα (Andrich *et al.* 1992). Παράλληλα, η ευεργετική επίδραση τους στο έδαφος ενισχύεται από την παρουσία αξιοσημείωτων ποσοτήτων οργανικών ουσιών, φωσφόρου, καλίου και μαγνησίου αλλά και εξαιτίας του εμπλουτισμού του εδάφους με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, οι οποίοι βοηθούν την επίσχεση διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων (Ntougias *et al.* 2003).

Ο Fiestas (1997) μετά από μια σειρά πειραμάτων απέδειξε την τοξική επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε διάφορα είδη κυπρίνων, ενώ ο Balice και οι συνεργάτες του (1984) αναφέρουν συστατικά των λιόζουμων τα οποία είναι τοξικά στα ψάρια και γενικότερα στη χλωρίδα και την πανίδα του νερού. Επίσης, η Βορέαδου (1994) αναφέρεται στην αρνητική επίδραση των λιόζουμων στη βιοποικιλότητα των τμημάτων της διαδρομής των χειμάρρων (που έχουν ρυπανθεί από τη διάθεση ελαιόζουμων) κατά 41.6 έως 71.4% (ανάλογα με την παροχή νερού του χειμάρρου).

Η απευθείας εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων ΥΑΕ σε καλλιεργούμενο έδαφος και συγκεκριμένα σε ετήσιες καλλιέργειες και ποώδη φυτά αναστέλλει τη βλάστησή τους, δρώντας παρεμποδιστικά

(Bonari 1993). Ο βαθμός τοξικότητας του εξαρτάται από το είδος της καλλιέργειας και το στάδιο ανάπτυξης των φυτών (Casa *et al.* 2003). Αντιθέτως, δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική φυτοτοξική δράση σε δένδρα που έγινε απευθείας εφαρμογή των υγρών αποβλήτων (μέθοδος της φερτάρδευσης) (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 2002, Ehaliotis *et al.* 2003). Έρευνες που έχουν γίνει στην Ιταλία και στην Ισπανία (Proietti *et al.* 1988), δείχνουν ότι η άρδευση των ελαιοδένδρων με συγκεκριμένες ποσότητες ΥΑΕ όχι μόνο δεν επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη τους αλλά παρατηρείται και αύξηση των αποδόσεών τους. Επίσης δεν δημιουργεί αρνητικές επιπτώσεις στη μικροχλωρίδα και στη δομή του εδάφους, εφόσον οι χρησιμοποιούμενες δόσεις είναι ελεγχόμενες (Ζερβάκης 1999, Ehaliotis *et al.* 2003).

1.4.6. Βιολογικές επεξεργασίες-αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών

Πολλά πειράματα εστίασαν το ενδιαφέρον τους στην εξεύρεση μιας διαδικασίας βιοαποδόμησης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών, στοχεύοντας στη μείωση του ρυπαντικού φορτίου τους και κατά επέκταση των φαινολικών ενώσεων (Dias *et al.* 2004), οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή επισχετική δράση έναντι βακτηρίων και μυκήτων του εδάφους και στην παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Moreno *et al.* 1987, Gonzales *et al.* 1990, Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 1999, 2000).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί εισάγονται στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων ως εμβόλια και για την επικράτηση τους πρέπει να εξασφαλιστούν ευνοϊκές συνθήκες όπως κατάλληλος αερισμός, θερμοκρασία και pH (Fiestas 1977). Τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας χωρίζονται σε συστήματα αεροβικής ή αναεροβικής επεξεργασίας ανάλογα με το αν είναι στελέχη αερόβιων ή στελέχη αναερόβιων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι είτε βακτήρια (π.χ. στελέχη του γένους *Lactobacillus*) ή μύκητες συμπεριλαμβανομένων των ζυμών (π.χ. στελέχη των γενών *Pleurotus* και *Yarrowia*).

1.4.6.1. Βακτήρια

Τα βακτήρια απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα σε ολόκληρο τον κόσμο, όπως σε κλινικά δείγματα, σε φυτά, σε ζώα, σε αστικά λύματα, σε προϊόντα αερόβιας χώνευσης, στο έδαφος, στους υδροφόρους ορίζοντες, στη θάλασσα, κ.α. (Longan 1994).

Γνωρίζοντας τα παραπάνω και δεδομένου ότι η περιεκτικότητα του λιόζουμου σε οργανικό άνθρακα υπερέχει σημαντικά της περιεκτικότητας του σε άζωτο, από μικροβιολογική άποψη η διαπίστωση αυτή οδήγησε προς την επικράτηση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε έδαφος που δέχεται συστηματικά εφαρμογές με ελαιόζουμο. Μελετώντας λοιπόν έδαφος που δέχεται διαδοχικούς χειρισμούς με ΥΑΕ, παρατηρήθηκε, υπό αερόβιας συνθήκες, η ανάπτυξη αζωτοβακτηρίων, ιδιαίτερα στελεχών του γένους *Azotobacter* (Chatjiravidis *et al.* 1996). Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων τα οποία προκατεργάστηκαν με H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον και κατόπιν εμβολιάστηκαν με το αζωτοβακτήριο *Azotobacter vinelandii* σε αεριζόμενο βιοαντιδραστήρα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής, ήταν η μείωση των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων (π.χ. αυξίνες) και μεγάλων ποσοτήτων μικροβιακών πολυσακχαρίτων. Η εφαρμογή των επεξεργασμένων αυτών ΥΑΕ στο έδαφος προκάλεσε αύξηση της ανθεκτικότητας του εδάφους ενάντια στα φυτοπαθογόνα *Pythium* και *Phytophthora*, που αποδόθηκε σε επικράτηση μικροβιακής χλωρίδας ανταγωνιστικής προς αυτά και στην παραγωγή μεταβολιτών που διατηρούν τον πληθυσμό αυτών σε χαμηλά επίπεδα (Chatjiravidis *et al.* 1996).

Επίσης, κατά τον εμβολιασμό ΥΑΕ συγκεντρώσεως 10% v/v με το βακτήριο *Lactobacillus plantarum* παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 45% του χρώματος κατά 58% και του COD κατά 55% (Lamia & Moktar 2003).

1.4.6.2. Μύκητες - Ζύμες

Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας των ΥΑΕ σε σάκχαρα, οδήγησε τον Gharsallah (1993) στη χρησιμοποίηση των ζυμών *Candida crusei*, *Saccharomyces chevalerie* και *Saccharomyces rouxi* (είδη που ανήκουν στην τάξη Saccharomycetales) για τη βιοαποικοδόμηση των ΥΑΕ. Οι παραπάνω ζύμες, αναπτυσσόμενες σε σύστημα συνεχούς ροής κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ, οδήγησαν στη μείωση του COD κατά 40-50%. Ικανοποιητικότερα αποτελέσματα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρουσίασε η ζύμη *Saccharomyces rouxi*, η ανάπτυξη της οποίας δεν παρεμποδίστηκε σχεδόν από κανένα φαινολικό συστατικό των αποβλήτων (Gharsallah 1993).

Για την αποδόμηση των ΥΑΕ έχει χρησιμοποιηθεί και η ζύμη *Candida tropicalis*, η οποία μετά από επώαση 24 h στους 40°C μείωσε το COD κατά 70%, τις πολυφαινόλες κατά 55% και τις

μονοφαινόλες κατά 70%, το ποσοστό όμως των ΥΑΕ που περιείχε το υπόστρωμα ανάπτυξης της συγκεκριμένης ζύμης ήταν μικρότερο του 15% (Ettayebi *et al.* 2003).

Επίσης, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* προκάλεσε μείωση του COD από 146 g l⁻¹ σε 90 g l⁻¹ σε δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων μέσα σε χρονικό διάστημα 12 h, ενώ με το πέρας 24 h το COD μειώθηκε επιπλέον σε 30 g l⁻¹. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν αναφέρεται το ποσοστό των ΥΑΕ που χρησιμοποιήθηκε (Scioli & Vollaro 1997). Επίσης, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύχθηκε σε υποστρώματα εμπλουτισμένα με ΥΑΕ, αποσκοπώντας στην παραγωγή μονοκυτταρικών πρωτεϊνών (Hamdi 1993). Η παραγωγή πρωτεϊνών είναι σημαντική, γιατί υπό προϋποθέσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κτηνοτροφικές και ιχθυοτροφικές μονάδες ως τροφή (Ζοιοπουλος 1983).

Η κύρια ομάδα μικροοργανισμών η οποία χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για τη μείωση ή εξάλειψη της ρυπαντικής δράσης των φαινολικών ουσιών των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων είναι οι μύκητες. Η ικανότητά τους να βιοαποδομούν τα ΥΑΕ αξιοποιήθηκε αρχικά για την προετοιμασία των αποβλήτων για περαιτέρω φυσικοχημικούς και βιολογικούς χειρισμούς και για να επιτευχθεί η μετατροπή τους απευθείας σε ένα περιβαλλοντικά αποδεκτό τελικό προϊόν (Ζερβάκης & Μπαλής 1996). Διάφορα είδη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των παραπάνω χειρισμών παρουσίασαν ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξή τους σε υποστρώματα ΥΑΕ, αποδομώντας φαινολικές ουσίες, παράγοντας μονοκυτταρική πρωτεΐνη, αποχρωματίζοντας και αποτοξικοποιώντας τα απόβλητα.

Οι φαινολικές ουσίες των ΥΑΕ και συγκεκριμένα ορισμένες ενώσεις της ομάδας αυτών που είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα και το μαύρο χρώμα του αποβλήτου, έχουν συγγενή δομή με τη λιγνίνη, την κυτταρίνη ή με ενώσεις που προκύπτουν από την αποδόμησή τους. Η αποδόμηση της λιγνίνης στη φύση πραγματοποιείται κυρίως από τους μύκητες και ως πιο αποδοτικοί αποδομητές της κατηγορίας αυτής εμφανίζονται οι βασιδιομύκητες (Hammel 1997). Για το λόγο αυτό οι λιγνοκυτταρινολυτικοί βασιδιομύκητες και συγκεκριμένα αυτοί που προκαλούν λευκές σήψεις (“white-rot fungi”) άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως σε περιβαλλοντικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές σχετικές με την αποδόμηση των ΥΑΕ (Ζερβάκης 1999).

Όσον αφορά στη βιομετατροπή παραγώγων της λιγνίνης, το ενζυμικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης είναι κατά κύριο λόγο οξειδωτικό και μη εξειδικευμένο (Ζερβάκης 1999). Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτήν τη διαδικασία είναι η λιγνίνη-υπεροξειδάση, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η λακάση (φαινολοξειδάση). Η οξείδωση λιγνίνης και φαινολικών υποστρωμάτων από τη λιγνίνη-υπεροξειδάση οδηγούν σε αποπολυμερισμό αυτών εξαιτίας της διάσπασης των αρωματικών δακτυλίων, επιτυγχάνοντας έτσι την ανοργανοποίηση τους.

Μύκητες της ομάδας λευκής σήψης όπως *Phlebia radiata*, *Dichomitus squalens*, *Polyporus frondosus*, *Coriolus versicolor* και *Phanerochaete chrysosporium*, ερευνήθηκαν και αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αποχρωματίζουν τα ΥΑΕ (Sayadi & Ellouz 1992, 1993).

Πιο συγκεκριμένα ο βασιδιομύκητας *Phanerochaete chrysosporium* επωάστηκε επί 12 ημέρες σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 20% v/v, προκαλώντας σε ποσοστό 40% τον αποχρωματισμό των αποβλήτων αυτών μειώνοντας παράλληλα το ποσοστό των φαινολικών συστατικών κατά 60%, παράγοντας κύρια λακκάση και ίχνη υπεροξειδάσης (εξαρτώμενης των ιόντων μαγγανίου) (Dias *et al.* 2004). Επίσης διαπιστώθηκε σημαντική μείωση του COD των ελαιόζυμων και συσχέτιση της διάσπασης των φαινολικών ενώσεων με το χρώμα των αποβλήτων (Sayadi & Ellouz 1992). Τα ίδια αποτελέσματα σύμφωνα τον Perez και τους συνεργάτες του (1987) έχουν αναφερθεί και για τον βασιδιομύκητα *Phanerochaete flavido-alba*.

Στελέχη του μύκητα *Aspergillus niger* παρουσίασαν ικανότητα μεταβολισμού των φαινολικών ουσιών μειώνοντας κύρια το οργανικό φορτίο των ΥΑΕ, δίνοντας χαμηλές τιμές COD, φυτοτοξικότητας και χρώματος (Hamdi *et al.* 1991, Hamdi & Ellouz 1992, Cereti *et al.* 2004).

Επιπροσθέτως, η αερόβια κατεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τον μύκητα *Aspergillus terreus* σε συνδυασμό με την αναερόβια ζύμωση των στερεών υπολειμμάτων του υλικού αυτού, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του φαινολικού φορτίου τους κατά 94%, της φυτοτοξικότητάς τους σε ποσοστό 87%, καθώς και αύξηση της παραγόμενης ποσότητας του μεθανίου κατά 30% (Bojja *et al.* 1993).

Στη μελέτη των Grappelli *et al.* (1991) διαπιστώθηκε η ικανότητα του μύκητα *Lentinula edodes* να μειώνει το φαινολικό φορτίο των ΥΑΕ και ιδιαίτερα των *o*-διφαινολών. Ο μύκητας αυτός χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή λακκάσης με σκοπό την ενζυματική κατεργασία των ΥΑΕ (D' Annibale *et al.* 1996, Casa *et al.* 2003). Σε πρόσφατες μελέτες, όπου πραγματοποιήθηκε προσθήκη 2.8 U ml⁻¹ ενζύμου λακκάσης, που απομονώθηκε από το στέλεχος *L. edodes*, σε διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 5% v/v, παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 70% και του COD κατά 67% (D' Annibale *et al.* 2004a).

Επίσης, η χρήση του μύκητα λευκής σήψης *Panus tigrinus* GBS 577.79 στη βιοαποικοδόμηση των λιόζυμων, έχει δείξει ότι προκαλεί μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 74% μέσω της παραγωγής του ενζύμου λακκάσης (Fenice *et al.* 2003). Σχεδόν στα ίδια συμπεράσματα οδηγήθηκε και οι D'Annibale *et al.* (2004) από τη μελέτη του ίδιου μύκητα, παρατηρώντας μείωση των φαινολικών συστατικών σε ποσοστό 89%.

Κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με τους μύκητες *Funalia trogii* και *Coriolus versicolor*, έγινε μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάσης. Αυξημένη ενζυμική δράση εμφάνισε το

στέλεχος *Funalia trogii* (7.1 U ml⁻¹), ενώ η παραγωγή λακκάσης από τον *Coriolus versicolor* περιορίστηκε στο μισό περίπου της προηγούμενης τιμής (3.4 U ml⁻¹). Συγκεκριμένα ο μύκητας *F. trogii* μείωσε τα φαινολικά συστατικά κατά 93%, και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο κατά 70%, ενώ αποχρωμάτισε το δείγμα κατά 81%. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και το στέλεχος *C. versicolor*, δηλαδή μείωσε το φαινολικό φορτίο σε ποσοστό 90%, το COD στο 63%, ενώ αποχρωμάτισε το δείγμα κατά 81% (Yesilada *et al.* 1996, 1998).

Οι μύκητες λευκής σήψης του γένους *Pleurotus* έχουν απασχολήσει πολλούς ερευνητές και έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη τους είναι εκλεκτικοί αποικοδομητές της λιγνίνης (Platt *et al.* 1983, Kerem *et al.* 1992). Εξαιτίας λοιπόν του ενζυμικού μηχανισμού αποδόμησης των φαινολικών συστατικών που διαθέτουν, μειώνουν σημαντικά την φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ ενώ ταυτόχρονα προκαλούν τον αποχρωματισμό τους (Zervakis *et al.* 1996). Η μελέτη των Ζερβάκη & Μπαλή (1996) αναφέρεται στην ικανότητα των μυκήτων των ειδών *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* και *P. eryngii* μετά από την εφαρμογή τους σε υποστρώματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων διαφορετικών αραιώσεων, να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα υψηλού φαινολικού φορτίου. Το στέλεχος *P. eryngii* κατά τον εμβολιασμό του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιοζουμων, εμφάνισε συγκριτικά με τα άλλα δύο στελέχη την καλύτερη παραγωγή βιομάζας. Συγκεκριμένα, άριστα αποτελέσματα εμφάνισε για περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου 25% σε ακατέργαστα ή 50% σε κατεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Επίσης, η χρήση του μύκητα *P. ostreatus* LGAM P69, έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη μείωση του φαινολικού φορτίου των ΥΑΕ. Αναλυτικά, πραγματοποιήθηκαν τρεις εφαρμογές του μύκητα, σε αποστειρωμένο διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50% και σε θερμικά επεξεργασμένο (100°C) διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50% και 100%, παρουσιάζοντας μείωση του φαινολικού φορτίου αντιστοίχως κατά 78, 67 και 65%. Εντούτοις, η μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε όλες τις εφαρμογές ήταν μικρότερη του 10% (Fountoulakis *et al.* 2002).

Επίσης, κατά τη προσθήκη του ενζύμου λακκάση (130 U l⁻¹), που απομονώθηκε από το μύκητα *Rhizomorpus coccineus*, σε διάλυμα συγκεντρώσεως φαινολικών συστατικών, όμοιων με εκείνων των ΥΑΕ, παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου τουλάχιστον κατά 50% (Jaouani *et al.* 2005).

Στελέχη του είδους *Geotrichum candidum* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στον αποχρωματισμό προκαλώντας μείωση του χρώματος κατά 70% και του φαινολικού φορτίου σκουρόχρωμων υγρών αποβλήτων σε ποσοστό έως 50% (Assas *et al.* 2000, Ayed *et al.* 2005).

Συνοψίζοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων ή κάποιων συστατικών τους στην αύξηση ή δράση μιας μεγάλης ποικιλίας

βακτηρίων και μυκήτων προκύπτει ότι πολλά είδη μικροοργανισμών παρεμποδίζονται ενώ άλλα ευνοούνται (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Επιδράσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμοί	Επίδραση	Αναφορά
Σποριογόνα Gram(+) βακτήρια	Παρεμπόδιση	Paredes <i>et al.</i> (1986)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Παρεμπόδιση από ελευρωπαϊνή	Ramos-Comezana (1983)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Αποδόμηση φαινολικών ουσιών. Μείωση COD	Lamia & Moktar (2003)
<i>Bacillus megaterium</i>	Παρεμπόδιση από φαινολικές ουσίες	Rodriguez <i>et al.</i> (1988) Perez <i>et al.</i> (1992)
<i>Azotobacter</i> spp. <i>A. vinelandii</i> <i>A. chroococcum</i>	Αύξηση σε ΥΑΕ, αζωτοδέσμευση και εμπλουτισμός εδάφους με αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς	Χατζηπαυλίδης κ.ά. (1986) Μπαλής κ. α. (1991) Μπαλής κ. α. (1989) Flouri <i>et al.</i> (1990) Chatzipavlidis <i>et al.</i> (1996) Garcia-Barrionuevo <i>et al.</i> (1992)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Αποδόμηση φαινολικών οξέων	Perez <i>et al.</i> (1990)
<i>Torulopsis utilis</i> <i>Saccharomyces lipotilica</i> <i>Candida Krusei</i> , <i>Saccharomyces chevalerie</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>	Ανάπτυξη σε ΥΑΕ Παραγωγή μονοκύτταρης πρωτεΐνης	Fiestas Ros de Ursinos (1961) Fiestas Ros de Ursinos (1966) Ercoli & Ertola (1983) Gharsallah (1993)
<i>Geotrichum</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Rhizoctonia</i>	Παρεμπόδιση από ελευρωπαϊνή	Ramos-Comezana (1983)
<i>Geotrichum candidum</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Αποχρωματισμός ΥΑΕ	Assas <i>et al.</i> 2000 Ayed <i>et al.</i> 2005
<i>Coriolus(Trametes)versicolor</i>	Αποδόμηση φλαβονοειδών Ανάπτυξη σε ΥΑΕ Αποχρωματισμός ΥΑΕ Αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Παραγωγή ενζύμων.	Saiz-Jimenez & Gomez-Alarcón (1986) Sayadi & Ellouz (1993) Yesilada <i>et al.</i> 1996, 1998
<i>Chaetomium elatum</i> , <i>Inonotus hispidus</i> , <i>Phlebia gigantea</i>	Παρεμπόδιση από τα ΥΑΕ	Saiz-Jimenez & Gomez-Alarcón (1986)
<i>Eurotium echinolatu</i> , <i>Coriolopsis gallica</i> <i>Botrytis cinerae</i>	Ανάπτυξη σε ΥΑΕ	Saiz-Jimenez & Gomez-Alarcón (1986)

Μικροοργανισμοί	Επίδραση	Αναφορά
<i>Trichoderma viride</i> <i>Aspergillus niger</i>	Απότοξικοποίηση και βελτίωση των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ	Hamdi <i>et al.</i> (1991) Hamdi & Ellouz (1992)
<i>Aspergillus terreus</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών	Martinez-Nieto <i>et al.</i> (1992)
<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Penicillium brevi-compactum</i> <i>Penicillium frequentans</i> <i>Penicillium hordei</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Τα ΥΑΕ επιτείνουν την αύξηση	Saiz-Jimenez & Gomez-Alarcón (1986)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Phanerochaete flavidio-alba</i>	Αυξάνουν ταχύτερα από άλλους βασιδιομύκητες σε ΥΑΕ. Αποχρωματισμός ΥΑΕ	Saiz-Jimenez & Gomez-Alarcón (1986) Perez <i>et al.</i> (1987) Sayadi & Ellouz (1993)
<i>Phlebia radiata</i> <i>Dichomitus squalens</i> <i>Polyporus frondosus</i>	Αποχρωματισμός ΥΑΕ	Sayadi & Ellouz (1993)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>P. florida</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>P. eryngii</i>	Αύξηση σε ΥΑΕ και σχηματισμός καρποφοριών	Sanjust <i>et al.</i> (1991) Zervakis <i>et al.</i> (1996)
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>P. cornucopiae</i>	Αύξηση σε ΥΑΕ, αποχρωματισμός, αποτοξίνωση	Zervakis <i>et al.</i> (1996)
<i>Pleurotus eryngii</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Agrocybe aegerita</i> <i>Auricularia auricula-judae</i>	Ανάπτυξη μυκηλίου σε ελαιοπυρηνόλυμα, παραγωγή καρποφοριών <i>A. aegerita</i> σε ελαιοπυρηνόλυμα, παραγωγή μανιταριών σε υποπροϊόντα ελαιουργίας.	Zervakis <i>et al.</i> (1997)
<i>Lentinula edodes</i> <i>Panus tigrinus</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Παραγωγή ενζύμων. Αποχρωματισμός ΥΑΕ	D' Annibale <i>et al.</i> 2004a D'Annibale <i>et al.</i> 2004
<i>Funalia trogii</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Παραγωγή ενζύμων.	Yesilada <i>et al.</i> 1996, 1998
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Μείωση COD	Scioli & Vollaro 1997
<i>Candida tropicalis</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Μείωση COD	Ettayebi <i>et al.</i> 2003
<i>Pychnoporus coccineus</i>	Αποδόμηση φαινολικών συστατικών.	Jaouani <i>et al.</i> 2005

Για να γίνει επομένως σαφέστερη η συμπεριφορά ενός μικροβιακού πληθυσμού στα υγρά αποβλήτα ελαιοτριβείων χρειάζεται να εμβαθύνουμε σε δύο σημεία: Τα πρώτο αφορά τη συγκέντρωση, διότι ορισμένες ενώσεις ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ευνοϊκή επίδραση στη μικροβιακή αύξηση, σε υψηλότερες την παρεμποδίζουν. Το δεύτερο υποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα ΥΑΕ από μικροβιακή άποψη μπορεί να θεωρηθούν σαν μίγμα ευεργετικών και επισχετικών παραγόντων, ο καθένας από τους οποίους επιδρά διαφορετικά στους επιμέρους μικροβιακούς πληθυσμούς. Σαν άμεση συνέπεια των δύο αυτών δράσεων αναμένεται ότι απλή αραίωση των ΥΑΕ να επηρεάζει σημαντικά τις εκλεκτικές τους ιδιότητες και η συμπεριφορά ενός οργανισμού μπορεί να εξαρτάται από το βαθμό αραίωσης του υλικού (Μπαλής 1989, 1994).

