

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ
ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

Σοφία Μπόφτση

Καλαμάτα 2004

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ
ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

Σοφία Μπόφτση

Εισηγητές: Δρ Ντούγιας Σπυρίδων
Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα

Καλαμάτα 2004

*Αφιερωμένη
στους γονείς μου και τον αδερφό μου.*

Αντί προλόγου

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

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ Ζερβάκη Γεώργιο, Διευθυντή του Ινστιτούτου Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, για την διάθεση των αναλώσιμων και των εργαστηριακών χώρων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Παπαδέλλη Μαρίνα, Καθηγήτρια Εφαρμογών του ΤΕΙ Καλαμάτας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και να διεξάγω την παρούσα πτυχιική εργασία στο Ινστιτούτο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Καλαμάτας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μαρία και Νικόλαο και τον αδερφό μου, Χρήστο (Τάκη) για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη. Μαμά, σε ευχαριστώ για την τεράστια υπομονή σου, την χωρίς όρους αγάπη σου και την ιδιαίτερη ικανότητά σου να με ανέχεσαι. Μπαμπά, σε ευχαριστώ που συνεχώς με εμπυχώνεις και με βοηθάς να ξεχνώ όλα μου τα προβλήματα. Τάκη, ό,τι και να πω για σένα είναι λίγο. Ήσουν, είσαι και θα είσαι πάντα το στήριγμα μου.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και επιλογή μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομούν τόσο τα στερεά όσο και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή φυτοτοξική και αντιμικροβιακή δράση. Για την απομόνωση στελεχών βακτηρίων και μυκήτων (συμπεριλαμβανόμενων και ζυμών), ικανών να αναπτύσσονται σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιουργείων και ένα στερεό απόβλητο ελαιουργείου δύο φάσεων (alpeorujo).

Μετά τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση εκατό δεκαεννέα στελεχών μικροοργανισμών, τα οποία μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποικοδομούν τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Επιλέχθηκαν τέσσερα, πέντε και δεκαεννέα στελέχη ζυμών, βακτηρίων και μυκήτων (εκτός μέλη της *Saccharomycotina*) αντίστοιχα, τα οποία είχαν την ικανότητα να αποικοδομούν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

Βάση των αποτελεσμάτων των μεταβολών των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ, παρατηρήθηκε ότι τα όλα τα επιλεγμένα στελέχη έχουν την ικανότητα σημαντικής αύξησης της βλαστικότητας, και μείωσης του φαινολικού φορτίου και του χρώματος. Μερικά από τα επιλεγμένα στελέχη αύξαναν την βλαστικότητα κατά δεκατρείς έως δεκαεπτά φορές, μείωναν το ολικό φαινολικό φορτίο κατά 25 έως 43%, ενώ κάποιες από τις επιλεγμένες απομονώσεις προκαλούσαν αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων κατά 35 έως 55%.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του φαινολικού φορτίου και της βλαστικότητας, εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της μείωσης του φαινολικού φορτίου με την αύξηση της βλαστικότητας των ΥΑΕ.

Όλα τα επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών έδωσαν θετική αντίδραση καταλάσης. Τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητα τους να διασπούν λιπαρές ουσίες και να μεταβολίζουν φαινολικά συστατικά ως την μοναδική πηγή άνθρακα. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA πραγματοποιήθηκε για τα βακτηριακά στελέχη, με σκοπό την εύρεση της αλληλουχίας βάσεων και τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τους θέσης.

Abstract

The aim of this project was the isolation and screening of microbes, capable to bioremediate both soil and liquid wastes, which are produced from the olive oil extraction process and possessed high level of biotoxicity. Both liquid and soil waste samples were used in order to isolate bacterial and fungal strains.

After the estimation of microbial population in these wastes, one hundred and nineteen microbial strains were isolated and examined on the basis of their ability to degradate the waste-water of the olive oil process. Twenty eight bacterial and fungal isolates showed the ability to bioremediate the olive oil by-products.

The selected isolates could increase seed germination, reduce phenolics and achieve decolorization. Some of the selected isolates could increase seed germination by thirteen to seventeen times, could decrease phenolic charge by 25 to 43% and cause decolorization of approximately 35 to 55%. Based on our results, no correlation between decrease in polyphenolic content and simultaneously increase in germination index was observed.

All strains tested gave a positive catalase reaction. Lipolytic activity and utilization of phenolic compounds as the only carbon and energy source were also investigated. Amplification of 16S rDNA gene was performed for bacterial strains in order to reveal their sequences and their actual phylogenetic positions.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΥΑΕ: υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

BOD: Biological Oxygen Demand (βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο).

COD: Chemical Oxygen Demand (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο).

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

G-old: υγρό απόβλητο από τους Γαργαλιάνους που παρελήφθη τον Νοέμβρη του 2003.

FWW: στερεό απόβλητο πάστας από την Κρήτη.

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

bp: βάσεις DNA.

rpm: περιστροφή ανά λεπτό.

TAE: Tris-HCl-Acetic acid-EDTA.

CTAB: Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

TE: Tris_HCl-EDTA.

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

EC: αγωγιμότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Αντί προλόγου</i>	I
Περίληψη	II
Abstract.....	III
Συνομογραφίες.....	IV
Περιεχόμενα	V
Περιεχόμενα Πινάκων	VIII
Περιεχόμενα Εικόνων.....	IX
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.1. Απόβλητα ελαιοτριβείων.....	1
1.1.1. Τύποι ελαιοτριβείων.	1
1.1.2. Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.....	2
1.1.3. Παραγόμενες ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.	3
1.1.4. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.	3
1.1.5. Τοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	4
1.1.6. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	5
1.1.6.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι.....	5
1.1.6.2. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.	7
1.1.6.3. Ελαιοτριβεία δύο φάσεων.	10
1.1.6.4. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες.	11
1.1.6.5. Συνεπεξεργασία με πυρηνόξυλο.	11
1.1.7. Χρήσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	12
1.1.7.1. Απομόνωση φαινολικών συστατικών.	12
1.1.7.2. Παραγωγή μεθανίου.....	13
1.1.7.3. Καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών.....	13
1.1.7.4. Ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων για την παραγωγή πρωτεϊνών.....	14
1.1.7.5. Λίπανση καλλιεργειών με ΥΑΕ.	14
1.1.7.6. Καταπολέμηση ασθενειών φυτών.....	15
1.2. Μηχανισμός διάσπασης φαινολικών συστατικών.....	15
1.2.1. Αερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.	15

1.2.2. Αναερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.	17
1.2.3. Δράση του ενζύμου λακκάση.	18
1.3. Στοιχεία μοριακής βιολογίας.	19
1.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	19
1.3.2. Εύρεση αλληλουχίας βάσεων DNA.	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	21
2.1. Δείγματα.	21