1.5. Επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους

Η άμεση εφαρμογή των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων στο έδαφος, επηρεάζει σημαντικά τις φυσικοχημικές (συγκέντρωση ολικού, αμμωνιακού, νιτρικού αζώτου, οργανικού άνθρακα, pH και ηλεκτρική αγωγιμότητα) και βιολογικές (αναπνευστική και λοιπή μικροβιακή δραστηριότητα) ιδιότητες του εδάφους, ασκώντας μια επιλεκτική δράση στους μικροοργανισμούς του (Paredes *et al.* 1987, Piotrowska *et al.* 2006).

Οι Paredes *et al.* (1986) παρατήρησαν σημαντική αύξηση στο βακτηριακό πληθυσμό του εδάφους, στο οποίο είχαν προστεθεί ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Στη μελέτη αυτή, ο πληθυσμός των μελών του γένους *Bacillus* μειώθηκε σημαντικά, ενώ αντιστοίχως ο πληθυσμός των ακτινομυκήτων αυξήθηκε. Οι ίδιοι ερευνητές επίσης διαπίστωσαν αύξηση της αγωγιμότητας του εδάφους και τοξικότητα σε βλαστάριοντα σπέρματα (Paredes *et al.* 1987). Τα ΥΑΕ, επιδρώντας στη μικροβιακή χλωρίδα του εδάφους, προκάλεσαν μείωση του αριθμού των σποριογόνων βακτηρίων καθώς και αύξηση των οξεόφιλων μικροοργανισμών του εδάφους οι οποίοι λαμβάνουν μέρος στον κύκλο του αζώτου. Σημαντική ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων K^+ , Na^+ και Mg^{+2} , ενώ η σχέση άνθρακα προς άζωτο ήταν 30-40%.

Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στον κύκλο του αζώτου, όπου διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων (NO_3^- -N) στο έδαφος που δέχθηκε ΥΑΕ ήταν σε χαμηλότερο επίπεδο τις πρώτες οκτώ εβδομάδες του πειράματος σε σύγκριση με το έδαφος-μάρτυρα (Perez & Callardo-Lara 1987). Επιπλέον, η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+ -N) στο έδαφος που δέχθηκε ΥΑΕ αυξήθηκε τις πρώτες εβδομάδες, ενώ μειώνονταν μετά

βαθμιαία. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του ολικού N παρουσίασε τάσεις μείωσης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος εκτός από τις 4 πρώτες εβδομάδες. Το έδαφος κατά την περίοδο που δέχθηκε YAE εμφάνισε παρεμπόδιση της νιτροποίησης, άρα και του διαθέσιμου N στα φυτά, συμπέρασμα που πρέπει να ληφθεί υπ' όψη, για τη χρήση των YAE σαν λίπασμα (Perez & Callardo-Lara 1987). Η αισθητή μείωση των αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων μετά την 8^η εβδομάδα του πειράματος αποδίδεται πιθανότατα σε αφομοίωσή τους από την αυξημένη μικροβιακή χλωρίδα του εδάφους ή σε απονιτροποίηση (Morisot & Tournier 1986).

Η προσθήκη YAE στο έδαφος, όπως αναφέρουν οι Tomati & Galli (1992) αρχικά μείωσε την τιμή του pH, αλλά στη συνέχεια επανήλθε στην αρχική του τιμή, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή σε βάθος 40 cm από την επιφάνεια του εδάφους. Επίσης, κατά την διοχέτευση YAE σε έδαφος παρατηρείται αύξηση της σταθερότητας εδαφικών συσσωματωμάτων (Kotsou *et al.* 2004).

Το έδαφος μετά την προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων παρουσίασε επισχετική δράση έναντι φυτοπαθογόνων εδάφους πχ. έναντι μέλη των γενών *Pythium* και *Phytophthora* (Χατζηπαυλίδης και άλλοι. 1986, Flouri *et al.* 1990, Balis *et al.* 1991) και στελεχών του είδους *Rhizoctonia solani* (Kotsou *et al.* 2004).

Η επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στους πληθυσμούς των μη-συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών του εδάφους είναι ευνοϊκή, καθώς η ένταση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας του εδάφους μπορεί να αυξηθεί όσο αυξάνουν και οι ποσότητες των YAE που έχει δεχθεί, φυσικά υπό το πλαίσιο ελεγχόμενων αερόβιων συνθηκών (Χατζηπαυλίδης και άλλοι 1986, Φλουρή και άλλοι 1988).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακά υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε ημιάγρονη περιοχή του Μαρόκου, επαβεβαιώνουν ότι η επίδραση των YAE στις ιδιότητες του εδάφους σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις των οργανικών και ανόργανων συστατικών τους (Piotrowska *et al.* 2006). Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε αύξηση του συνολικού οργανικού C, του αφομοιώσιμου N και C, του διαθέσιμου P και των διαθέσιμων ποσοτήτων Mn και Fe. Ταυτόχρονα, στο εμποτισμένο με YAE έδαφος παρατηρήθηκε (μετά από επώαση 14 ημερών) αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας και της μικροβιακής βιομάζας. Την ίδια χρονική περίοδο μειώθηκαν σταδιακά οι ενεργότητες ενζύμων που σχετίζονται με την αποδόμηση φαινολικών συστατικών και την απονιτροποίηση. Τις πρώτες ημέρες μετά την προσθήκη των YAE το έδαφος έγινε ιδιαίτερα φυτοτοξικό ενώ με την πάροδο 42 ημερών από την προσθήκη παρατηρήθηκε αποκατάσταση μέρους της βλαστικότητας του εδάφους με την υπολειπόμενη φυτοτοξικότητα να κυμαίνεται στο 30% (Piotrowska *et al.* 2006). Επίσης, μετά από τριετή πειράματα σε αγρό το έδαφος παρουσίασε

την ιδιότητα να αφομοιώνει σημαντικές ιδιότητες οργανικών και ανόργανων συστατικών των ΥΑΕ, σε δόσεις πάνω από 0.6 τόνους ανά στρέμμα (Cabreria *et al.* 1996). Ταυτόχρονα, στην ίδια μελέτη αναφέρεται αύξηση της οργανικής ουσίας του εδάφους καθώς και του αφομοιώσιμου P και N.

1.6. Δράση ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών των ΥΑΕ

1.6.1. Δράση του ενζύμου λακκάση

Η κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψεως διαθέτει ένα οξειδωτικό ενζυμικό σύστημα, μη εξειδικευμένο, αποτελούμενο από τη λακκάση (φαινυλοξειδάση), τη λιγνίνη υπεροξειδάση και την Mn-υπεροξειδάση (Jaouani *et al.* 2005), που το χρησιμοποιεί για την αποδόμηση της λιγνίνης κατά την ανάπτυξη τους σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα (Bourbonnais *et al.* 1995). Οι μύκητες της κατηγορίας αυτής, βρίσκουν, εξαιτίας του παραπάνω ενζυμικού συστήματος που διαθέτουν εφαρμογή και στην αποδόμηση δυσκόλως αποικοδομούμενων ουσιών όπως είναι πολυχλωριομένα φαινύλια, βαφές υφασμάτων, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες κ. α. (Cohen *et al.* 2002).

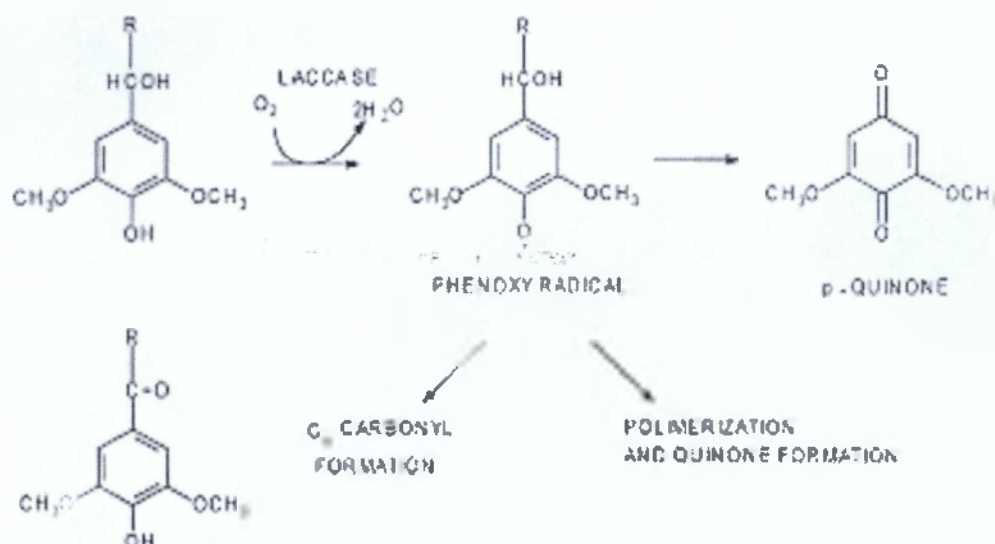
Οι λακκάσες (*p*-διφαινύλο-οξειδορεδοουκτάσες, EC1.10.3.2) ανήκουν στις πολύ-χαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες και παράγονται κυρίως από βασιδιομύκητες αλλά και από μερικά στελέχη ασκομυκήτων. Τελευταίες έρευνες αναφέρουν την ύπαρξή τους και σε βακτήρια (Robles *et al.* 2002). Η λακκάση ως ένζυμο παρουσιάζει υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους 60°C) και είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξείδωση πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικά συστατικά και διαμίνες, αλλά δεν οξειδώνει την τυροσίνη (Thurston 1994, Minussi *et al.* 2002). Αναλυτικά, υποστρώματα της λακκάσης είναι διάφορες *o*- και *p*-διφαινόλες, πολυφαινόλες, αμινοφαινόλες, αρυλοδιαμίνες και πολυαμίνες καθώς και η λιγνίνη. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδρόξυ ομάδων της λιγνίνης από το ένζυμο λακκάση πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και το σχηματισμό ριζών, οι οποίες δύναται να πολυμεριστούν ή να οδηγήσουν σε αποπολυμερισμό (Thurston 1994, Minussi *et al.* 2002).

Το ένζυμο λακκάση περιλαμβάνει στη δομή του τέσσερα ενεργά κέντρα, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα ιόν χαλκού (Cu^{+2}). Τα τέσσερα ιόντα Cu^{+2} κατανέμονται σε διαφορετικές θέσεις και ταξινομούνται σε τρεις τύπους, T1, T2 και T3. Ο τύπος χαλκού T1 εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, ο τύπος T2 ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο, ενώ ο τύπος T3 (που αποτελείται από 2 ιόντα Cu^{+2}) είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου (Palmer *et al.* 2001).

Στα κέντρα αυτά πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών συστατικών (τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου) μέσω μιας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Solomon *et al.* 1996). Η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό σχετίζεται με τη μετατροπή του υποστρώματος και πιο συγκεκριμένα με οξείδωση των φαινολικών συστατικών (Attanasio *et al.* 2005). Εν περιλήψη, η οξείδωση του υποστρώματος από το ένζυμο λακκάση δίδεται από την παρακάτω αντίδραση.



Η τυπική δράση του ενζύμου λακκάση παρουσιάζεται και στο Σχέδιο 1, όπου ένα φαινολικό συστατικό υφίσταται οξείδωση (απομακρύνοντας ένα ηλεκτρόνιο), σχηματίζοντας σε πρώτη φάση μια φαινοξυ-ρίζα, η οποία μετέπειτα έχει τη δυνατότητα είτε να μετασχηματιστεί σε κινόνη ή να προκαλέσει τον πολυμερισμό της ενδιάμεσης αυτής ρίζας (Minussi *et al.* 2002).

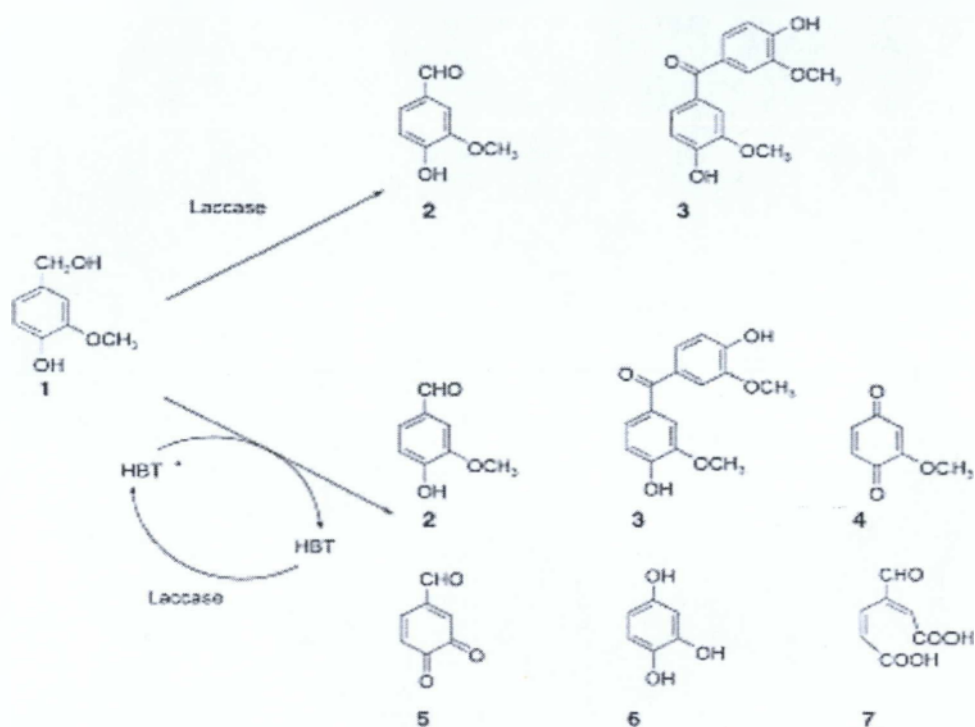


Σχέδιο 1. Οξείδωση φαινολικών συστατικών κατά τη δράση του ενζύμου λακκάση.

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

υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής της λακκάσης λειτουργεί ανασταλτικά για την οξείδωση μη-φαινολικών υποστρωμάτων.

Οι λακκάσες είναι ικανές να οξειδώνουν και συστατικά που έχουν οξειδοαναγωγικά δυναμικά υπεράνω του ενζύμου, παρουσία βέβαια εξειδικευμένων ενεργοποιητών (διαμεσολαβητών-σύστημα λακκάση-διαμεσολαβιτή/σύστημα LM). Οι διεργασίες των LM συστημάτων είναι αποδοτικές, επαναλήψιμες, με εφαρμογή τους στην αποτοξικοποίηση διαφόρων υγρών αποβλήτων ξύλου καθώς και στην οξείδωση των μη-φαινολικών υπομονάδων της λιγνίνης. Η φτωχή λιγνινολυτική δράση του ενζύμου λακκάση, έχει τη δυνατότητα να βελτιωθεί αισθητά με την προσθήκη ενεργοποιητών όπως αζωτούχες ενώσεις που φέρουν υδρόξυ ομάδες, π.χ. με προσθήκη 1-ύδροξυ-βένζο-τριαζόλη (HBT 1-hydroxybenzotriazol). Το ένζυμο λακκάση παρουσία HBT, μπορεί να σχηματίσει οξυβενζοτριαζολική ρίζα, μια σταθερή ρίζα που οξειδώνει τόσο φαινορικά συστατικά όσο και λιγνίνη. Συγκεκριμένα, το σύστημα λακκάση-HBT σε αντίθεση με τη μεμονωμένη δράση του ενζύμου λακκάση όπου πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων, έχει την ικανότητα να αντιδρά με τη λιγνίνη μέσω ενός μηχανισμού ριζών, που προκύπτουν από την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τον αρωματικό δακτύλιο (Crestini *et al.* 2003). Επίσης, σε πειράματα με βανιλική αλκοόλη μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση παρουσία ή μη HBT. Διαπιστώθηκε ότι η απολιγνινοποίηση αρωματικών συστατικών που παρατηρείται από τη δράση του συστήματος λακκάση-HBT, οφείλεται κυρίως στην ικανότητα του να οξειδώνει διάφορες παράπλευρες, ως προς τον αρωματικό δακτύλιο υποομάδες (κυρίως άλκυλο ή καρβόξυ ομάδες), ακολουθούμενο από προσθήκη οξυγόνου στον αρωματικό δακτύλιο (Crestini *et al.* 2003).



Σχέδιο . Δράση Α) του ενζύμου λακκάση. Β) του συστήματος λακκάση-HBT κατά την αποδόμηση αρωματικών μη-φαινολικών συστατικών.

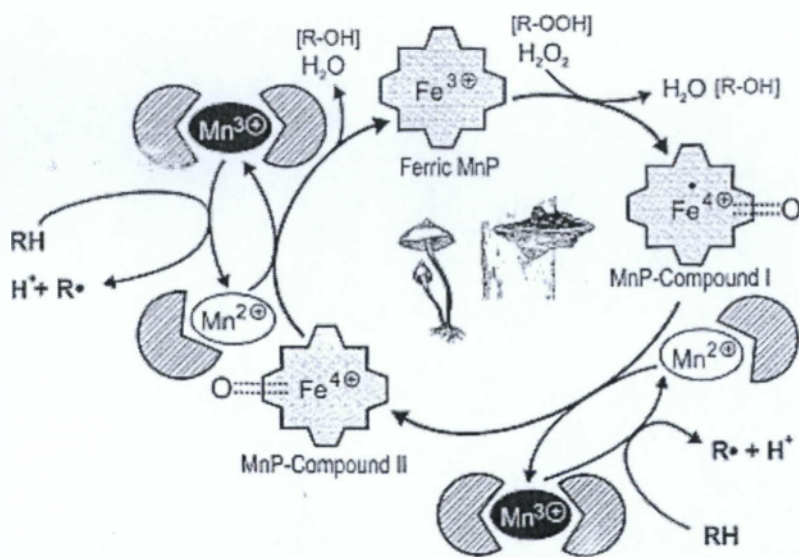
1.6.2. Δράση των υπεροξειδάσεων (Μn-υπεροξειδάση και λιγνίνη υπεροξειδάση)

Οι λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες αποτελούν τα κύρια ενζυμικά συστατικά που συμμετέχουν στην οξείδωση της λιγνίνης, απαιτώντας την παρουσία H_2O_2 . Διακρίνονται σε δύο διαφορετικούς τύπους: την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), που οξειδώνει φαινολικά και μη φαινολικά αρωματικά συστατικά και την εξαρτώμενη του μαγγανίου υπεροξειδάση (MnP), στην οποία το Mn αποτελεί το άριστο αναγωγικό υπόστρωμα (Hammel & Moen 1991, Kirk & Farrell 1987, Kuwahara *et al.* 1984, Wariishi *et al.* 1991b).

Το ένζυμο Mn-υπεροξειδάση δρά σε φαινολικά συστατικά και στις φαινολικές δομές της λιγνίνης που αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% της λιγνίνης (Wariishi *et al.* 1992). Κατά την 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 εξαρτωμένη από το Mn(II), καθώς παρουσία Mn(II) είναι εφικτή η πραγμάτωση δύο 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).

Επιπλέον, η προσθήκη ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα, όπως τα οξαλικά και τα γαλακτικά ιόντα διευκολύνουν την οξειδωση του Mn(II) (Kuan & Tien 1993). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, κάτω από προϋποθέσεις, μπορεί να αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπερόξυ σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου γνωστό και ως συστατικό III. Επιπλέον, οξείδωση του συστατικού III από το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλεί την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης. Αντιθέτως, ακολουθώντας άλλη πορεία, το συστατικό III (που αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο) μπορεί να επανασηματίσει το αρχικό σιδηρούχο ένζυμο, είτε με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων ή με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου (Serguei *et al.* 1998). Το σύμπλοκο Mn(III)-οξαλικό είναι αρκετά σταθερό και είναι ικανό να οξειδώνει διάφορα φαινολικά συστατικά που έχουν χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής από το σύμπλοκο Mn(II)-οξαλικό (Banci *et al.* 1999).

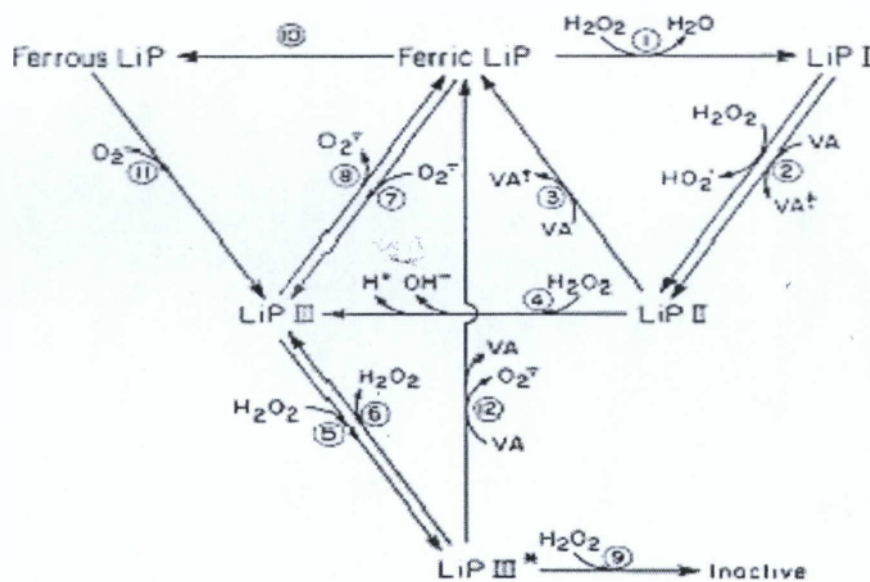


Σχέδιο 3. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (Hofrichter 2002)

Η λιγνίνη υπεροξειδάση είναι από τα πρώτα λιγνινολυτικά ένζυμα που ανακαλύφθηκαν και η παρουσία της έχει ανιχνευθεί σε μύκητες λευκής σήψεως όπως οι βασιδιομύκητες *Phanerochaete*

chrysosporium (Kirk & Farrell 1987) και *Coriolus versicolor* (Kaal *et al.* 1993). Το ένζυμο λιγνίνη υπεροξειδάση, οξειδώνει φαινόλες, αρωματικές αμίνες, αρωματικούς αιθέρες και αλκοόλες (Kersten *et al.* 1990). Η λιγνίνη υπεροξειδάση προκαλεί τον αποπολυμερισμό των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξείδωσης που οφείλεται στο σχηματισμό ενδιάμεσων ριζών (Kirk & Farrell 1987).

Η λιγνίνη υπεροξειδάση οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ενδιάμεση οξειδωμένη μορφή της επανέρχεται στην αρχική της κατάσταση, προσλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια που της λείπουν από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος (δότης), μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Η διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων αποτελεί ουσιαστικό γεγονός για την ανοργάνωση της λιγνίνης (Eriksson *et al.* 1990). Η λιγνίνη υπεροξειδάση λόγω του υψηλότερου δυναμικού οξειδοαναγωγής σε σχέση με εκείνο του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση δρα και σε μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις (συνήθως μεθόξυ υπομονάδες της λιγνίνης), ενώ η Mn-υπεροξειδάση δρα αποκλειστικά σε φαινολικά υποστρώματα (Banci *et al.* 1999).



Σχέδιο 4. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λιγνίνη-υπεροξειδάση (Wariishi 1990)

Αναλυτικά, η διαφορά του μηχανισμού δράσης του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση από το μηχανισμό δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση, είναι η ύπαρξη του Mn ως δότης ηλεκτρονίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Εισαγωγή

Στα πλαίσια της υλοποίησης του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε κατ' αρχήν απομόνωση μυκήτων από εδάφη περιοχής γειτνιάζουσας με ελαιотριβείο, η οποία δεχόταν επί σειρά ετών μεγάλες ποσότητες ΥΑΕ. Για την παραλαβή όσο το δυνατόν μεγαλύτερου εύρους ειδών μυκήτων από τα εν λόγω εδάφη, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (ορισμένα εκ των οποίων ήταν εκλεκτικά για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης συγκεκριμένων κατηγοριών μυκήτων) και διαφορετικές θερμοκρασίες μυκηλιακής αύξησης. Μετά την απομόνωση μεμονωμένων στελεχών μυκήτων και τη παραλαβή καθαρών καλλιεργειών τους σε τρυβλία, εξετάστηκε η μορφολογία των αποικιών τους και επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη (ένα ανά μορφολογικό τύπο αποικίας). Τα τελευταία αξιολογήθηκαν βάσει της ταχύτητας αύξησης τους, την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας σε στερεοποιημένα ΥΑΕ και τη δυνατότητα αποχρωματισμού του μέσου ανάπτυξης (ΥΑΕ). Επιλέχθηκαν 46 στελέχη τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω ως προς την ικανότητα τους να αποδοθούν τα ΥΑΕ.

2.2. Δειγματοληψία

Η παραλαβή των εδαφικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την περιοχή Καλάμι του Νομού Μεσσηνίας το Νοέμβριο του 2005, και σε θέση παρακείμενη του τοπικού ελαιотριβείου, πριν την έναρξη λειτουργίας του και την απόρριψη νέων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων. Η συνολική ποσότητα του προς ανάλυση εδάφους ήταν 5 kg, η οποία αποτελείτο από έξι επιμέρους δείγματα προερχόμενα από ισάριθμα διαφορετικά σημεία της θέσης απόρριψης των ΥΑΕ και από βάθη μέχρι 10-15 cm.

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα

Για την όσο το δυνατόν πληρέστερη παραλαβή ενός μεγάλου-αντιπροσωπευτικού εύρους καλλιεργούμενων ειδών μυκήτων από τα εδάφη που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν τόσο γενικά-μη επιλεκτικά υποστρώματα ανάπτυξης (υπόστρωμα από εκχύλισμα εδάφους «Soil Extact» και συνθετικό υπόστρωμα «Czarek Dox Agar») για την απομόνωση μυκήτων από διάφορες ταξινομικές κατηγορίες, αλλά και εκλεκτικά υποστρώματα («CMC» και «BSS2») για την

απομόνωση κυτταριολυτικών στελεχών και ειδών βασιδιομυκήτων. Στα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκαν κατάλληλα αντιβιοτικά για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης βακτηρίων. Η επώαση των μυκήτων στην περίπτωση των υποστρωμάτων Czarek Dox Agar και CMC πραγματοποιήθηκε στους 25 °C, ενώ στην περίπτωση των υποστρωμάτων SEA και BSS2 η επώαση έλαβε χώρα σε τρεις θερμοκρασίες (10, 25 και 40 °C) για την κάλυψη των απαιτήσεων τόσο της μεσόφιλων όσο και της ψυχρότροφων-ψυχρόφιλων και θερμοανθεκτικών-θερμόφιλων μυκήτων.

2.3.1. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB, Scharlau) με την προσθήκη 24 g PDB σε 1 l απονισμένου νερού (2.4% w/v). Η παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar, πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1.7% w/v άγαρ, στο ήδη παρασκευασμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Το θρεπτικό υπόστρωμα PDA αποστειρώθηκε για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm και μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.3.2. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Για την παρασκευή στερεών και υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων ΥΑΕ, χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες υγρών αποβλήτων που παραλήφθηκαν από φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο τριών φάσεων στην περιοχή Καλάμι του νομού Μεσσηνίας και προερχόταν από επεξεργασία της ελαιοποιήσιμης ποικιλίας «Κορωνεική». Η συντήρηση του αποβλήτου συντελέστηκε σε ψυκτικό θάλαμο στους 5 °C.

Τα ΥΑΕ αρχικά κατεργάστηκαν με πυκνό διάλυμα CaO μέχρι ρυθμίσεως του pH στην τιμή 6. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος ΥΑΕ πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1.7 % w/v άγαρ, στο υγρό αυτό υπόστρωμα ΥΑΕ, ακολούθησε αποστείρωση για 20 min στους 121°C υπό πίεση 2.1 Atm και στη συνέχεια μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Το υπόστρωμα αυτό αποτέλεσε το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ 100% v/v.

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος συγκεντρώσεως 100% v/v, ΥΑΕ των οποίων το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6 φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 10000 rpm και διηθήθηκαν με απλό διηθητικό χαρτί (Watman No.1), με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν

αιωρούμενων σωματιδίων. Το υγρό θρεπτικό αυτό υπόστρωμα αποστειρώθηκε για 20 min στους 121°C υπό πίεση 2.1 Atm.

2.3.3. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Czapek Dox

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Czapek Dox, χρησιμοποιήθηκε έτοιμο σκεύασμα Czapek Dox Agar (Oxoid, UK). Αρχικά προστέθηκαν 45.4 g σκευάσματος σε 1 l απιονισμένου ύδατος, το οποίο μετέπειτα τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο αναδευτήρα μέχρι πλήρους διαλύσεως. Τέλος, το θρεπτικό υπόστρωμα (Czapek Dox Agar) αποστειρώθηκε για 20 min στους 121°C υπό πίεση 2.1 Atm. Με το πέρας της αποστείρωσεως, προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης και στρεπτομυκίνης, έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών αυτών να είναι 50 µg ανά ml θρεπτικού υποστρώματος. Το υλικό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.3.4. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος από εκχύλισμα εδάφους (Soil Extract Agar - SEA)

Σε 1 l απιονισμένου ύδατος προστέθηκαν 100 g εδάφους (στο οποίο είχαν αρχικά απομακρυνθεί ρίζες και πέτρες) (Ntougias *et al.* 2004). Το δείγμα ανακινήθηκε για 30 min στις 150 rpm. Μέσω διηθήσεως απομακρύνθηκε το στερεό υπόλειμμα, ενώ στο εκχύλισμα προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου ύδατος μέχρι συμπληρώσεως του όγκου αυτού στο 1 l. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του εκχυλίσματος στη τιμή 6 με προσθήκη πυκνού διαλύματος φωσφορικού οξέος. Ακολούθησε προσθήκη 17 g l⁻¹ άγαρ και το θρεπτικό υπόστρωμα (Soil Extract Agar-SEA) αποστειρώθηκε για 20 min στους 121°C υπό πίεση 2.1 Atm. Με το πέρας της αποστείρωσεως, προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης και στρεπτομυκίνης έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών αυτών να είναι 50 µg ανά ml θρεπτικού υποστρώματος. Το υλικό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.3.5. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος CarboxyMethyl Cellulose, CMC

Για την παρασκευή 1 l στερεού θρεπτικού υλικού CMC (carboxymethyl cellulose) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά (Gams, 1960):

10 g καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (άλας νατρίου) (Na⁺-carboxymethyl cellulose, Fluka Γερμανίας)
0.5 g εκχύλισμα ζύμης
1.0 g (NH₄)₂SO₄
2.0 g NaNO₃
1.0 g KH₂PO₄
0.5 g MgSO₄·7H₂O
0.5 g KCl
0.05 g CaCl₂
0.01 g FeSO₄·7H₂O
0.01 g CuSO₄
0.01 g MnSO₄·4H₂O
0.001 g ZnSO₄
15 g άγαρ

Πραγματοποιήθηκε διάλυση όλων των παραπάνω στερεών συστατικών σε θερμαινόμενο αναδευτήρα επί 30 min. Με το πέρας της αποστείρωσεως (121°C υπό πίεση 2.1 Atm για 20 min), προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης και στρεπτομυκίνης έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών αυτών να είναι 50 µg ανά ml θρεπτικού υποστρώματος. Το υλικό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.3.6. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Soil Basidiomycete Isolation Medium, BSS2

Για την παρασκευή 1 l στερεού θρεπτικού υλικού BSS2 προστέθηκαν αρχικά τα παρακάτω συστατικά (Thorn *et al.* 1996):

0.4 ml quaiacol (Sigma Γερμανίας)
2 g malt extract
0.5 g KH₂PO₄
0.2 g MgSO₄·H₂O
0.1 g NH₄NO₃
0.1 g KCl

0.02 g $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.05 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
15 g άγαρ

Σε 500 ml H_2O προστέθηκαν το malt extract και το άγαρ και ακολούθησε ανάδευση υπό θέρμανση επί 30 min. Επίσης, προστέθηκαν οι παραπάνω ποσότητες $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ σε 100 ml απιονισμένου νερού το καθένα, ενώ τα υπόλοιπα αντιδραστήρια διαλύθηκαν σε 300 ml απιονισμένου νερού. Τα παραπάνω διαλύματα ενώθηκαν και πραγματοποιήθηκε προσθήκη 5 ml διαλύματος KOH 1 M. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού αυτού υποστρώματος στους 121°C υπό πίεση 2.1 Atm για 20 min.

Με το πέρασ της αποστειρώσεως, προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης, στρεπτομυκίνης, πενικιλίνης, benomyl και ο-φαινυλοφαινόλης, έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αυτών να είναι αντίστοιχα 60, 30, 30, 40 και 6 μg ανά ml θρεπτικού υποστρώματος. Το θρεπτικό υπόστρωμα BSS2 μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.4. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Για τις διαδοχικές αραιώσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα SEA, Czapek Dox, CMC και BSS2. Αρχικά έξι δείγματα των 10 g ομογενοποιήθηκαν με 95 ml διαλύματος 0.85% w/v NaCl το καθένα, υπό ασηπτικές συνθήκες για 30 min στις 200 rpm σε περιστρεφόμενο θάλαμο επώασης και θερμοκρασία 25°C (Ntougias *et al.* 2004). Τα έξι εναιώρηματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων.

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος 0.85% w/v NaCl. Για την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων, 1 ml από το καθένα από τα έξι αιωρήματα προστέθηκε στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (ένας για το κάθε αιώρημα). Το δείγμα ανακινήθηκε, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρη ανάμιξη με το διάλυμα του φυσιολογικού ορού. Κατόπιν, η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο, αραιώνοντας διαδοχικά (δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις). Από τον κάθε σωλήνα παραλήφθηκε ποσότητα 0.2 ml αιωρήματος που τοποθετήθηκε στην επιφάνεια των παραπάνω στερεών θρεπτικών υλικών. Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων πραγματοποιήθηκε ασηπτικά.

Ακολούθησε επώαση στους 10, 25 και 40°C για τα θρεπτικά υποστρώματα SEA και BSS2, ενώ στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων Czapek Dox Agar και CMC πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο στους 25°C.

2.5. Εκτίμηση πληθυσμού - Απομόνωση Στελεχών Μυκήτων

Για την εκτίμηση του πληθυσμού και την παραλαβή στελεχών μυκήτων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση όλων των νεοσχηματιζόμενων αποικιών και καταγραφή αυτών από την πρώτη μέρα επώασης και για διάστημα δύο μηνών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα και κάθε θρεπτικό υλικό σε κάθε μία από τις προαναφερόμενες θερμοκρασίες επώασης. Κατά την απομόνωση, πραγματοποιήθηκε μεταφορά της κάθε νέας αποικίας σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar).

2.6. Αποθήκευση στελεχών μυκήτων

Τα στελέχη των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα SEA, Czapek Dox, CMC και BSS2 (αναφέρονται αναλυτικά στους Παραρτήματα ΙΙΙ, V και VI) εμβολιάστηκαν και αποθηκεύτηκαν προς φύλαξη σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 ml, οι οποίοι περιείχαν 8 ml θρεπτικού υποστρώματος PDA.

2.7. Μελέτη της ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών μυκήτων

Τα στελέχη των μυκήτων από καθεμιά από τις προαναφερόμενες κατηγορίες εμβολιάστηκαν σε στερεό υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100%, έτσι ώστε να μελετηθεί η ικανότητα ανάπτυξης τους στο υπόστρωμα αυτό, με απώτερο σκοπό την επιλογή στελεχών ικανών να αποδοθούν τα υγρά αυτά απόβλητα.

Η επώαση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία ίδια με εκείνη στην οποία είχαν αναπτυχθεί κατά τη διαδικασία απομόνωσης.

Για την αξιολόγηση των στελεχών μυκήτων μετρήθηκε η ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου, ενώ συναξιολογήθηκαν και η ποσότητα-πυκνότητα της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας καθώς και ενδεχόμενος αποχρωματισμός του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των μυκήτων.

2.7.1. Προσδιορισμός της μυκηλιακής ανάπτυξης

Για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του μυκηλίου, τα τριβλία Petri χωρίστηκαν σε τεταρτημόρια και ακολούθησε μέτρηση της ακτίνας του μυκηλίου σε καθ' ένα από αυτά. Η ανάπτυξη τους μετρήθηκε κάθε δύο μέρες επί συνεχές διάστημα δέκατεσσάρων (14) ημερών (όταν η κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου ήταν γρήγορη, ο αριθμός των μετρήσεων ήταν μικρότερος).

Σε σύνολο 1506 στελεχών μυκήτων, επιλέχθηκαν τριάντα έξι (36) και εννέα (9) στελέχη που παρουσίασαν συγκριτικά τη μέγιστη ακτινωτή αύξηση (Πίνακας 3) και πυκνότητα μυκηλίου (Πίνακας 4) αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που παρουσίασαν συγκριτικά την μέγιστη (ακτινωτή) αύξηση.

Στέλεχος Μύκητα	Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης
Σ6	Soil Extract Agar
Σ12	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ16	Czapek Dox Agar
Σ22	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ27	Soil Extract Agar
Σ34	Czapek Dox Agar
Σ42	Soil Extract Agar
Σ59	Soil Basidiomycete Isolation Medium
Σ68	Czapek Dox Agar
Σ76	Czapek Dox Agar
Σ88	Soil Extract Agar
Σ94	Soil Basidiomycete Isolation Medium
Σ142	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ148	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ167	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ204	Soil Extract Agar
Σ212	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ219	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ226	Czapek Dox Agar
Σ231	Soil Extract Agar
Σ247	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ253	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ268	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ276	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ278	Soil Extract Agar
Σ279	Soil Extract Agar
Σ286	Soil Extract Agar
Σ285	Soil Extract Agar
Σ288	Soil Extract Agar
Σ292	Soil Extract Agar
Σ295	Soil Extract Agar
Σ302	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ303	Czapek Dox Agar
Σ316	Soil Extract Agar
Σ318	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ329	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ332	Soil Extract Agar

Πίνακας 4. Επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που παρουσίασαν συγκριτικά την μέγιστη πυκνότητα μυκηλιακής βιομάζας.

Στέλεχος Μύκητα	Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης
Σ99	Carboxymethyl Cellulose Medium
Σ112	Czapek Dox Agar
Σ118	Soil Extract Agar
Σ123	Soil Extract Agar
Σ154	Czapek Dox Agar
Σ179	Soil Extract Agar
Σ189	Soil Extract Agar
Σ195	Soil Extract Agar
Σ242	Carboxymethyl Cellulose Medium

2.8. Σχεδιασμός πειράματος αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με επιλεγμένα στελέχη μυκήτων απομονωμένα από έδαφος-αποδέκτη ΥΑΕ

Για την πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν διαφορετικά στελέχη μυκήτων από τους 25°C, βάσει του μεγέθους της ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου, της πυκνότητας της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας (οπτική παρατήρηση) και του βαθμού αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των στελεχών των μυκήτων. Τα στελέχη αυτά περιγράφονται στον Πίνακα 9.

2.8.1. Διαδικασία

Κάθε ένα από τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων, εμβολιάστηκε σε 50 ml ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v που περιέχονταν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε επιλεγμένο στέλεχος και μάρτυρα.

Κατά τον εμβολιασμό προστέθηκαν ασηπτικά δύο εμβόλια από κάθε στέλεχος μύκητα σε μορφή δίσκου διαμέτρου 0.8 cm που παραλήφθηκαν από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η επώαση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε μη περιστρεφόμενο θάλαμο στους 25°C επί 28 ημέρες, οι δε καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών αναδεύονταν δύο φορές ημερησίως.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις 0 (T0), 5 (T5), 10 (T10), 15(T15) και 20 (T20) ημέρες μετά τον εμβολιασμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων. Σε κάθε μια από τις πέντε αυτές χρονικές περιόδους προσδιορίστηκε για κάθε επιλεγμένο στέλεχος και κάθε επανάληψη, ο δείκτης βλαστικότητας (Germination Index, GI), το ολικό φαινολικό φορτίο και ο βαθμός αποχρωματισμού των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Επιπλέον, τη χρονική στιγμή T20, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της μυκηλιακής βιομάζας, καθώς και προσδιορισμός της

δραστηριότητας των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση (μη εξαρτημένη του Mn), Μπ-υπεροξειδάση, λιγνίνη-υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.

2.8.1.1. Διαδικασία παραλαβής επεξεργασμένου δείγματος υγρών αποβλήτων

Κατά την πραγμάτωση των μετρήσεων στους χρόνους T0, T5, T10 και T15, αφαιρέθηκε ασηπτικά από κάθε επανάληψη για κάθε επιλεγμένο στέλεχος και μάρτυρα ποσότητα 6 ml, αποσκοπώντας στον προσδιορισμό των προαναφερομένων παραμέτρων. Στη χρονική στιγμή T20, η απομείνοντα ποσότητα των επεξεργασμένων ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκε τόσο στη μέτρηση των παραπάνω παραμέτρων όσο και στον προσδιορισμό της δραστηριότητας ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ. Η επιπλέον ποσότητα αποθηκεύτηκε στους 5°C, μέχρι την αποστολή των δειγμάτων αυτών σε συνεργαζόμενο προς το Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας εργαστήριο, για τη μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD).

2.8.1.2. Μέτρηση αποχρωματισμού

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και στο μάρτυρα στις χρονικές στιγμές T0, T5, T10, T15 και T20, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:7 v/v ΥΑΕ:H₂O.

Κατάλληλη ποσότητα του αραιωμένου δείγματος εισήχθη σε μικροσωλήνες (eppendorfs) και ακολούθησε φυγοκέντριση σε μικρο-φυγόκεντρο (Biofuge pico, Hitachi Instruments Inc., USA) στις 11000 rpm επί 3 min. Στο υπερκείμενο αυτού πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 500, 525 και 600 nm μετά από ρύθμιση του φασματοφωτόμετρου (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA).

2.8.1.3. Προσδιορισμός δείκτη Βλαστικότητας

Για τον υπολογισμό της φυτοτοξικότητας των εμβολιασμένων με τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων δείγματα και του μάρτυρα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υπολογισμού του δείκτη βλαστικότητας (Germination Index, GI) των σπόρων του φυτού-δείκτη *Lepidium sativum* L. (Brassicaceae) κν. κάρδαμου (Zucconi *et al.* 1981).

Σε τριβλία Petri τοποθετήθηκαν τρεις δίσκοι διηθητικού χαρτιού, στη δε επιφάνεια αυτών προστέθηκαν 25 σπόροι κάρδαμου. Ακολούθως, οι σπόροι αυτοί διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος

κατάλληλης αραιώσης (Πίνακας 5). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του πάνω μέρους των τριβλίων και τοποθέτηση αυτών σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 25°C επί διάστημα τριών ημερών.

Την ίδια μεταχείριση υφίστατο και ο μάρτυρας ταυτοχρόνως, με τη διαφοροποίηση ότι η ποσότητα του δείγματος αντικαταστήθηκε με αντίστοιχη ποσότητα πόσιμου νερού. Μετά την παρέλευση τριών ημερών, μετρήθηκε ο αριθμός των εκβλαστημένων σπορίων καθώς και το μήκος του ριζιδίου των βλαστανόντων σπόρων.

Πίνακας 5. Αραιώσεις των επεξεργασμένων με τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων ΥΑΕ και του μάρτυρα που πραγματοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας στις διάφορες χρονικές περιόδους.

Χρονική περίοδος (ημέρες)	Αραίωση διαλύματος ΥΑΕ (% v/v)
T5	100
T10	50 & 100
T15	25 & 50 & 100
T20	25 & 100

Ο δείκτης βλαστικότητας δίδεται από τον τύπο:

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

2.8.1.4 Μέτρηση βιομάζας

Η μέτρηση του ξηρού βάρους του μυκηλίου των επιλεγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε με το πέρας της επώασης (T20), όπου το εμβολιασμένο υγρό απόβλητο διηθήθηκε και το μυκήλιο τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 70°C για διάστημα δύο ημερών. Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης ζυγίστηκε στο ζυγό ακριβείας, η δε ποσότητα του ξηρού βάρους του μυκηλίου υπολογίστηκε με αφαίρεση του βάρους του διηθητικού χαρτιού από την ένδειξη της ζυγαριάς.

2.8.1.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.* 1994), η οποία βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών σε αλκαλικό περιβάλλον. Σε κάθε χρονική στιγμή στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και στο μάρτυρα, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:7 v/v YAE:H₂O.

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 1% v/v του προς ανάλυση δείγματος, 1.25 ml αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, 3.75 ml διαλύματος άνυδρου ανθρακικού νατρίου συγκεντρώσεως 20% w/v, συμπληρώνοντας το υπόλοιπο της ογκομετρικής φιάλης με απιονισμένο νερό. Το δείγμα αφήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και κατόπιν πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA) στα 760 nm.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα συριγγικού οξέος γνωστής συγκεντρώσεως (οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ήταν 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 και 1.6 g συριγγικού οξέος/ml) με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της ποσότητας φαινολικών στα προς ανάλυση δείγματα.

2.8.1.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νάτριου (pH 3) συγκεντρώσεως 0.1 M, 0.8 ml διηθημένου δείγματος YAE και 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0.03 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 54 mM και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

2.8.1.7. Μελέτη της παρεμβολής του επεξεργασμένου υγρού αποβλήτου στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένης ή μη του Mn)

Ο προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκεντρώσεως 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB (3- dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM και 0.1 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM.

Ακολούθησε προσθήκη 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως.

Για τον υπολογισμό της παρεμβολής του υποστρώματος χρησιμοποιούμε τον κάτωθι τύπο:
$$\text{Background activity} = d(A_{590 \text{ nm}})/dt(\text{min}) \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$$

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

2.8.1.8. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκεντρώσεως 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM και 0.66 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Ακολούθησε προσθήκη 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως.

Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

Η ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity). Επομένως:

$$\text{Independent peroxidase activity} = \text{AP} - \text{Background activity}$$

2.8.1.9. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκεντρώσεως 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM, 0.66 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και 0.01 ml διαλύματος MnSO_4

συγκέντρωσης 20 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως.

Ο υπολογισμός της δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

Η ενεργότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται από τον προσδιορισμό της AR με αφαίρεση της τιμής της AP (Independent peroxidase + Background activity). Επομένως:

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

2.8.1.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (pH 3) συγκεντρώσεως 0.1 M και 0.8 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιολιπιδίων. Ακολούθησε προσθήκη 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

2.8.1.11. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα 0.8 ml δείγματος και 1.2 ml τρυγικό νάτριο συγκέντρωσης 0.1 M (pH 4.5). Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.4 ml ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) συγκεντρώσεως 1.5 mM. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα 425 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως.

Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά

Πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση μυκήτων από εδάφη που δεχόντουσαν επί σειρά ετών μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Τα στελέχη αυτά αξιολογήθηκαν με βάση την ακτινωτή τους ανάπτυξη, τον αποχρωματισμό του υποστρώματος ανάπτυξης και την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας σε στερεά υποστρώματα ΥΑΕ 100% v/v. Ακολούθησε αξιολόγηση 46 στελεχών μυκήτων (επιλέχθηκαν με βάση τα παραπάνω κριτήρια), στηριζόμενοι στην ικανότητα τους να αποδομούν τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

3.2. Απαρίθμηση στελεχών μυκήτων σε διάφορα στερεά θρεπτικά υποστρώματα και διάφορες θερμοκρασίες επώασης

Απομονώθηκαν 1506 στελέχη μυκήτων κατόπιν επώασης σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα SEA, Czapek Dox, CMC και BSS2 στους 10, 25 και 40°C. Κατά την επώαση στους 10°C, απομονώθηκαν 320 και 17 στελέχη μυκήτων από τα θρεπτικά υποστρώματα SEA και BSS2 αντίστοιχα. Ομοίως, απομονώθηκαν στους 40°C 211 και 7 στελέχη μυκήτων από τα υποστρώματα SEA και BSS2 κατ' αντιστοιχία. Ο αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα SEA, Czapek Dox, CMC και BSS2 με επώαση στους 25°C είναι 358, 250, 207 και 136 αντίστοιχα. Για τις τρεις θερμοκρασίες επώασης, το μεγαλύτερο πλήθος στελεχών μυκήτων απομονώθηκε στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SEA (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Απαρίθμηση στελεχών μυκήτων ανά αναλυόμενο δείγμα, θρεπτικό υπόστρωμα και θερμοκρασία επώασης.

Δείγματα	Θερμοκρασία (°C)	Θρεπτικό υλικό	Αριθμός απομονωμένων στελεχών
δ1	10	Soil Extract	35
δ1	10	BSS2	3
δ2	10	Soil Extract	37
δ2	10	BSS2	1
δ3	10	Soil Extract	74
δ3	10	BSS2	5
δ4	10	Soil Extract	82
δ4	10	BSS2	1
δ5	10	Soil Extract	34
δ5	10	BSS2	5
δ6	10	Soil Extract	58
δ6	10	BSS2	2
δ1	25	CMC	22
δ1	25	Czapek	21
δ1	25	Soil Extract	38
δ1	25	BSS2	6
δ2	25	CMC	48
δ2	25	Czapek	45
δ2	25	Soil Extract	63
δ2	25	BSS2	91
δ3	25	CMC	18
δ3	25	Czapek	65
δ3	25	Soil Extract	83
δ3	25	BSS2	13
δ4	25	CMC	52
δ4	25	Czapek	47
δ4	25	Soil Extract	71
δ4	25	BSS2	8
δ5	25	CMC	31
δ5	25	Czapek	31
δ5	25	Soil Extract	51
δ5	25	BSS2	8
δ6	25	CMC	36
δ6	25	Czapek	41
δ6	25	Soil Extract	52
δ6	25	BSS2	10
δ1	40	Soil Extract	14
δ1	40	BSS2	—
δ2	40	Soil Extract	42

Δείγματα	Θερμοκρασία (°C)	Θρεπτικό υλικό	Αριθμός απομονωμένων στελεχών
δ2	40	BSS2	1
δ3	40	Soil Extract	43
δ3	40	BSS2	3
δ4	40	Soil Extract	36
δ4	40	BSS2	2
δ5	40	Soil Extract	40
δ5	40	BSS2	1
δ6	40	Soil Extract	36
δ6	40	BSS2	—
ΣΥΝΟΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ			1506

3.3. Επιλογή στελεχών μυκήτων

Βάσει των κριτηρίων αξιολόγησης που αναφέρονται παραπάνω (§ 1), επιλέχθηκαν 46 στελέχη μυκήτων τα οποία διερευνήθηκαν περαιτέρω. Η αξιολόγηση βασίστηκε κυρίως στον υπολογισμό της ακτινωτής ανάπτυξης των στελεχών μυκήτων, επιλέγοντας εκείνα (33 στελέχη) των οποίων ο μέγιστος ρυθμός (ακτινωτής) ανάπτυξης κυμαινόταν από 5 έως 15.4 mm ανά ημέρα, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα σχεδόν αμελητέα φάση υστέρησης (0-1 ημέρες), με εξαίρεση τα στελέχη Σ34, Σ219, Σ226 και Σ302 των οποίων η φάση υστέρησης κυμάνθηκε από 2-4 ημέρες (Πίνακας 8). Επιπλέον, τα στελέχη Σ219, Σ247, Σ253 και Σ302 παρουσίασαν εκτός της ταχείας ανάπτυξης τους και ικανοποιητικό αποχρωματισμό.

Ένα πλήθος δεκατριών (13) στελεχών επιλέχθηκαν βάσει της ικανότητας τους τόσο να αποχρωματίζουν τα ΥΑΕ (στελέχη Σ76, Σ303, Σ318 και Σ332), όσο και να σχηματίζουν πυκνό μυκήλιο (στελέχη Σ99, Σ112, Σ118, Σ123, Σ154, Σ179, Σ189, Σ195 και Σ242) (Πίνακας 7).

Η ακτινωτή ανάπτυξη του συνόλου των στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν παρουσιάζονται στα Παραρτήματα I, II και III.

Πίνακας 7. Επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που παρουσίασαν ικανοποιητικό αποχρωματισμό και μεγάλη πυκνότητα μυκηλίου.

Στέλεχος	Μέσος Ρυθμός Ανάπτυξης (\pm SE) (mm/ημέρα)	Μέγιστος Ρυθμός Ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Φάση υστέρησης (ημέρες)	Αριθμός Μετρήσεων	Διάρκεια Μετρήσεως (ημέρες)
Σ76	2.7 \pm 0.4	3.9	1	6	13
Σ99	2.8 \pm 0.7	5.1	3	6	14
Σ112	4.6 \pm 0.4	5.2	0	3	7
Σ118	2.4 \pm 0.4	4.3	3	7	16
Σ123	2.8 \pm 0.1	3.2	0	5	12
Σ154	4.7 \pm 0.3	5.3	0	3	7
Σ179	2.4 \pm 0.3	3.1	0	6	14
Σ189	4.7 \pm 0.4	5.5	0	3	7
Σ195	3.4 \pm 0.2	3.9	0	4	10
Σ242	3.5 \pm 1.0	6.5	0	5	10
Σ303	4.3 \pm 1.5	5.8	0	2	5
Σ318	4.0 \pm 0.6	5.1	0	3	7
Σ332	3.6 \pm 0.3	4.4	0	4	9

\pm SE: Τυπικό σφάλμα του αριθμητικού μέσου.

Πίνακας 8. Επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη (ακτινωτή) ανάπτυξη μυκηλίου.

Στέλεχος	Μέσος Ρυθμός Ανάπτυξης (\pm SE) (mm/ημέρα)	Μέγιστος Ρυθμός Ανάπτυξης (mm/ημέρα)	Φάση υστέρησης (ημέρες)	Αριθμός Μετρήσεων	Διάρκεια Μετρήσεως (ημέρες)
Σ6	6.6 \pm 1.9	10	0	3	6
Σ12	5.0 \pm 1.1	7	1	4	8
Σ16	5.5 \pm 0.9	6.5	0	3	6
Σ22	5.8 \pm 0.2	6	1	3	6
Σ27	7.3	7.3	0	1	1
Σ34	6.9 \pm 0.4	7.3	2	3	7
Σ42	6.3 \pm 1.6	7.9	1	3	6
Σ59	5.0	5	0	1	2
Σ68	6.1	6.1	0	1	2
Σ88	8.5	8.5	0	1	1
Σ94	7.8 \pm 5.4	13	0	2	5
Σ142	8.9	8.9	0	3	1
Σ148	7.2	7.2	0	3	1
Σ167	7.8	7.8	0	3	1
Σ204	5.0 \pm 0.4	5	0	2	4

Σ212	5.1 ± 1.1	6.1	0	2	4
Σ219	11	11	4	2	4
Σ226	6.9 ± 1.3	8.1	2	3	7
Σ231	5.3 ± 1.1	6.4	0	2	4
Σ247	7.9 ± 0.4	8.3	0	2	3
Σ253	6.8 ± 1.5	8.3	0	2	3
Σ268	6.2 ± 1.4	7.8	0	3	6
Σ276	5.5 ± 0.4	6.0	0	3	6
Σ278	5.3 ± 0.4	6.0	0	3	6
Σ279	5.2 ± 0.2	5.5	0	3	6
Σ285	5.3 ± 0.2	5.6	0	3	6
Σ286	5.4 ± 0.2	5.8	0	3	6
Σ288	5.3 ± 0.3	5.8	0	3	6
Σ292	5.0 ± 0.1	5.1	0	3	6
Σ295	5.1 ± 0.4	5.6	0	3	6
Σ302	5.6 ± 1.4	8.3	2	4	8
Σ316	15.4	15.4	0	2	5
Σ329	10.5	10.5	0	1	2

3.4. Μορφολογία μυκήλιου των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.

Η μορφολογία του μυκήλιου των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v παρουσιάζονται στον Πίνακα 9, η δε αντίστοιχη περιγραφή όλων των στελεχών που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στα Παραρτήματα III, V και VI.

Πίνακας 9. Περιγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών επιλεγμένων στελεχών μυκήτων.

Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο	Περιγραφή χαρακτηριστικών
Σ6	SOIL	Μυκήλιο με αραιές γκριζες-λαδί υφές διαφορετικής έντασης αποχρώσεων. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ12	CMC	Μυκήλιο με κρυσταλλωμένα σταγονίδια στην επιφάνεια του, όπου υπάρχουν υφές με κυπαρισσί αποχρώσεις. Πίσω μέρος πράσινο μαύρο-ανθρακί.
Σ16	CZAPEK	Ασβεστώδες μυκήλιο στο κέντρο του, κρεμ χρώματος στην περιφέρεια, πέρα από το οποίο εκτείνεται λεία επιφάνεια μυκήλιου λευκού χρώματος, πέρα από το οποίο εκτείνεται ζώνη τριών χιλιοστών λευκών υφών. Πίσω μέρος μυκήλιο καφέ σκούρο στο εσωτερικό του με λευκές υφές στην περιφέρεια.
Σ22	CMC	Μυκήλιο, το κέντρο του οποίου είναι μαύρου χρώματος, με εξωτερική ζώνη δέκα χιλιοστών λευκών πυκνών υφών.

Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο	Περιγραφή χαρακτηριστικών
		Πίσω μέρος λευκό.
Σ27	SOIL	Μυκήλιο χνουδωτό στο κέντρο του πέρα από το οποίο εκτείνεται ομόκεντρος δακτύλιος τριών λευκών-καφέ υφών ελαφρώς χνουδωτών και πέρα από το οποίο πάλι ομόκεντρος δακτύλιος έξι-οκτώ χιλιοστών πιο καφετί χρώματος, πέρα από το οποίο υπάρχουν πιο ανοικτές γκριζες υφές επτά χιλιοστών. Πίσω μέρος μυκήλιο κρεμ-γκρίζο χρώματος.
Σ34	CZAPEK	Καφέ μυκήλιο στην επιφάνεια του οποίου υπάρχουν κηλίδες πράσινων υφών. Πίσω μέρος μυκήλιο γκριζωπό με ύπαρξη πράσινων στιγμάτων.
Σ42	SOIL	Καφέ σκούρο ανθρακί μυκήλιο στην περιφέρεια του οποίου εκτείνονται αραιές γκριζες υφές. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ59	BSS2	Μυκήλιο χνουδωτό με γκριζο-καφέ χρώμα. Πίσω μέρος κρεμ ελαφρύ καφέ.
Σ68	CZAPEK	Μυκήλιο στην επιφάνεια του οποίου υπάρχουν κηλίδες πράσινων υφών. Πίσω μέρος μυκήλιο ανθρακί στο εσωτερικό του, καφέ σκούρο χρώμα στην περιφέρεια.
Σ76	CZAPEK	Περίμετρος αποικίας μη ομοιόμορφα κυκλικής με παραγωγή σπορίων και ύπαρξη πράσινων αποικιών. Πίσω μέρος μυκήλιο σκούρο κίτρινο.
Σ88	SOIL	Μυκήλιο κυπαρισσι χρώματος. Πίσω μέρος μυκήλιο έντονο καφέ στο κέντρο του, υποκίτρινο-ελαφρύ καφέ στην περιφέρεια.
Σ94	BSS2	Καφέ χνουδωτό μυκήλιο. Πίσω μέρος λευκό.
Σ99	CMC	Κυπαρισσι χρώματος μυκήλιο, πυκνό υπερυψωμένο στο εσωτερικό του με περιμετρική ζώνη έξι χιλιοστών κίτρινου χρώματος. Πίσω μέρος μυκήλιο καφέ-καραμελέ στο εσωτερικό του, κίτρινο στην περιφέρεια του. Παραγωγή κίτρινης-ανοικτού καφέ χρώματος χρωστικής ουσίας.
Σ112	CZAPEK	Λευκό-γκρίζο κανονικό μυκήλιο. Πίσω μέρος καφέ.
Σ118	SOIL	Καφέ χρώματος μυκήλιο στο εσωτερικό του με λευκή χνουδωτή περιμετρική ζώνη τριών χιλιοστών, παραγωγή χρωστικής ουσίας καφέ ανοικτού χρώματος. Πίσω μέρος καφέ-κόκκινο χρώμα στο κέντρο του, πορτοκαλόχρουν στην περιφέρεια του.
Σ123	SOIL	Μυκήλιο, κίτρινο-φωσφοριζέ χρώματος με ακτινωτές πτυχώσεις, πράσινο υπερυψωμένο στο κέντρο του. Παραγωγή κίτρινης χρωστικής ουσίας. Πίσω μέρος έντονο πορτοκαλί χρώμα με πυχωτές ακτινωτές ραβδώσεις.
Σ142	CMC	Μυκήλιο με γκριζες υφές. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ148	CMC	Γκριζωπό πυκνό χνουδωτό μυκήλιο. Πίσω μέρος γκριζωπό.

Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο	Περιγραφή χαρακτηριστικών
Σ154	CZAPEK	Μυκήλιο κρεμ χρώματος με ύπαρξη αραιών γκρι υφών, με περιμετρικό ομόκεντρο δακτύλιο επτά χιλιοστών. Πίσω μέρος μυκήλιο κρεμ πιο ανοικτού χρώματος στο κέντρο του και πιο σκούρο στην περιφέρεια με ύπαρξη ομόκεντρου δακτυλίου.
Σ167	CMC	Μυκήλιο έντονο χνουδατό με κρεμ ελαφρώς χνουδατές υφές. Πίσω μέρος λευκό-ελαφρώς κρεμ.
Σ179	SOIL	Μυκήλιο καφέ ανοικτού χρώματος, χνουδατό με σταγονίδια στο κέντρο του. Πίσω μέρος καφέ πιο ανοικτό καφέ στην περιφέρεια του.
Σ189	SOIL	Μυκήλιο χρώματος λευκό – γκρι, χνουδατό με σταγονίδια στο κέντρο του. Πίσω μέρος καφέ σκούρου χρώματος, παραγωγή λαδί χρωστικής ουσίας.
Σ195	SOIL	Μυκήλιο ελαφρώς χνουδατό με γκριζες-λευκές υφές. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ204	SOIL	Μυκήλιο με ελαφριά ρόδινη χροιά στο εσωτερικό του, κρεμ-υποκίτρινο στην περιφέρεια. Πίσω μέρος ρόδινο στο εσωτερικό του, κρεμ στην περιφέρεια.
Σ212	CMC	Ελαφρώς χνουδατό κανονικό μυκήλιο, χρώματος σάπιου μήλου. Πίσω μέρος με έντονο βαθύ σάπιου μήλου χρώμα.
Σ219	CMC	Μυκήλιο με πυκνές υφές και με ελαφρύ πορτοκαλόχρουν χροιά. Ομοίως το πίσω μέρος.
Σ226	CZAPEK	Καφέ μυκήλιο με ακτινωτές πτυχώσεις. Πίσω μέρος καφέ-κανελί, παραγωγή κανελής χρωστικής ουσίας.
Σ231	SOIL	Μυκήλιο, καφέ ανοικτό στο εσωτερικό του, κρεμ υφές στην περιφέρεια με ακτινωτές πτυχώσεις.
Σ242	CMC	Μυκήλιο λευκό με γκρι υφές. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ247	CMC	Λευκό μυκήλιο πυκνό. Πίσω μέρος λευκό.
Σ253	CMC	Λευκό μυκήλιο πιο πυκνό στο κέντρο του. Πίσω μέρος λευκό.
Σ268	CMC	Μυκήλιο καφέ στο εσωτερικό του με λευκές υφές στην περιφέρεια του. Ομοίως στο πίσω μέρος.
Σ276	CMC	Ανθρακί-καφέ χρώματος μυκήλιο στο εσωτερικό του με λευκές υφές στην περιφέρεια. Πίσω μέρος ομοίως.
Σ278	SOIL	Λευκό-υποκίτρινο μυκήλιο με έντονες ελαφρώς σαγρέ υφές στο εσωτερικό του. Πίσω μέρος κίτρινο-υποκίτρινο στο εσωτερικό του με λευκές υφές στην περιφέρεια.
Σ279	SOIL	Λευκού χρώματος μυκήλιο, ελαφρώς σαγρέ στο κέντρο του. Πίσω μέρος μυκήλιο κίτρινου χρώματος με καφετί χροιά.
Σ285	SOIL	Μυκήλιο λευκού-γκρι χρώματος με αραιές υφές στην περιφέρεια. Πίσω μέρος μυκήλιο καφέ-ανθρακί χρώματος στο εσωτερικό, λευκό στην περιφέρεια.
Σ286	SOIL	Μυκήλιο έντονο κρεμ, ελαφρύ πορτοκαλόχρουν στο εσωτερικό του με υποκίτρινες υφές στην περιφέρεια. Πίσω μέρος κίτρινο-υποκίτρινο.

Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο	Περιγραφή χαρακτηριστικών
Σ288	SOIL	Κρεμ κανονικό μυκήλιο, στην περιφέρεια του οποίου εκτείνονται αραιές υφές διαμέτρου πέντε χιλιοστών. Πίσω μέρος κρεμ.
Σ292	SOIL	Λευκό μυκήλιο. Πίσω μέρος λευκό.
Σ295	SOIL	Λευκό μυκήλιο με ελαφρύ γκριζα χροιά στο εσωτερικό του. Πίσω μέρος ελαφρώς καφετί στο εσωτερικό του, λευκές υφές στην περιφέρεια.
Σ302	CMC	Μυκήλιο ανθρακί χρώματος, ελαφρώς χνουδωτό. Πίσω μέρος μυκήλιο ανοικτού καφέ χρώματος.
Σ303	CZAPEK	Λευκό ελαφρώς χνουδωτό στην επιφάνεια του. Πίσω μέρος έντονο καφέ στο εσωτερικό με λευκές υφές στην περιφέρεια.
Σ316	SOIL	Λευκό μυκήλιο στο εσωτερικό με πράσινη περιμετρική ζώνη στην περιφέρεια. Πίσω μέρος κίτρινο.
Σ318	CMC	Λευκό χνουδωτό σχετικά αγριωπό μυκήλιο. Πίσω μέρος λευκό.
Σ329	CMC	Λευκό-γκρίζο ανοικτού χρώματος μυκήλιο στο εσωτερικό ανυψωμένο χνουδωτό, στην περιφέρεια μη υψωμένο με λευκές πτυχωτές υφές. Πίσω μέρος λευκό.
Σ332	SOIL	Λευκό χνουδωτό μυκήλιο. Από κάτω επιφάνεια λευκού χρώματος.

BSS2: στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Soil Basidiomycete Isolation Medium, CMC: στερεό θρεπτικό υπόστρωμα CarboxyMethyl Cellulose, CZAPEK: στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Czapek Dox, SOIL: στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από εκχύλισμα εδάφους Soil Extract Agar-SEA

3.5. Αξιολόγηση επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε υγρές καλλιέργειες

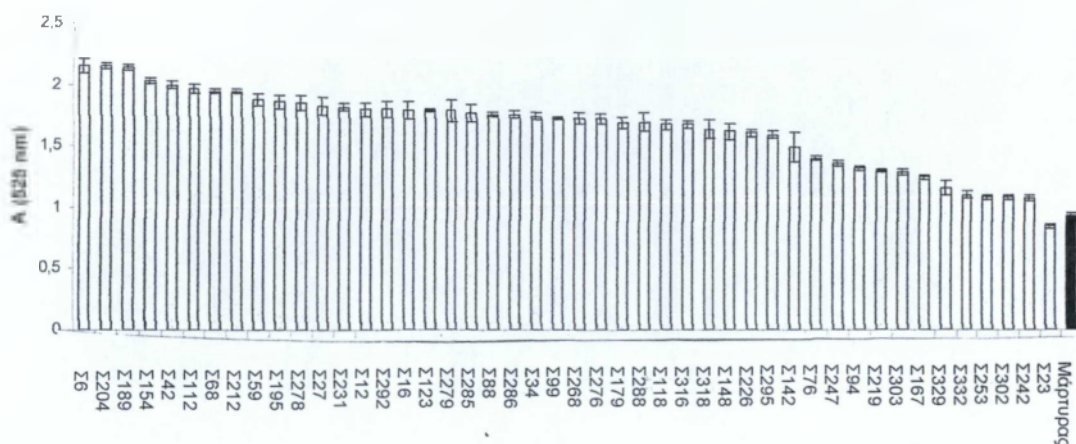
3.5.1. Προσδιορισμός χρώματος ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων

Μικρός αποχρωματισμός (11-12%) του μέσου ανάπτυξης (ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v) παρατηρήθηκε μόνο τη χρονική στιγμή T5 και για μερικά από τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων (Σ12, Σ59, Σ76, Σ212, Σ219, Σ226, Σ242, Σ247, Σ253, Σ302, Σ316, Σ318, Σ329 και Σ332) (Πίνακας 12). Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος Σ22 το οποίο αρχικά στο χρόνο T5 προκάλεσε αποχρωματισμό του υποστρώματος κατά 33% ενώ με την πάροδο του χρόνου το ποσοστό αποχρωματισμού μειώθηκε (παρατηρήθηκε αποχρωματισμός της τάξεως του 10% σε σχέση με τον μάρτυρα τη χρονική στιγμή T20). Τη χρονική στιγμή T20, όλα τα στελέχη μυκήτων εκτός του Σ22 προκάλεσαν αύξηση του χρώματος του μέσου ανάπτυξης τους (έως και 128%) (Πίνακας 10) (Γράφημα 1).

Πίνακας 10. Προσδιορισμός του βαθμού αποχρωματισμού των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v.

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική διάρκεια (5 ημέρες-T5)		Χρονική διάρκεια (10ημέρες-T10)		Χρονική διάρκεια (15ημέρες-T15)		Χρονική διάρκεια (20ημέρες-T20)	
	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος
Μάρτυρας	1.05 ± 0.02		0.94 ± 0.03		1.03 ± 0.02		0.94 ± 0.02	
Σ6	1.53 ± 0.06	146	1.32 ± 0.02	140	1.75 ± 0.10	170	2.15 ± 0.06	228
Σ12	0.93 ± 0.04	89	1.19 ± 0.04	127	1.47 ± 0.03	143	1.81 ± 0.05	192
Σ16	1.23 ± 0.05	117	1.13 ± 0.04	120	1.48 ± 0.05	144	1.80 ± 0.07	190
Σ22	0.70 ± 0.04	67	0.77 ± 0.01	82	0.82 ± 0.03	80	0.85 ± 0.02	91
Σ27	0.88 ± 0.03	84	1.08 ± 0.08	115	1.33 ± 0.04	129	1.84 ± 0.07	195
Σ34	0.98 ± 0.01	93	1.36 ± 0.08	145	1.56 ± 0.07	152	1.76 ± 0.03	186
Σ42	1.20 ± 0.04	115	1.52 ± 0.14	162	1.51 ± 0.05	147	2.00 ± 0.03	212
Σ59	0.89 ± 0.11	85	1.59 ± 0.03	170	1.57 ± 0.06	153	1.89 ± 0.05	200
Σ68	0.96 ± 0.05	92	1.11 ± 0.03	119	1.44 ± 0.05	140	1.95 ± 0.02	207
Σ76	0.89 ± 0.01	85	0.93 ± 0.01	99	1.09 ± 0.01	106	1.41 ± 0.02	150
Σ88	1.02 ± 0.03	97	1.27 ± 0.08	136	1.59 ± 0.08	154	1.77 ± 0.02	187
Σ94	1.01 ± 0.04	96	1.15 ± 0.04	123	1.44 ± 0.03	140	1.33 ± 0.02	141
Σ99	1.00 ± 0.09	96	1.29 ± 0.01	138	1.35 ± 0.03	132	1.74 ± 0.01	184
Σ112	1.34 ± 0.01	128	1.09 ± 0.07	116	1.75 ± 0.08	170	1.97 ± 0.04	209
Σ118	1.46 ± 0.06	139	1.04 ± 0.02	111	1.31 ± 0.05	128	1.69 ± 0.04	179
Σ123	1.25 ± 0.02	120	1.25 ± 0.02	134	1.54 ± 0.03	150	1.80 ± 0.01	191
Σ142	1.04 ± 0.02	100	0.92 ± 0.02	98	1.29 ± 0.03	125	1.50 ± 0.12	159
Σ148	1.12 ± 0.04	107	1.05 ± 0.01	112	1.46 ± 0.10	142	1.63 ± 0.07	173
Σ154	1.34 ± 0.03	128	1.08 ± 0.04	115	1.74 ± 0.09	169	2.03 ± 0.02	215
Σ167	1.01 ± 0.03	96	1.51 ± 0.04	161	1.13 ± 0.04	110	1.26 ± 0.02	133
Σ179	1.31 ± 0.04	125	1.04 ± 0.06	111	1.23 ± 0.02	120	1.71 ± 0.05	182
Σ189	0.95 ± 0.02	91	1.12 ± 0.04	119	1.65 ± 0.12	161	2.14 ± 0.02	227
Σ195	0.94 ± 0.03	90	1.18 ± 0.02	125	1.61 ± 0.04	157	1.87 ± 0.05	199

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική διάρκεια (5 ημέρες-T5)		Χρονική διάρκεια (10ημέρες-T10)		Χρονική διάρκεια (15ημέρες-T15)		Χρονική διάρκεια (20ημέρες-T20)	
	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος	Χρώμα (A _{525 nm})	% επί του αρχικού χρώματος
Σ204	0.94 ± 0.05	90	1.73 ± 0.10	184	1.83 ± 0.06	178	2.15 ± 0.02	228
Σ212	0.89 ± 0.03	85	1.49 ± 0.02	158	1.47 ± 0.10	143	1.95 ± 0.02	207
Σ219	0.91 ± 0.03	87	2.10 ± 0.04	223	1.33 ± 0.02	129	1.31 ± 0.01	139
Σ226	0.82 ± 0.04	78	1.62 ± 0.02	173	1.37 ± 0.02	133	1.62 ± 0.03	172
Σ231	1.03 ± 0.04	98	1.26 ± 0.15	134	1.65 ± 0.06	161	1.83 ± 0.03	194
Σ242	0.87 ± 0.02	83	0.84 ± 0.02	90	0.94 ± 0.01	91	1.08 ± 0.02	114
Σ247	0.92 ± 0.01	88	1.08 ± 0.02	115	1.13 ± 0.03	110	1.37 ± 0.02	146
Σ253	0.89 ± 0.02	85	1.01 ± 0.02	108	0.99 ± 0.01	97	1.09 ± 0.02	115
Σ268	1.26 ± 0.01	121	1.43 ± 0.02	152	1.49 ± 0.03	145	1.74 ± 0.05	185
Σ276	1.14 ± 0.04	109	1.27 ± 0.02	135	1.45 ± 0.08	141	1.74 ± 0.04	184
Σ278	1.03 ± 0.04	99	1.31 ± 0.01	140	1.48 ± 0.06	144	1.86 ± 0.06	198
Σ279	1.09 ± 0.01	105	1.26 ± 0.03	134	1.46 ± 0.06	142	1.80 ± 0.09	191
Σ285	1.02 ± 0.01	98	1.25 ± 0.08	134	1.52 ± 0.13	147	1.78 ± 0.07	189
Σ286	1.08 ± 0.02	103	1.27 ± 0.07	135	1.48 ± 0.01	144	1.77 ± 0.03	188
Σ288	1.08 ± 0.03	103	1.09 ± 0.04	116	1.40 ± 0.02	137	1.71 ± 0.08	182
Σ292	1.15 ± 0.09	110	1.33 ± 0.03	141	1.55 ± 0.08	151	1.81 ± 0.07	192
Σ295	1.17 ± 0.07	112	1.30 ± 0.03	138	1.54 ± 0.04	150	1.60 ± 0.03	170
Σ302	0.92 ± 0.02	88	1.03 ± 0.00	110	1.02 ± 0.01	99	1.09 ± 0.02	115
Σ303	1.01 ± 0.03	96	1.62 ± 0.02	173	1.38 ± 0.03	135	1.30 ± 0.02	138
Σ316	0.92 ± 0.05	88	1.06 ± 0.15	113	1.16 ± 0.06	113	1.69 ± 0.03	179
Σ318	0.91 ± 0.02	87	1.04 ± 0.04	111	1.60 ± 0.08	155	1.65 ± 0.08	176
Σ329	0.85 ± 0.03	81	1.04 ± 0.03	111	1.04 ± 0.03	101	1.17 ± 0.06	124
Σ332	0.88 ± 0.04	84	1.04 ± 0.01	111	1.01 ± 0.02	98	1.11 ± 0.03	118



Γράφημα 1. Προσδιορισμός του χρώματος ($A_{525 \text{ nm}}$) σε θρεπτικά υποστρώματα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, στα οποία επωάστηκαν τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων για διάστημα 28 ημερών (T20).

3.5.2. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας σε επιλεγμένα στελέχη μυκήτων που αναπτύσσονται σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v

Κατά τη μελέτη του δείκτη βλαστικότητας, χρησιμοποιήθηκαν ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v (στις χρονικές στιγμές T5, T10, T15 και T20), ΥΑΕ αραιώσεως 1:1 (στις χρονικές στιγμές T10 και T15) και ΥΑΕ αραιώσεως 1:4 (στις χρονικές περιόδους T15 και T20). Καμία βλαστικότητα δεν παρατηρήθηκε στα εμβολιασμένα με τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων ΥΑΕ συγκεντρώσεων 100% v/v και ΥΑΕ αραιώσεως 1:1. Αύξηση του δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε μόνο στα ΥΑΕ αραιώσεως 1:4 και για ορισμένα από τα επιλεγμένα στελέχη. Αναλυτικά, τα στελέχη Σ99, Σ112, Σ154, Σ179 και Σ329 παρουσίασαν τη χρονική στιγμή T15 αύξηση της βλαστικότητας κατά περίπου δύο φορές σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ ο δείκτης βλαστικότητας για τα στελέχη αυτά παρέμεινε στα ίδια επίπεδα και κατά τη χρονική στιγμή T20 (Πίνακας 13).

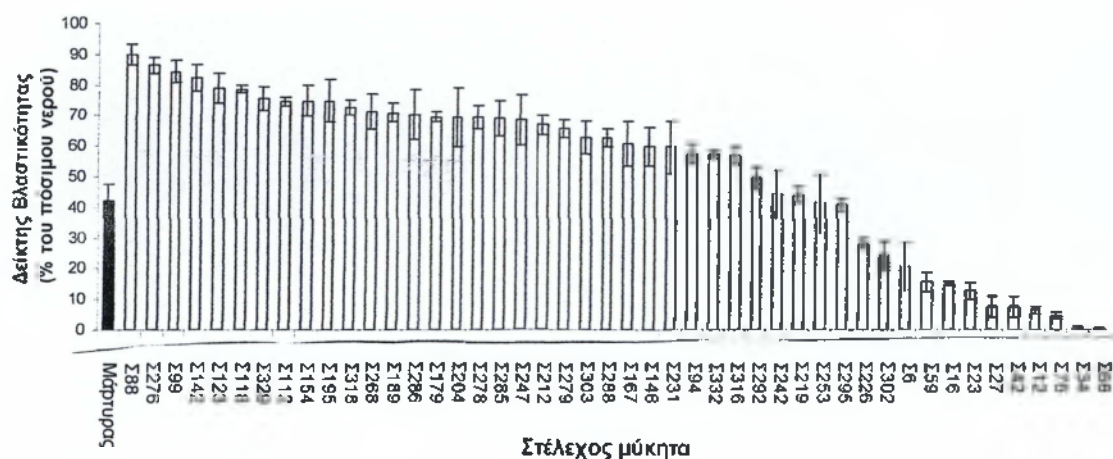
Τα στελέχη Σ189, Σ195, Σ242, Σ292, Σ318 και Σ332, τη χρονική στιγμή T15, προκάλεσαν αύξηση του δείκτη βλαστικότητας κατά περίπου μισή έως ενάμιση φορά, εντούτοις τη χρονική στιγμή T20, αυξήθηκε η φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ κατά 50-100% σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του δείκτη βλαστικότητας τη χρονική στιγμή T15. Βεβαίως, ο δείκτης βλαστικότητας των παραπάνω αυτών στελεχών τη χρονική στιγμή T20 παρέμενε υψηλότερος από εκείνον του μάρτυρα (ΥΑΕ αραιώσεως 1:4) (Γράφημα 4). Τη χρονική στιγμή T20, ένα πλήθος επιλεγμένων στελεχών (Σ88, Σ94, Σ142, Σ167, Σ204, Σ212, Σ231, Σ247, Σ268, Σ276, Σ278, Σ279, Σ285,

Σ286, Σ288, Σ303 και Σ316) προκάλεσαν αύξηση του δείκτη βλαστικότητας ΥΑΕ αραίωσης 1:4 κατά 35-100% σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας κατά την 1:4 αραίωση θρεπτικών υποστρωμάτων ΥΑΕ (συγκέντρωσεως 100% v/v), στα οποία επωάστηκαν τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων.

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική διάρκεια (15ημέρες-T15)		Χρονική διάρκεια (20ημέρες-T20)	
	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	% επί της αρχικής τιμής του Δείκτη Βλαστικότητας	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	% επί της αρχικής τιμής του Δείκτη Βλαστικότητας
Μάρτυρας	32.2 ± 5.5	-	42.4 ± 5.1	-
Σ6	19.2 ± 1.6	60	20.7 ± 7.5	49
Σ12	16.6 ± 4.2	51	6.5 ± 1.2	15
Σ16	15.0 ± 4.2	47	15.0 ± 0.8	35
Σ22	9.3 ± 2.5	29	12.8 ± 2.7	30
Σ27	20.8 ± 8.0	65	7.7 ± 3.3	18
Σ34	0.2 ± 0.1	1	0.7 ± 0.1	2
Σ42	28.3 ± 13.9	88	7.7 ± 3.3	18
Σ59	18.2 ± 6.0	57	15.8 ± 3.1	37
Σ68	1.0 ± 1.0	3	0.4 ± 0.2	1
Σ76	11.8 ± 4.2	37	4.8 ± 0.9	11
Σ88	17.9 ± 4.4	56	89.8 ± 3.3	212
Σ94	8.7 ± 2.3	27	57.4 ± 3.1	135
Σ99	67.3 ± 4.9	209	84.3 ± 3.5	199
Σ112	63.5 ± 4.0	197	74.7 ± 1.4	176
Σ118	46.5 ± 4.0	144	78.5 ± 1.2	185
Σ123	43.4 ± 4.7	135	78.8 ± 4.9	186
Σ142	2.6 ± 1.1	8	82.1 ± 4.4	194
Σ148	4.0 ± 1.6	12	59.6 ± 6.3	141
Σ154	63.4 ± 1.6	197	74.6 ± 5.0	176
Σ167	24.0 ± 5.8	75	60.7 ± 7.1	143
Σ179	61.9 ± 3.4	192	69.4 ± 1.7	164
Σ189	86.3 ± 9.5	268	70.9 ± 3.0	167
Σ195	76.8 ± 4.0	239	74.6 ± 7.0	176
Σ204	23.0 ± 5.5	72	69.3 ± 9.5	163
Σ212	21.0 ± 2.8	65	66.7 ± 3.2	157
Σ219	27.0 ± 4.3	84	43.9 ± 2.6	104
Σ226	9.2 ± 3.5	28	28.1 ± 1.8	66
Σ231	2.3 ± 2.0	7	59.5 ± 8.3	140
Σ242	53.3 ± 5.3	166	44.3 ± 7.8	104
Σ247	7.8 ± 1.8	24	68.4 ± 8.2	161
Σ253	6.1 ± 2.9	19	41.2 ± 9.5	97
Σ268	13.0 ± 4.1	40	71.1 ± 5.9	168

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική διάρκεια (15ημέρες-T15)		Χρονική διάρκεια (20ημέρες-T20)	
	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	% επί της αρχικής τιμής του Δείκτη Βλαστικότητας	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	% επί της αρχικής τιμής του Δείκτη Βλαστικότητας
Σ276	4.7 ± 0.8	15	86.4 ± 2.6	204
Σ278	7.4 ± 2.0	23	69.3 ± 3.9	163
Σ279	2.4 ± 0.7	8	65.3 ± 2.8	154
Σ285	11.6 ± 4.0	36	68.6 ± 5.7	162
Σ286	7.4 ± 2.5	23	70.1 ± 8.1	165
Σ288	10.6 ± 4.3	33	62.4 ± 2.8	147
Σ292	48.6 ± 9.5	151	49.4 ± 3.5	117
Σ295	16.0 ± 0.9	50	40.8 ± 2.2	96
Σ302	12.0 ± 1.5	37	23.9 ± 4.9	56
Σ303	19.3 ± 3.0	60	62.5 ± 5.1	147
Σ316	25.9 ± 3.0	81	56.7 ± 2.8	134
Σ318	81.1 ± 6.5	252	72.7 ± 2.3	171
Σ329	66.4 ± 1.5	206	75.3 ± 3.8	178
Σ332	71.0 ± 7.1	220	57.1 ± 1.4	135



Γράφημα 2. Προσδιορισμός του δείκτη βλαστικότητας κατά την 1:4 αραιώση θρεπτικών υποστρωμάτων ΥΑΕ (συγκεντρώσεως 100% v/v), στα οποία επωάστηκαν τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων για διάστημα 20 ημερών (T20).

3.5.3. Προσδιορισμός μυκηλιακής βιομάζας επιλεγμένων στελεχών μυκήτων που αναπτύσσονται σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v

Κατά τον προσδιορισμό της βιομάζας των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων, παρατηρήθηκε ότι τη μεγαλύτερη μυκηλιακή μάζα παρουσίασαν τα στελέχη Σ22 και Σ231 (0.30 και 0.26 g) αντίστοιχα, ακολουθούμενα από τα στελέχη Σ123, Σ204 και Σ212 των οποίων το βάρος κυμάνθηκε από 0.16 έως 0.20 g (Πίνακας 10). Επίσης πλήθος στελεχών εμφάνισε ικανοποιητική ανάπτυξη (Σ76, Σ112, Σ142, Σ148, Σ154, Σ189, Σ219, Σ226, Σ242, Σ247, Σ253, Σ302, Σ303 και Σ318), υπολογίζοντας τη βιομάζα τους σε 0.10-0.15 g (Πίνακας 12). Τα υπόλοιπα στελέχη μυκήτων παρουσίασαν μικρή μάζα μυκηλίου κατά την ανάπτυξη τους σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Βιομάζα επιλεγμένων στελεχών μυκήτων.

Στέλεχος	Ξηρό βάρος (g)	Στέλεχος	Ξηρό βάρος (g)
Σ6	0.042 ± 0.004	Σ204	0.174 ± 0.006
Σ12	0.028 ± 0.002	Σ212	0.197 ± 0.017
Σ16	0.042 ± 0.002	Σ219	0.113 ± 0.006
Σ22	0.297 ± 0.005	Σ226	0.123 ± 0.007
Σ27	0.023 ± 0.006	Σ231	0.264 ± 0.173
Σ34	0.072 ± 0.008	Σ242	0.103 ± 0.004
Σ42	0.025 ± 0.002	Σ247	0.145 ± 0.003
Σ59	0.053 ± 0.006	Σ253	0.125 ± 0.080
Σ68	0.068 ± 0.002	Σ268	0.032 ± 0.002
Σ76	0.113 ± 0.004	Σ276	0.014 ± 0.002
Σ88	0.067 ± 0.002	Σ278	0.011 ± 0.001
Σ94	0.063 ± 0.001	Σ279	0.026 ± 0.001
Σ99	0.081 ± 0.003	Σ285	0.022 ± 0.002
Σ112	0.148 ± 0.009	Σ286	0.022 ± 0.003
Σ118	0.084 ± 0.001	Σ288	0.015 ± 0.000
Σ123	0.164 ± 0.003	Σ292	0.014 ± 0.005
Σ142	0.102 ± 0.006	Σ295	0.015 ± 0.003
Σ148	0.112 ± 0.003	Σ302	0.113 ± 0.010
Σ154	0.134 ± 0.006	Σ303	0.108 ± 0.002
Σ167	0.096 ± 0.012	Σ316	0.055 ± 0.003
Σ179	0.083 ± 0.001	Σ318	0.124 ± 0.003
Σ189	0.123 ± 0.004	Σ329	0.097 ± 0.004
Σ195	0.063 ± 0.001	Σ332	0.032 ± 0.001

3.5.4. Μέτρηση φαινολικών συστατικών κατά την ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της μείωσης του φαινολικού φορτίου στα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων. Στη μέτρηση T5, τα στελέχη Σ189 και Σ303 προκάλεσαν τη μεγαλύτερη μείωση (περίπου 30%) των φαινολικών συστατικών σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη (Πίνακας 13).

Στη μέτρηση T10, τα στελέχη Σ34 και Σ303 προκάλεσαν μείωση του φαινολικού φορτίου των ΥΑΕ κατά 35%, ενώ το στέλεχος Σ123 εμφάνισε τη μέγιστη μείωση (κατά 41%) των ολικών φαινολικών συστατικών (Πίνακας 13).

Με το πέρας 21 ημερών, τα στελέχη Σ219 και Σ303 προκάλεσαν τη μέγιστη μείωση του φαινολικού φορτίου των ΥΑΕ κατά περίπου 70% σε σχέση με το μάρτυρα, ακολουθούμενα από το στέλεχος Σ123 που προκάλεσε αντίστοιχη μείωση της τάξεως του 50% (Πίνακας 13).

Τη χρονική στιγμή T20, τη μεγαλύτερη μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου προκάλεσαν τα στελέχη Σ219 και Σ303 (μείωση κατά 75%) ακολουθούμενα από τα στελέχη Σ318 και Σ123 που εμφάνισαν μείωση των ολικών φαινολικών κατά 64 και 57% αντίστοιχα. Μικρότερη μείωση, κατά 36-51%, του φαινολικού φορτίου παρατηρήθηκε σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Σ6, Σ34, Σ42, Σ59, Σ68, Σ112, Σ118, Σ154, Σ179, Σ189, Σ195, Σ204 και Σ212 (Πίνακας 13) (Γράφημα 3).

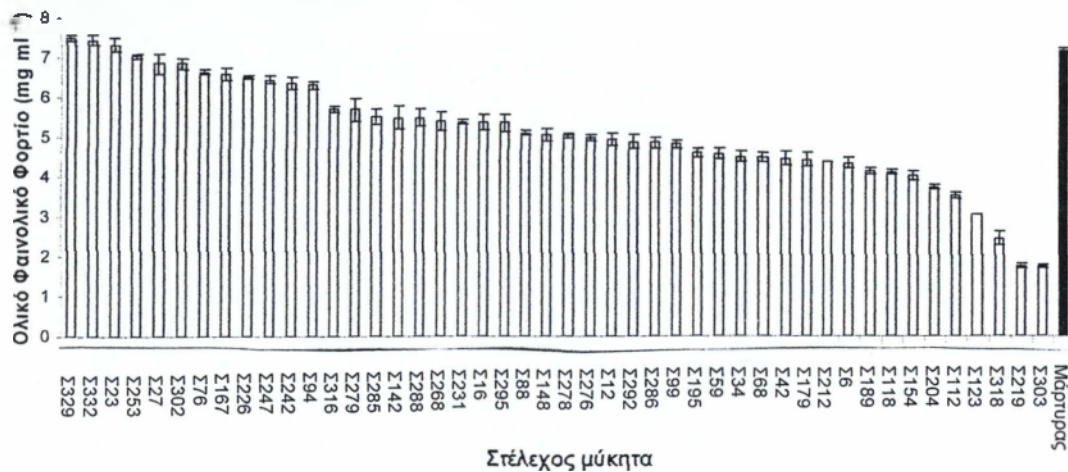
Πίνακας 13. Προσδιορισμός φαινολικού φορτίου των επιλεγμένων στελεχών μυκήτων σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v. Σημειώνεται ότι τα ποσοστά με το πρόσημο (-) αντιστοιχούν σε αύξηση του φαινολικού φορτίου. Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε.

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική περίοδος (5 ημέρες-T5)		Χρονική περίοδος (10 ημέρες-T10)		Χρονική περίοδος (15 ημέρες-T15)		Χρονική περίοδος (20 ημέρες-T20)	
	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου
Μάρτυρας	6.02 ± 0.26	100	6.64 ± 0.08	100	6.67 ± 0.11	100	7.12 ± 0.06	100
Σ6	5.66 ± 0.15	6	5.49 ± 0.09	17	4.49 ± 0.28	33	4.32 ± 0.14	39
Σ12	4.67 ± 0.34	22	5.81 ± 0.21	12	4.54 ± 0.18	32	4.93 ± 0.16	31
Σ16	Δ.Π.	-	5.38 ± 0.18	19	4.54 ± 0.07	32	5.34 ± 0.18	25
Σ22	5.48 ± 0.19	9	5.63 ± 0.17	15	5.11 ± 0.17	23	7.32 ± 0.18	-3
Σ27	5.66 ± 0.18	6	6.32 ± 0.39	5	5.07 ± 0.12	24	6.83 ± 0.26	4
Σ34	6.32 ± 0.08	-5	4.18 ± 0.26	37	4.32 ± 0.17	35	4.47 ± 0.13	37
Σ42	6.53 ± 0.22	-8	4.78 ± 0.31	28	4.26 ± 0.21	36	4.44 ± 0.16	38
Σ59	6.27 ± 0.29	-4	5.40 ± 0.27	19	3.61 ± 0.12	46	4.55 ± 0.14	36
Σ68	5.86 ± 0.35	3	5.97 ± 0.13	10	3.99 ± 0.14	40	4.46 ± 0.10	37
Σ76	6.15 ± 0.11	-2	6.46 ± 0.13	3	4.73 ± 0.32	29	6.63 ± 0.05	7
Σ88	6.14 ± 0.13	-2	6.26 ± 0.31	6	5.98 ± 0.24	10	5.09 ± 0.05	28
Σ94	6.35 ± 0.14	-6	5.62 ± 0.26	15	5.58 ± 0.28	16	6.30 ± 0.10	12
Σ99	Δ.Π.	87	7.05 ± 0.24	-6	5.67 ± 0.11	15	4.80 ± 0.10	33
Σ112	6.04 ± 0.14	0	4.42 ± 0.28	33	5.06 ± 0.11	24	3.50 ± 0.06	51
Σ118	6.02 ± 0.16	0	5.49 ± 0.20	17	5.64 ± 0.08	15	4.09 ± 0.07	43
Σ123	6.22 ± 0.14	-3	3.94 ± 0.02	41	3.44 ± 0.09	48	3.04 ± 0.01	57
Σ142	6.35 ± 0.11	-5	5.69 ± 0.06	14	5.42 ± 0.41	19	5.48 ± 0.29	23
Σ148	5.94 ± 0.08	1	5.57 ± 0.04	16	4.58 ± 0.62	31	5.05 ± 0.16	29
Σ154	6.00 ± 0.07	0	4.84 ± 0.32	27	4.60 ± 0.50	31	3.99 ± 0.12	44
Σ167	6.18 ± 0.11	-3	5.56 ± 0.07	16	6.82 ± 0.29	-2	6.58 ± 0.17	8
Σ179	5.04 ± 0.15	16	5.29 ± 0.50	20	5.86 ± 0.09	12	4.40 ± 0.17	38
Σ189	4.23 ± 0.34	30	4.92 ± 0.25	26	5.26 ± 0.18	21	4.11 ± 0.09	42

Στέλεχος/ Μάρτυρας	Χρονική περίοδος (5 ημέρες-T5)		Χρονική περίοδος (10 ημέρες-T10)		Χρονική περίοδος (15 ημέρες-T15)		Χρονική περίοδος (20 ημέρες-T20)	
	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου	Ολικά Φαινολικά (mg/ml)	% μείωση φαινολικού φορτίου
Σ195	4.85 ± 0.08	19	6.11 ± 0.38	8	5.32 ± 0.08	20	4.59 ± 0.12	36
Σ204	5.57 ± 0.38	8	5.09 ± 0.26	23	4.53 ± 0.16	32	3.70 ± 0.06	48
Σ212	5.80 ± 0.31	4	Δ.Π	53	5.93 ± 0.29	11	4.35 ± 0.01	39
Σ219	5.80 ± 0.13	4	6.15 ± 0.17	7	1.91 ± 0.11	71	1.75 ± 0.04	75
Σ226	5.52 ± 0.44	8	5.96 ± 0.11	10	6.49 ± 0.09	3	6.50 ± 0.05	9
Σ231	5.62 ± 0.17	7	Δ.Π	36	5.58 ± 0.18	16	5.36 ± 0.05	25
Σ242	4.96 ± 0.13	18	7.31 ± 0.16	-10	6.97 ± 0.08	-4	6.36 ± 0.15	11
Σ247	5.63 ± 0.11	7	Δ.Π	24	6.32 ± 0.09	5	6.44 ± 0.11	10
Σ253	5.70 ± 0.01	5	Δ.Π	26	6.01 ± 0.12	10	7.03 ± 0.06	1
Σ268	5.35 ± 0.16	11	4.22 ± 0.05	36	4.85 ± 0.07	27	5.38 ± 0.22	24
Σ276	6.14 ± 0.34	-2	Δ.Π	26	5.50 ± 0.16	17	4.95 ± 0.08	31
Σ278	5.17 ± 0.08	14	Δ.Π	24	6.42 ± 0.46	4	5.02 ± 0.05	29
Σ279	5.40 ± 0.12	10	Δ.Π	27	5.79 ± 0.15	13	5.68 ± 0.28	20
Σ285	4.95 ± 0.14	18	Δ.Π	31	6.12 ± 0.16	8	5.50 ± 0.18	23
Σ286	5.32 ± 0.17	12	5.12 ± 0.33	23	5.66 ± 0.17	15	4.83 ± 0.12	32
Σ288	4.88 ± 0.16	19	Δ.Π	33	6.27 ± 0.19	6	5.48 ± 0.21	23
Σ292	5.66 ± 0.28	6	5.26 ± 0.24	21	5.09 ± 0.22	24	4.86 ± 0.17	32
Σ295	5.50 ± 0.15	9	5.82 ± 0.07	12	5.42 ± 0.19	19	5.33 ± 0.21	25
Σ302	5.10 ± 0.13	15	5.47 ± 0.06	18	5.73 ± 0.16	14	6.83 ± 0.14	4
Σ303	4.28 ± 0.05	29	4.27 ± 0.27	36	2.01 ± 0.10	70	1.74 ± 0.03	76
Σ316	4.54 ± 0.26	25	5.85 ± 0.09	12	5.59 ± 0.08	16	5.69 ± 0.09	20
Σ318	6.35 ± 0.09	-6	6.36 ± 0.06	4	4.61 ± 0.68	31	2.44 ± 0.17	66
Σ329	6.75 ± 0.09	-12	6.88 ± 0.09	-4	6.30 ± 0.27	6	7.51 ± 0.08	-6
Σ332	6.55 ± 0.16	9	6.66 ± 0.17	0	6.48 ± 0.19	3	7.43 ± 0.13	-4

Δ.Π.: Δεν προσδιορίστηκε

Γράφημα 3. Προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου σε θρεπτικά υποστρώματα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, στα οποία επωάστηκαν τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων για διάστημα 20 ημερών (T20).

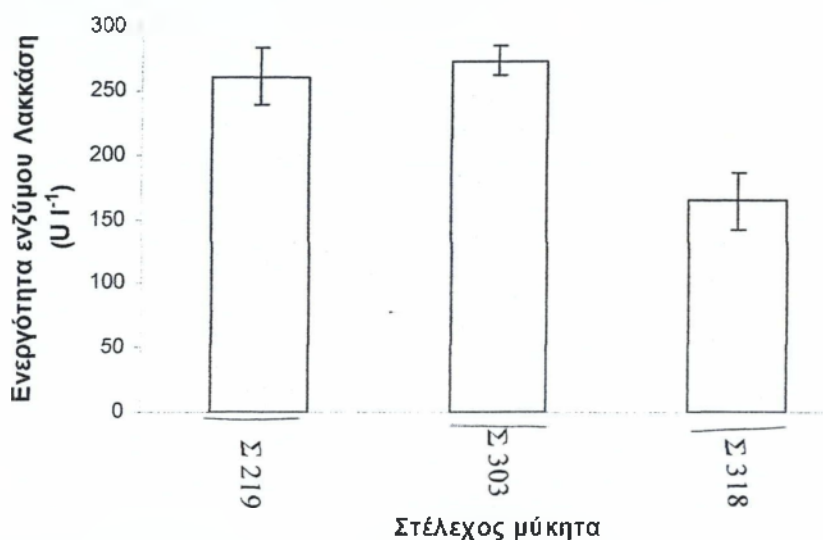


3.5.5. Προσδιορισμός της δράσεως ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση φαινολικών και άλλων συστατικών των ΥΑΕ

Δεν προσδιορίστηκε καμία ενεργότητα των ενζύμων οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης και λιγνίνη υπεροξειδάση στα θρεπτικά υποστρώματα που αναπτύσσονταν τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων. Η δράση των ενζύμων λακκάση, Μn-υπεροξειδάση και Υπεροξειδάση μη εξαρτωμένης του Μn, παρουσιάζονται ακολούθως.

3.5.5.1. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου λακκάση σε υποστρώματα ΥΑΕ στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων

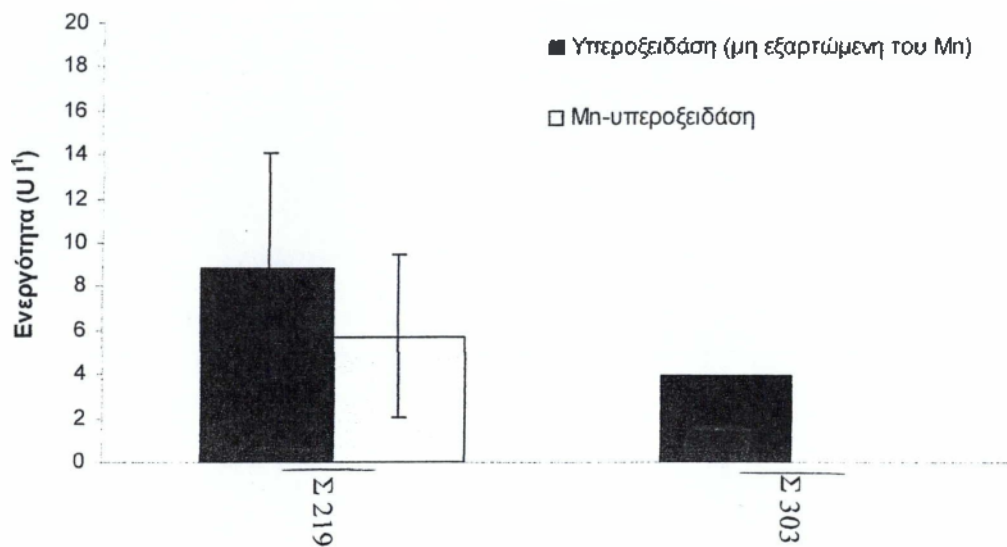
Από τα 46 επιλεγμένα στελέχη μυκήτων, μόνο τα στελέχη Σ219, Σ303 και Σ318 εμφάνισαν δράση του ενζύμου λακκάση, στο θρεπτικό υπόστρωμα των οποίων η ενεργότητα του ενζύμου αυτού ήταν σημαντική και κυμαινόταν από 163 έως 260 $U\ l^{-1}$ (Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Ενεργότητα του ενζύμου λακκάση σε θρεπτικά υποστρώματα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, στα οποία αναπτύχθηκαν τα επιλεγμένα στελέχη Σ219, Σ303 και Σ318.

3.5.5.2. Προσδιορισμός της δράσης των ενζύμων υπεροξειδάση εξαρτωμένη και μη του Μπ σε υποστρώματα ΥΑΕ στα οποία αναπτύσσονταν επιλεγμένα στελέχη μυκήτων

Στο σύνολο των επιλεγμένων στελεχών (46 στελέχη), μόνο τα στελέχη Σ219 και Σ303 παρουσίασαν μικρή δράση ($3.9 - 8.8\ U\ l^{-1}$) του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτωμένη του Μπ), ενώ μόνο στο θρεπτικό υπόστρωμα του στελέχους Σ219 προσδιορίστηκε ενεργότητα του ενζύμου Μπ-υπεροξειδάση (ίση με $5.8\ U\ l^{-1}$) (Γράφημα 5).



Γράφημα 5. Ενεργότητα των ενζύμων υπεροξειδάση εξαρτώμενη και μη του Mn σε θρεπτικά υποστρώματα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, στα οποία αναπτύχθηκαν τα επιλεγμένα στελέχη Σ219, Σ303 και Σ318. Στην περίπτωση του θρεπτικού υποστρώματος του στελέχους Σ303, ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn προσδιορίστηκε σε μια μόνο επανάληψη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων με ελαιόδενδρα τα τελευταία χρόνια, είχε ως επακόλουθο τη μεγαλύτερη παραγωγή υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και ως συνέπεια την όξυνση του προβλήματος από την ρύπανση που προκαλείται στο φυσικό περιβάλλον των ελαιοπαραγωγικών περιοχών.

Είναι λοιπόν αναγκαία για την ύπαρξη μιας αειφόρου γεωργίας η χρήση οικολογικά και οικονομικά αποδεκτών μεθόδων διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που προκύπτουν από την άκριτη εφαρμογή τους σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα.

Όλες οι σχετικές μεθοδολογίες που έχουν εφαρμοστεί μέχρι σήμερα για την διάθεση των ΥΑΕ με ασφάλεια στο περιβάλλον, προκαλώντας λίγες ή καθόλου περιβαλλοντικές οχλήσεις, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι για να γίνει εφικτό αυτό πρέπει να αντιμετωπιστούν τα παρακάτω προβλήματα των ΥΑΕ.

Ο μεγάλος αριθμός και η διασπορά των ελαιουργείων καθώς και η οικογενειακή μορφή της επιχείρησης. Η χαμηλή δυναμικότητα των ελαιοτριβείων σε συνδυασμό με τη μεγάλη χωροταξική διασπορά τους δεν επιτρέπει εύκολες και οικονομικά βιώσιμες λύσεις συγκέντρωσης και από κοινού διαχείρισης των αποβλήτων εκτός ελαχίστων περιπτώσεων. Η άνιση χρονικά κατανομή του τεράστιου όγκου παραγωγής των ΥΑΕ, παράγονται μέσα σε 3-4 χειμερινούς μήνες, και η εύκολη αλλοίωσή τους δεν επιτρέπει μακροχρόνια αποθήκευση.

Το πολύ υψηλό οργανικό φορτίο των ΥΑΕ το οποίο είναι συνυφασμένο με τις μεγάλες απαιτήσεις τους σε οξυγόνο ($BOD_5=100 \text{ Kg/m}^3$, $COD=220 \text{ Kg/m}^3$) για την αποδόμησή τους (Boija *et al.* 1994). Η μεγάλη διακύμανση των τιμών ανάμεσα στο βιολογικά απαιτούμενο και χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD και COD αντίστοιχα) φανερώνει τη δυσκολία αποδόμησης ενός μέρους του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ στο φυσικό περιβάλλον. Οι συνθήκες έλλειψης οξυγόνου που δημιουργούνται σε συνδυασμό με τα θρεπτικά στοιχεία που περιέχουν τα ΥΑΕ στη σύστασή τους εντείνουν το πρόβλημα δημιουργώντας φαινόμενα ευτροφισμού (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 2002).

Ένα άλλο σοβαρό πρόβλημα αποτελούν τα φαινορικά συστατικά των ΥΑΕ. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τη βιοαποδόμηση των ΥΑΕ καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η βιοτοξικότητά τους οφείλεται στη συνεργιστική δράση των φαινολικών ουσιών σε σχέση με τις πρωτεϊνικές ουσίες και τους πολυσακχαρίτες (Moreno *et al.* 1990, Bonari *et al.* 1993, Capasso *et al.* 1995).

Οι σχετικές μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα για την εύρεση λύσεων των παραπάνω προβλημάτων διαχείρισης των ΥΑΕ, παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Εντούτοις πρέπει να επισημάνουμε ότι παρά την μερική επιτυχία ορισμένων βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, το πρόβλημα υφίσταται και είναι φανερό.

Οι ερευνητές κρίνουν αναγκαία μια ολοκληρωμένη αντιμετώπιση, η οποία θα προϋποθέτει τον συνδυασμό μιας σειράς επεμβάσεων σε διαφορετικά επίπεδα. Οι επεμβάσεις αυτές θα πρέπει να αρχίζουν από τον τρόπο καλλιέργειας της ελιάς μειώνοντας τις χημικές εισροές και να ολοκληρώνεται με την παραλαβή των προϊόντων και παραπροϊόντων των ελαιοτριβείων, τα οποία θα προκαλούν όσο το δυνατόν λιγότερες ή και καθόλου περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Balis 1991). Στο τελευταίο αυτό στάδιο επεισέρχεται η βιολογική επεξεργασία της βιοαποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με απλές φυσικοχημικές προεργασίες.

Η χρήση μικροοργανισμών (βακτηρίων και μυκήτων) έχει τη δυνατότητα, όπως έχει αποδειχθεί από τους ερευνητές να μειώσει τη ρυπαντική δράση των ΥΑΕ και να οδηγήσει στην παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως τα εδαφοβελτιωτικά, οι ζωοτροφές, τα εδάδιμα μανιτάρια, κ.λ.π. (Ζερβάκης 1999).

Η διάθεση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων απευθείας στο έδαφος αποτελεί την παλαιότερη μέθοδο διαχείρισης τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος επεξεργασίας βασίζεται στην ικανότητα βιοαποδόμησης που εμφανίζει το έδαφος λόγω φυσικοχημικών και μικροβιολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών και των μικροοργανισμών του εδάφους με τα ΥΑΕ (Cabrerá *et al.* 1996). Παρ' όλα αυτά η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων σε καθαρή καλλιέργεια δε σημαίνει απαραίτητα ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός δύναται να επιβιώσει στο έδαφος παρουσία αποβλήτων και τούτο διότι παρεμβαίνουν και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ δημιουργούν αρνητικό περιβάλλον για αρκετούς μικροοργανισμούς. Επίσης είναι πιθανόν ορισμένα συστατικά του ελαιοκάρπου που λειτουργούν ως φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες, να παραμένουν στα απόβλητα για κάποιο χρονικό διάστημα και να καθιστούν αυτά εκλεκτικά έναντι των διαφόρων μικροβιακών πληθυσμών. Ο φραγμός όμως αυτός δεν μπορεί να ισχύει για πολύ και συγκεκριμένα όταν τα απόβλητα ενσωματώνονται στο έδαφος οπότε ξεκινά μια μακρά πορεία μικροβιακών δραστηριοτήτων (Μπαλής 1994).

Στο πλαίσιο αυτών των δεδομένων διερευνήθηκαν μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να επικρατήσουν σ' ένα έδαφος, που υπόκειται σε μια συνεχή εκλεκτική πίεση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Κατά την πραγμάτωση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση, επιλογή και συγκριτική αξιολόγηση στελεχών μυκήτων, αποσκοπώντας στην επιλογή μικροοργανισμών για

την αποτελεσματικότερη διαχείριση και αποδόμηση των ΥΑΕ. Η αξιολόγηση στηρίχθηκε στη μείωση του φαινολικού τους φορτίου, της φυτοτοξικότητας και στον αποχρωματισμό αυτών. Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση των παραγόμενων ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση, λιγνίνη υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης, στην αποδόμηση των ΥΑΕ.

Από τη μελέτη του μικροβιακού πληθυσμού, η πλειονότητα των απομονωμένων στελεχών μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία επώασης 25°C (μεσόφιλων μυκήτων) καθώς και στο μη-επιλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης Soil Extract και για τις τρεις θερμοκρασίες (περίπου 900 στελέχη). Το γεγονός αυτό, πιθανώς να οφείλεται στο ότι η θερμοκρασία επώασης των απομονωμένων μυκήτων ήταν περίπου ή ίδια με την μέση θερμοκρασία της περιοχής Καλάμι Μεσσηνίας (μεσόφιλη περιοχή) από όπου πήραμε το προς ανάλυση δείγμα εδάφους, καθώς και στο ότι η σύσταση του συγκεκριμένου στερεού υποστρώματος (Soil Extract Agar-SEA) ήταν παρόμοια με αυτή του εδαφικού δείγματος. Όσο για τα εκλεκτικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα CMC και BSS2, όπως είναι αναμενόμενο, ο αριθμός των απομονωμένων στελεχών μυκήτων ήταν πολύ πιο μικρός. Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι η αξιολόγηση του πληθυσμού μυκήτων βασίζεται στη μέτρηση CFU (μέτρηση κυρίως σπορίων) και όχι στον υπολογισμό της μυκηλιακής βιομάζας του δείγματος, γεγονός το οποίο δύναται να οδηγήσει σε απόκλιση του υπολογισμού του πραγματικού πληθυσμού μυκήτων.

Η αξιολόγηση των απομονωμένων στελεχών μυκήτων βασίστηκε στον υπολογισμό της ακτινωτής ανάπτυξης και τη σχετικά μικρή ως μηδαμινή φάση υστέρησης του μυκηλίου. Τα στελέχη Σ219, Σ247, Σ253 και Σ302 παρουσίασαν εκτός της ταχείας ανάπτυξης τους και ικανοποιητικό αποχρωματισμό του στερεού υποστρώματος των ΥΑΕ, ενώ η επιλογή ενός πλήθους δεκατριών στελεχών έγινε βάσει της ικανότητάς τους να αποχρωματίζουν τα ΥΑΕ καθώς και να σχηματίζουν πυκνή μυκηλιακή μάζα.

Η επιλογή του κριτηρίου της ακτινωτής ανάπτυξης, ως το κύριο κριτήριο απορρέει από το γεγονός ότι για να επιτύχουμε ικανοποιητική αποδόμηση με εφαρμογές στην γεωργία, απαιτείται η ικανότητα γρήγορης ανάπτυξης σε ΥΑΕ. Παραδείγματα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις ΥΑΕ και σε σύντομο χρονικό διάστημα είναι ο μύκητας *Aspergillus niger*, καθώς και στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Στη μελέτη των Hambi *et al.* (1991), χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Aspergillus niger* για την βιοαποδόμηση των ΥΑΕ, ο οποίος κατάφερε μείωση του COD και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών σε ποσοστό 61% και 58% αντίστοιχα, ενώ το δε χρώμα των ΥΑΕ έγινε καφέ. Επίσης, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* κατάφερε να μειώσει το COD σε 90 g l⁻¹ σε δείγματα ΥΑΕ μέσα σε χρονικό διάστημα 12 h, ενώ με το πέρας 24 h το COD μειώθηκε επιπλέον σε 30 g l⁻¹ (Scioli & Vollaro 1997). Στελέχη του μύκητα

Penicillium τα οποία είχαν απομονωθεί από σημείο απόρριψης ΥΑΕ, χρησιμοποιήθηκαν από τους Robles *et al.* (2000) έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα τους να μειώνουν το οργανικό φορτίο και τα φαινολικά σε μη αραιωμένα ΥΑΕ, επιτυγχάνοντας τελικά τη μείωση των φαινολικών του αποβλήτου κατά 45% ενώ παράλληλα ανέφεραν ότι η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ μειώθηκε στο ελάχιστο, μετά από την αεροβική επεξεργασία του αποβλήτου για 12 ημέρες με στέλεχος *Penicillium*.

Παρόλο, που ένα πλήθος οκτώ στελεχών μυκήτων (Σ76, Σ219, Σ247, Σ253, Σ302, Σ303, Σ318 και Σ332), προκάλεσε αποχρωματισμό στο στερεό υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, εντούτοις κατά την ανάπτυξή τους σε υγρές καλλιέργειες αντιστοιχών συγκεντρώσεων δεν παρατηρήθηκε αποχρωματισμός. Συγκεκριμένα, κατά τη μέτρηση αποχρωματισμού σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v, παρατηρήθηκε από τα στελέχη μυκήτων αύξηση του χρώματος τους, έως και 128%, σε σχέση με το μάρτυρα, μετά από επώαση 28 ημερών. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε πολυμερισμό των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ, εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού COD στα ΥΑΕ. Σύμφωνα, με τους Thurston 1994 και Minussi *et al.* 2002 η οξειδωση των φαινολικών συστατικών δύναται να οδηγήσουν σε αποπολυμερισμό.

Παρότι, η ανάπτυξη και η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας από πολλά από τα επιλεγμένα στελέχη ήταν ικανοποιητική, εντούτοις δεν παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου από τα περισσότερα εξ'αυτών. Πιθανόν, λόγω του μεταβολισμού του πλήθους σακχάρων και άλλων θρεπτικών συστατικών που περιέχονται σε ΥΑΕ υψηλής συγκεντρώσεως (Gharsallah 1993).

Βάσει των αποτελεσμάτων, τρία στελέχη, τα Σ219, Σ303 και Σ318, κατάφεραν να μειώσουν τα ολικά φαινολικά συστατικά έως και 75%, σε σχέση με αυτά του μάρτυρα μετά από επώαση 28 ημερών. Τα υπόλοιπα στελέχη πέτυχαν μικρότερη μείωση, ενώ άλλα εμφάνισαν αύξηση του ολικού φαινολικού φορτίου. Η παρουσία φάσης υστέρησης οφείλεται στο γεγονός ότι ο οργανισμός για να προσαρμοσθεί (φάση εγκλιματισμού), χρειάζεται συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να αναπτύξει κατάλληλο ενζυμικό σύστημα για την αποδόμηση του ρυπαντικού φορτίου των ΥΑΕ. Επίσης, η ύπαρξη παρεμποδιστικών ουσιών, παρεμποδίζει την ενζυμική λειτουργία (παραγωγή) στα αρχικά στάδια της (Sanjust *et al.* 1991).

Σε μερικές περιπτώσεις στις αρχικές χρονικές στιγμές παρατηρήθηκε μείωση της φυτοτοξικότητας, ενώ μετέπειτα κατά τη χρονική στιγμή T15 ή/και T20 παρατηρήθηκε μικρότερου βαθμού μείωση της φυτοτοξικότητας σε σχέση με το T5 και T10. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιο τοξικών σε σχέση με τα συστατικά του αρχικού υποστρώματος (μη εμβολιασμένα ΥΑΕ), όπως, παραγωγή κινονών και αλδευδών (Carasso *et al.* 1992).

Από ένα πλήθος σαράντα έξι (46) στελεχών μυκήτων μόνο σε τρία (Σ219, Σ303 και Σ318), προσδιορίστηκε δραστηριότητα των ενζύμων λακκάση ή/και Μπ-υπεροξειδάση. Επίσης, τα στελέχη αυτά παρουσίασαν το χαρακτηριστικό να αποχρωματίζουν έντονα τα στερεά υποστρώματα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100% v/v. Η ύπαρξη των ενζύμων αυτών σε συνδυασμό με τον αποχρωματισμό του μέσου ανάπτυξης μπορεί να συνδυασθεί με τη φυλογενετική θέση των τριών αυτών στελεχών που πιθανότατα είναι μύκητες λευκής σήψεως, αφού τα ενζυμικά αυτά συστήματα εκφράζονται κυρίως σε στελέχη αυτής της κατηγορίας μυκήτων. Οι μύκητες λευκής σήψης του γένους *Pleurotus* είναι εκλεκτικοί αποικοδομητές της λιγνίνης, εξαιτίας του ενζυμικού μηχανισμού αποδόμησης των φαινολικών συστατικών που διαθέτουν, μειώνοντας σημαντικά την φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ και προκαλώντας ταυτόχρονα τον αποχρωματισμό τους (Zervakis *et al.* 1996). Επίσης, ο βασιδιομύκητας *Phanerochaete chrysosporium* επώαστηκε επί 12 ημέρες σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 20% v/v, προκάλεσε μείωση του ποσοστού των φαινολικών συστατικών κατά 60%, παράγοντας κύρια λακκάση και ίχνη υπεροξειδάσης (εξαρτώμενης των ιόντων μαγγανίου) (Dias *et al.* 2004). Κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με τους μύκητες *Funalia trogii* και *Coriolus(Trametes) versicolor*, παρατηρήθηκε αυξημένη ενζυμική δράση από το στέλεχος *Funalia trogii* (7.1 U ml^{-1}), ενώ η παραγωγή λακκάσης από τον *Coriolus(Trametes) versicolor* περιορίστηκε στο μισό περίπου της προηγούμενης τιμής (3.4 U ml^{-1}). Συγκεκριμένα ο μύκητας *F. trogii* μείωσε τα φαινολικά συστατικά κατά 93% (Yesilada *et al.* 1996, 1998).

Μελλοντικά πειράματα που θα περιλαμβάνουν ανάλυση δειγμάτων εδάφους επιβαρυμένα με ΥΑΕ κατά την ελαιοκομική περίοδο θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε την προσαρμογή διαφόρων μικροοργανισμών του εδάφους υπό πίεση μεγάλων ποσοτήτων ΥΑΕ.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- **Aggelis GG., Gavala HN., Lyberatos G. (2001)**, Combined and separate aerobic biotreatment of green olive debittering wastewater. *Journal of Agricultural Engineering Research* **80**, 283-292.
- **Aggelis G., Iconomou D. Christou, M., Bokas D., Kotzailias S., 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 process. *Water Research* **37**: 3897-3904.
- **Alba-Mendoza J., Ruiz-Gomez A. and Hidalgo-Casado F. (1990)**, Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices. *Am. Oil Chem. Soc.*, 341-347 (Ed.: Erickson D.R.), Champaign, Illinois (USA).
- **Alburquerque J. A., Gonzalez J., Garcia D. and Cegarra J. (2003)**, Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresourse Technology* **91**, 195-200.
- **Amirante P. (1983)**, Sistema energetico integrato per la depurazione delle acque reflue degli oelifici. II Reunion Comite Technino Valorizacion Subproducto Olivar FAO, Madrid.
- **Andrich G., Balsini S., Zinnai A., Silvestri S. and Fiorentini R. (1992)**, Effect of olive oil waste water irrigation on olive plant products. *Agricoltura Mediterranea* **122**, 97-100.
- **Assas N., Marouani L. and Hamdi M. (2000)**, Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering* **22**, 503-507.
- **Attanasio A., Diano N., Grano V., Sicuranza S., Rossi S., Bencivenga U., Fraconte L., Di Martino S., Canciglia P. and Gustavo M. D. (2005)**, Nonisothermal Bioreactors in the Treatment of Vegetation Waters from Olive Oil: Laccase versus Syringic Acid as Bioremediation Model. *Biotechnol. Prog.* **21**, 806-815.
- **Ayed L., Assas N., Sayadi S. and Hamdi M. (2005)**, Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 7-11.
- **Baldrian P., Zervakis GI., Merhautova V., Ntougias S., Ehaliotis C., Nerud F. (2006)**, The use of hydroxyl-radical-generating systems for the treatment of olive mill wastewaters. *Folia Microbiologica* **51**, 337-341.

- **Balice V. and Cera O. (1984)**, Acid phenolic fraction on the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method. *Grasas y Aceites* **25**, 178-180.
- **Balice V., Carrieri C., Cera O. and Rindone B. (1988)**, The fate of tannin-like compounds from olive mill effluents in biological treatments. *Proc. 6th Symp. on Anaerobic Digestion of Wastewater*, Bologna, Italy, 1988, 275-279.
- **Balis C. (1995)**, Olive mill waste as substrate for nitrogen fixation. In: *Proceedings of the International Symposium on Olive Oil Processes and By-Products Recycling*, (in press), Granada
- **Balis C., Chjatjipavlidis J. and Flouri F. (1991)**, Integrated management of olive oil mills wastewaters. 66-74. In: *Management of olive mills wastes*. Proceedings of International Seminar. Geotechnical Chamber of Greece, Chania, Crete.
- **Banci L., Baffoni S. C., Tien M. (1999)**, Lignin and Mn peroxidase-catalysed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochemistry* **38**, 3205-3210.
- **Bonari E., Marcchia M., and Ceccarini L. (1993)**, The waste waters from olive extraction: their influence on the germinative characteristics of some cultivated and weed species. *Agricoltura Meditanea* **123**, 273-280.
- **Borja R. and Gonzalez A. (1994)**, Comparison of anaerobic filter and anaerobic contact process for olive mill wastewater previously fermented with *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* **29**, 139-144.
- **Borja R., Garrido S. E., Martinez L., Ramos-Cormenzana A. and Martin A. (1993)**, Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry* **28**, 397-404.
- **Borja R., Martin A., Alonso V., Garcia I. and Banks C. J. (1995)**, Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research* **29**, 489-495.
- **Bourbonnais, R., M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier and M. Yaguchi. (1995)**, Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate), in Kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1876-1880.
- **Broach J. R., Pringle J. R. and Jones E. W. (1991)**, The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genome dynamics, protein synthesis and energetics. Gold Spring Harbor Laboratory Press, Gold Spring Harbor, New York.

- **Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiu A., Dupuy de Lome E. and Murillo T.M., (1997),** Land Treatment of Olive Oil Mill Wastewater, άρθρο μέσα στο *International Biodeterioration & Biodegradation* (1996), 215-225, Elsevier Science Ltd, GB.
- **Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiu A., Dupuy de Lome E. and Murillo J. M. (1996),** Land treatment of olive oil mill waste water. *Proc. Olive Oil Processes and By-Products Recycling*; Granada, Spain, Sep. 10-13, 1995. *Int. Biodeterior. & Biodegrad.* **38**, 215-225.
- **Campbell I. and Duffus J. H. (1988),** Yeast. Gold Spring Harbor Laboratory Press, Gold Spring Harbor, New York.
- **Capasso R., Cristinzio G., Evidente A. & Scognamiglio F., (1992),** Isolation spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste water. *Phytochemistry* **31**, 4215-4128.
- **Capasso R., Evidente A., Schino L., Orru G., Marcialis M.A. and Cristinzio G. (1995),** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 393-398.
- **Casa R., D'annibale A., Rieruccetti F., Stazi S. R., Sermani G. G. and Lo Cascio B. (2003),** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* desf.) germinability. *Chemosphere* **50**, 959-966.
- **Cereti C.F., Rossini F., Quaratino D., Vassilev N. and Fenice M. (2004),** Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*Triticum durum* desf.) *Bioresource Technology* **91**, 135-140.
- **Chatjipavlidis I., Antonakou D., Demou D., Flouri F. and Balis C. (1996),** Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plan in Messinia, Greece. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 183-187.
- **Chtourou M., Ammar E., Nasri M. and Medhioud K. (2004),** Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **79**, 869-878.
- **Codounis M., Katsaboxakis K. and Paranicolaou D. (1983),** Progress in the extraction and purification of anthocyanin pigments from the effluents of olive oil extracting plants. *European Federation of Chemical Engineering; Food Working Party; Food Eng. Symp.*, 567-572, 1983, Athens, Greece.
- **Cohen R., Persky L., and Hadar Y. (2002),** Biotechnological applications and potential of wood-degradin mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **58**, 582-594.

- **Crestini C., Jurasek L., and Argyropoulos S. D. (2003)**, On the Mechanism of the Laccase – Mediator System in the Oxidation of Lignin. *J. Chem. Eur.* **9**, 5371-5378.
- **Curi K., Velloglou S. G. and Diyamadoglou V. (1980)**, Treatment of olive production wastes. *Treatm. And Disposal of Liquid and Soil Wastes*, 189-205.
- **D' Annibale A., Casa R., Pieruccetti F., Ricci M. and Marabottini R., (2004a)**, Lentinula edodes removes phenols from olive-mil wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.), germinability. *Chemosphere* **54**, 887-894.
- **D' Annibale, A. Ricci M., Quarantino D. et al. (2004)**, *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* **155**, 596-603.
- **D' Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E. and Sermanni G. G. (1996)**, Substrate specificity and properties of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica* **16**, 257-270.
- **De Dios Perez J., E. Esteban and F. Gallardo Lara (1986)**, Direct and delayed influence of vegetation water on calcium uptake by crops. Int. Symp. On Olive By-products Valor., *Seville-Spain*, 331-339
- **Dias A. A., Bezerra R M. and Pereira A.N. (2004)**, Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* **92**, 7-13.
- **Ehaliotis, C., Zervakis, G., Anoliefo, O., Papadopoulou, K & Kardimaki, A. (2003)**, The capacity of agricultural soils to auto-regulate bioremediation of olive-mill waste water. In *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*, pp. 353-358. Edited by V. Sasek, J.A. Glaser & P. Baveye (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- **Ercoli E. and R. Ertola (1983)**, SPC production from olive black water. *Biotech. Letters* **5**, 457-462.
- **Eriksson K. (1990)**, Biotechnology in the pulp and paper-industry. *Wood Science and Technology* **24**, 79-101.
- **Escolano Bueno A. (1975)**, Tests on removal of waste liquid from olive oil extraction (alpechin), by disposal in ponds or laggons for percolation and evaporation. *Grasas y Aceites* **26**, 387-396.
- **Ettayebi K., Errachidi F., Jamai L., Tahri-Jouti M.A., Sendide K. and Ettayebi M. (2003)**, Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 215-219.

- **Fenice M., Sermanni G. G., Federici F. and D'Annibale A. (2003)**, Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal Biotechnology.*, 100, 77-85.
- **Fiestas Ros de Ursimos, J.A. (1953)**, Estudio del alpechin para su aprovechamiento industrial j. concentracion de los azucres y de las sustancias que se emulsionan y disuelven por tratamiento con oxido de calcio. *Grasas y Aceites* 4, 63-67.
- **Fiestas Ros de Ursimos, J.A. (1961)**, Estudio del alpechin su Aprovechamiento Industrial. V. Cinetica del desarrollo de la levadura «*Torulopsis utilis*» en el alpechin. *Crasas y Aceites* 12, 57-63.
- **Fiestas Ros de Ursimos, J.A. (1966)**, Estudio del alpechin su Aprovechamiento Industrial. VII. Instalacion comercial para la obtencion de levaduras-pienso. *Crasas y Aceites* 17, 41-47.
- **Fiestas Ros de Ursimos, J.A. (1977)**, Depuracion de aguas residuales en las industrias de aceitunas de oliva. *Grasas y Aceites* 28, 113-121.
- **Fiestas Ros De Ursinos J. A. (1986)**, Possibilités of using olive mill waste-water (alpechín), as a fertilizer. *Proc. Int. Symp. On olive by-products valorization*, FAO UNDP (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Seville, Spain, 5-7 March, 1986, 321-330.
- **Fiestas Ros de Ursinos J. A., R. Navarro Gamero and R. Leon Cabello (1982)**, Depuration anaerobia del alpechin como fuente de energia. *Grasas y Aceites*, 265-270.
- **Fiestas Ros De Ursinos, J. A. (1997)**, Depuracion de aguas residuales en las industrias de aceitunas y aceites de oliva. *Grasas y Aceites* 28, 113-121.
- **Filipakopoulou T., Loulakis X., Zorpas A. and Vlyssides A.G.(1999)**, Treatment of waste water from olive industries by Fenton's reactions, pp. 109-113. Department of Chemical Engineering, University of Thessaloniki, Greece.
- **Fleming H.P., W.M. Walter Jr., J.L. Etchells (1973)**, Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *App. Microbiology* 26, 777-782.
- **Flouri F., I. Chatjipavlidis, C. Balis, D. Servis and C. Tjedakis (1990)**, Effect of olive mills wastes on soil fertility. In: *Tratamiento de alpechines*, Cordoba-Spain 31/5-1/6.
- **Fountoulakis M.S., Dokianakis S. N., Kornaros M.E., Aggelis G.G. and Lyberatos G. (2002)**, Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36, 4735-4744.
- **Gams, W. (1960)**, Studium zellulolytischer Bodenpilze mit Hilfe der Zellophanstreifen-Methode and mit Carboxymethyl-Zellulose. *Sydowia* 14, 295-307.

- **Garcia-Barrionuevo A., Moreno E., Quevedo-Sarmiento, Gonzalez-Lopez J. and Ramos Cormezana A. (1992)**, Effect of wastewaters from olive oil mills (alpechin), on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 281-283.
- **Georgacakis D. and Dalis D. (1993)**, Controlled anaerobic digestion of settled olive oil wastewater. *Bioresource Technology Biomass Bioenergy Biowastes Convers. Technol. Biotransform. Prod. Technol.*, **46**, 221-226.
- **Gernjak W., Krutzler T., Glaser A., Malato S., Caceres J., Bauer R. and Fernandez-Alba A. R. (2003)**, Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere* **50**, 71-78.
- **Gharsallah N. (1993)**, Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeasts. *Environmental Technology* **14**, 391-395.
- **González M. D., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J. and Ramos-Cormenzana A. (1990)**, Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenols and fatty acids. *Chemosphere* **20**, 423-432.
- **González-Lopez J., Bellido E. and Benitez C. (1994)**, Reduction of total polyphenols in olive mill wastewater by physico-chemical purification. *Journal Environ. Sci. Health Part A*, **29**, 851-865.
- **Grappelli A., W. Pietrosanti L. Pasetti and A. Carilli (1991)**, Metabolites production during the growth of *Lentinus* species on agricultural waste waters. In: *Science and Cultivation of Edible Fungi (ed. Maher)*, **13**, 717-720. Balkema, Rotterdam.
- **Hamdi M. (1992)**, Toxicity and biodegradability of olive mill waste waters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **37**, 155-163.
- **Hamdi M. (1993)**, Future prospects and constraints of olive oil mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Engineering* **8**, 209-214.
- **Hamdi M. and Garcia, S.L. (1991)**, Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill waste-waters. *Bioresource Technology* **38**, 23-29.
- **Hamdi M. and R. Ellouz, (1992)**, Use of *Aspergillus niger* to improve filtration of olive mill waste-waters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **53**, 195-200.
- **Hammel K.E. (1997)**, Fungal degradation of lignin. In: "Driven by nature plant litter Quality and Decomposition". 33-46, (eds. G. Cadisch and K.E. Giller), CAB International, Wye College, University of London.
- **Hammel KE. & Moen MA. (1991)**, Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **13**, 15-18.

- **Hofrichter M. (2002)**, Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 454-466.
- **Jaouani A., Guillen F., Renninckx M. J., Martinez A.T. and Martinez M. J., (2005)**, Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* **36**, 478-486.
- **Jones C. E., Murphy P. J. and Russell N. J. (2000)**, Diversity and osmoregulatory responses of bacteria isolated from two-phase olive oil extraction waste products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 555-561.
- **Kaal EEJ., Dejong E., Fieff JA. (1993)**, Stikylation of ligninolytic peroxidase-activity by nitrogen nutrients in the white-rot fungus *Bjerkandera sp. strain BOS55*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 4031-4036.
- **Kavroulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S.,Zervakis GI., Papadopoulou KK. (2005)**, Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**, 163-174.
- **Kerem Z., Friesem D., Hadar Y. (1992)**, Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1121-1127.
- **Kersten P. J., Kalyanaraman B., Hammel K. E., Reinhammar B., Kirk T. K. (1990)**, Comparison of lignin peroxidase, horseradish-peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal* **268**, 475-480.
- **Kirk T. K., & Farrell R. L. (1987)**, Enzymatic combustion-the microbial-degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**, 465-505.
- **Kopsidas G. C. (1992)**, Wastewater from the preparation of table olives. *Water Resource* **26**, 629-631.
- **Koutsou M., Mari I., Lasardi K., Chatzipavlidis I., Balis C. & Kyriakou A. (2004)**, The effects of olive oil mill wastewater (OMW), on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology* (in press),
- **Kuan I. C. and Tien M. (1993)**, Stimulation of manganese peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **90**, 1242-1246.
- **Kuwahara M., Glenn JK., Morgan MA., Gold MH. (1984)**, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* **169**, 247-250.

- **Lamia A. and Moktar H. (2003)**, Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 59-65.
- **Logan N. L. (1994)**, Bacterial Systematics. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- **Lopez-Lopez MJ. (1993)**. Produccion de polisacaridos (xantano), por *Xantamonas campestris* utilizando como sustrato alpechin. Tesina. Fac. Farmacia. Univ. de Granada.
- **Martinez J., Perez J., Moreno E. and Ramos-Cormezana A. (1986)**, Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechin en su posible aprovechamiento. *Grasas y Aceites* **37**, 215-223.
- **Martinez Nieto L., A. Ramos-Cormezana, M.P.Garcia Pareja and S.E. Garrido (1992)**, Biodegradacion de compuestos fenolicos del alpechin con *Aspergillus terreus*. *Grasas y Aceites* **43**, 75-81.
- **Martinez-Toledo M. Gonzalez-Lopez J. Rodelas B. Pozo C. Salmeron V. (1995)**, Production of poly-*b*-hydroxybutyrate of *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically-defined medium and alpechin medium. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 413-418
- **Minussi C. R., Pastore M. G., and Dyrán N. (2002)**, Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Techonology* **13**, 205-216.
- **Moreno E., Perez J., Ramos-Cormenzana A. and Martinez J., (1987)**, Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios* **51**, 169-174.
- **Moreno E., Quevedo-Sarmiento J. and Ramos-Cormenzana A. (1990)**, Antibacterial activity of wash water from olive mills. *Encyclopaediae of Environmental Control Technology*, 3 (Chapter 26), 731-736 (Ed.: Cheremisinoff P.N.), Gulf Publications, USA.
- **Morisot A., and J-P. Tournier (1986)**, Repercussions agronomiques de l' epandage d' effluents et dechets de moylins a huile d' olive. *Agronomie* **6**, 235-241.
- **Niaounakis M. and Halvadakis C.P. (2006)**, Olive-mill waste management. *Literature Review and Patent Survey*. Typothito-George Dardanos.
- **Niaounakis, M. and C.P. Halvadakis, "Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey"**, Elsevier Publishers Waste Management Series 5, Second Edition, pp. 498, ISBN -10: 0-08-044851-8, ISBN-13: 978-0-08-044851-0, 2006
- **Ntougias S. (1999)**, Alkaliphilic bacteria from edible olives. PhD thesis, University of London.
- **Ntougias S., Ehaliotis C., Zervakis G. I., Katsaris P. and Papadopoulou K.(2003)**, Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants, pp. 666-673. In: *Proceedings of the 8th International Conference*

on *Environmental Science and Technology*.(T.D. Lekkas, ed.), University of the Aegean and Global NEST, Lemnos, Greece.

- **Ntougias S., Zervakis CL, Kavroulakis N., Ehaliotis C., Papadopoulou KK. (2004)**, Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified Rdna restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. *Systematic and applied microbiology* **27**, 746-754.
- **Ntougias S., Zervakis G., Ehaliotis C., Kavroulakis N., Papadopoulou KK. (2006)**, Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in microbiology* **157**, 376-385.
- **Ntougias S., Ehaliotis C., Papadopoulou KK., Zervakis G. (2006a)**, Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and fertility of soils* **42**, 330-337.
- **Palmer A., Kyu L. S., and Solomon I. E., (2001)**, Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O-O Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6591-6599.
- **Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sanchez-Monedero M.A., Bernel M. P. (1999)**, Characterization of olive mill wastewaters (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* **67**, 111-115.
- **Paredes M.J., Monteoliva-Sanchez M., Moreno E., Perez J., Ramos-Cormezana A. & Martinez J.(1986)**, Effect of wastewaters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere* **15**, 59-664.
- **Paredes M.J., Ramos-Cormezana A. & Martinez J. (1987)**, Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* **16**, 1557-1564.
- **Perez J. D., Esteban E., Gomez M. and Gallardo-Lara F. (1986)**, Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *Journal Envir. Sci., Health Part B*, **21**, 349-357.
- **Perez J., Hernandez M.T., Ramos-Cormenzana A. and Martinez J. (1987)**, Caracterization de fenoles del pigmento del alpechin y transformacion por phanerochaete chrysosporium. *Grasas y Aceites* **38**, 367-371.
- **Perez J., Ramos-Cormenzana A. and Martinez J. (1990)**, Bacteria degrading phenolic acids isolated on polymeric phenolic pigment. *J. of App. Bacteriol.* **69**, 38-42.
- **Perez J.D., and F. Gallardo Lara (1987)**, Effects of the application of wastewater from olive processing on soil nitrogen transformation. *Commun. in Soil Science and Plant Analysis* **18**, 1031-1039.

- **Perez J.D., T.de la Rubia, J. Moreno and J. Martinez (1992)**, Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Envir. Toxicol. And Chemistry* **11**, 489-495.
- **Piotrowska A., Iamarino G., Antonietta R. M., Gianfreda L. (2006)**, Short-term effects of olive mill waste water (OMW), on chemical and biochemical properties of a semirid Mediterranean soil. *Soil Biology & Biochemistry* **38**, 600-610.
- **Platt M.W., Hadar Y., Henis Y., Chet I. (1983)**, Increased degradation of straw by *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **17**, 140-142.
- **Proietti M., Cartechini A. and Tombesi A. (1988)**, Influenza delle acque reflue dei frantoi oleari su olivi in vaso e in campo. *L'informatore Agrario* **45**, 87-91.
- **Ragazzi E. et G. Veronesse (1967)**, Ricerche sui costituenti delle olive. Nota I.: Zuccheri e fenoli. *Ann. chim.*, **57**: pp. 1386-1397
- **Ramos-Cormezana A., (1983)**, Interaccion de microorganismos del suelo con residuos de industria de aceite. *Congreso Latinoamericano de Microbiologia, Sao Paulo*.
- **Ramos-Cormezana A., Monteoliva-Sánchez M. and López M. J. (1995)**, Bioremediation of alpechin. *Int. Biodet. Biodegr.*, **35**, 249-268.
- **Robles A., Lucas R., De Cienfuegos C.A., Galvez A. (2000)**, Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresourse Technology* **74**, 217-221.
- **Robles A., Lucas R., Martínez-Cañamero M., Omar B. N., Pérez R., Gálvez A. (2002)**, Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara (syn. Thielaviopsis), paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 516-522.
- **Rodriguez M. M., J. D. Pérez, A. Ramos-Cormezana and J. Martinez (1988)**, Effect of extract obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J. of App. Bacter.* **64**, 219-226
- **Rodriquez M. M., J. D. Perez, A. Ramos-Cormezana and J. Martinez (1988)**, Effect of extract obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J. of App. Bacter.*, **64**, 219-226.
- **Saiz-Jimenez C., G. Gomez-Alarcon and J. W. Leeuw (1986)**, Chemical properties of polymer isolated in fresh vegetation water and sludge evaporation ponds. *Int. Symp. On Olive By-products Valor., Seville-Spain*, 41-60.
- **Sanjust E., Pompei R., Rescigno A., Rinaldi A. and Ballero M. (1991)**, Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *App. Biochem. and Biotech.* **31**, 223-235.

- **Sayadi S. and R. Ellouz, (1992)**, Decolourization of olive mill waste-waters by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **37**, 813-817.
- **Sayadi S. and R. Ellouz, (1993)**, Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **57**, 141-146.
- **Scioli C. and Vollaro 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., and Aust D. S.(1998)**, Mechanisms for Protection against Inactivation of Manganese Peroxidase by Hydrogen Peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**, 287-295.
- **Shammas N. Kh. (1984)**, Olive oil extraction waste treatment in Lebanon. *Effluent and water Treatment Journal* **24**, 388-392.
- **Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T. E. (1996)**, Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2605.
- **Thorn, R.G., Reddy, C.A., Harris, D. and Paul, E.A. (1996)**, Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4288-4292.
- **Thurston CF. (1994)**, The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26
- **Tomati U. & Galli E. (1992)**, The fertilizing value of wastewater from the olive processing industry. Humus, its structure and role in agriculture and environment. J. Kubat Elsevier Science Publishers B V.
- **Tsiouplas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. (2002)**, Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresousce Technology* **84**, 251-257.
- **Vaccarino C., Lo Curto R., Munao F., Tripodo M. M., Patane R. and Lagana G. (1986)**, Processing of olives: How to treat the wastewater. *AES* **8**, 48-51.
- **Varquez-Roncero A., Janter Del Valle C., Janter Del Valle M.L., (1976)**, Compotentes fenolicos de la aceituna. III. Polifenolie del aceite. *Grassas y Aceites* **27**, 185-191.
- **Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1990)**, Lignin Peroxidase Compound III. Mechanism of formation and decomposition. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2070-2077.
- **Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1991b)**, In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 269-275

- **Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992)**, Manganese (II), oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanisms and role of the chelators. *J. Biol. Chem.* **267**, 23688-23695.
- **Yesilada O. and Fiskin K. (1996)**, Degradation of olive mill waste by *Coriolus versicolor*. *Turkish Journal Biol.*, **20**, 73-79.
- **Yesilada O., Sik S. and Sam M. (1998)**, Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects on agitation, initial cod concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 37-42.
- **Yesilada O., Sik S. and Sam M. (1998)**, Biodegradation of olive oil mill waste-water by and *Funalia trogii*: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 37-42.
- **Zervakis G., Balis C. (1996)**, A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research*.
- **Zervakis G., Balis C. (1996)**, Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass. In: *Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (ed. D. Royse), 311-323. Pennsylvania.
- **Zervakis G., P., Yiatras and C. Balis. (1995)**, Edible mushrooms from olive mill wastes. In: *Proceedings of the International Symposium on Olive Oil Processes and By-Products Recycling*, (in press), Granada.
- **Zoiopoulos P.E. (1983)**, Study on the use of olive by-products in animal feeding in Greece. Animal Production and Health Divisions, FAO, Rome, 1983.
- **Βλυσσίδης Α. (1997)**, Μέθοδος διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων με το σύστημα της ηλεκτρόλυσης. *Επιστήμη και Τεχνολογία* **2**, 46.
- **Βορεάδου Κ. (1994)**, «Υγρά Απόβλητα των Ελαιουργείων-Επιπτώσεις στα Φυσικά Υδάτινα Οικοσυστήματα της Κρήτης-Σημερινή Διαχείριση των Αποβλήτων και Προοπτικές για το Μέλλον», άρθρο μέσα στο ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης, Οργανισμός Ανάπτυξης Σητείας, «Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων-Πρακτικά Διεθνούς Διημερίδας 16-17 Ιουνίου», σελ. 9-14, Σητεία.
- **Ζερβάκης Γ., (1999)**, Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ. *Ελαιοπαραγωγή*, σελ. 98-103.

- **Ζερβάκης Γ., Μπαλής Κ., (1996)**, Υγρά και στερεά απόβλητα ελαιουργείων ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών. *Πρακτικά Συμποσίου «Ελιά-Ελαιόλαδο - Μεσογειακή διατροφή» Καλαμάτα 8-10 Νοεμβρίου 1996*: 192-197.
- **Ισραηλίδης Ι.Κ. και Μ. Ι. Κωδούνη (1982)**, Αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων και παραπροϊόντων για κτηνοτροφές και ενέργεια.. *Γεωργική Έρευνα*, **6**, 243-253.
- **Κουτσαυτάκης Α. και Ε. Στεφανουδάκη (1991)**, Μηχανική επεξεργασία αποβλήτων ελαιοτριβείων με φυγοκεντρικά μηχανήματα. *Διαχείριση Διεθν. Διημ. Σητεία 16-17 Ιουνίου*, 15-18.
- **Κυριτσάκης Α., (1989)**, Το ελαιόλαδο, Β' έκδοση, Θεσσαλονίκη.
- **Μαρίνος Ε. (1991)**, Συμπύκνωση δια λιμνάσεως. *Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων. Πρακτικά Διεθν. Σεμιν. Χανιά 9-10 Μαΐου*, 130-152.
- **Μάτης Κ.Α. (1981)**, Η επίπλευση και η εφαρμογή της στη διεργασία καθαρισμού των βιομηχανικών αποβλήτων. *Χημικά Χρονικά* **46**, 27-35.
- **Μπαλατσούρας Γ. (1986)**, Ελαιόλαδο Σπορέλαια Λίπη, εκδ. Καραμπερόπουλος Α.Ε., Αθήνα.
- **Μπαλής Κ. (1983)**, Μελέτη για το Υπουργείο Γεωργίας "Διάθεση Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείων".
- **Μπαλής Κ. (1989)**, Η δυναμική της αερόβιας επεξεργασίας του κασίγαρου. *Διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείων. Πρακτικά Ημερίδας, 31 Μάρτη Ηράκλειο*, 32-41.
- **Μπαλής Κ., Χατζηπαυλίδης Ι. και Φλούρη Φ. (1994)**, Μικροβιακή αξιοποίηση των λυμάτων των ελαιοτριβείων σε συστήματα δέσμευσης μοριακού αζώτου και η βελτιωτική τους δράση στη donκότητα των εδαφών. *Διημερίδα Μεσογειακών Ελαιοπαραγωγών Πόλεων, Καλαμάτα*.
- **Μπαλής Κ., Χατζηπαυλίδης Ι. και Φλούρη Φ., (1991)**, Ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, άρθρο μέσα στο ΓΕΩΤΕΕ-Παράρτημα Κρήτης, ΔΣΕ, 'Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων-Πρακτικά Διεθνούς Σεμιναρίου, 9-10 Μαΐου 1991', Χανιά, 66-74.
- **Νταλής Δ., (1988)**, Η ρύπανση του περιβάλλοντος και το πρόβλημα των αποβλήτων ελαιουργείων. Η αερόβια επεξεργασία τους. *Πρακτικά Επιστημονικής Συνάντησης «Οι ελαιώνες του Αιγαίου», Μυτιλήνη*, 397-399 .
- **Οιχαλιώτης Κ. Δ. και Ζερβάκης Γ. (1999-2000)**, Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. *Ελιά και ελαιόλαδο* **14**, 6-16 και 52-61.

- **Οιχαλιώτης Κ. Δ. και Ζερβάκης Γ. (2002)**, Η διαχείριση των «αποβλήτων» των ελαιουργείων. Η φύση του προβλήματος και η «περιφρονημένη» λύση της φερτάρδευσης. *Ελιά & Ελαιόλαδο* 28, 62-66.
- **Φλουρή Φ., Ι. Χατζηπαυλίδης, Κ. Μπαλής Δ. Σέρβης και Κ. Τζεράκης (1988)**, Εφαρμογή υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στο έδαφος. *Οι Ελαιώνες του Αιγαίου. Πρακτικά Επιστημονικού Συνεδρίου 25-27 Φεβρουαρίου*, 375-396.
- **Χατζηπαυλίδης Ι., Δ. Κούμας, Δ. Δήμου και Κ. Μπαλής (1986)**, Μελέτη και εισήγηση μέτρων αντιμετώπισης προβλημάτων ρύπανσης περιβάλλοντος από τα ελαιουργεία (4^η έκθεση προόδου), Ερευνητικό Πρόγραμμα Υπουργείου Γεωργίας.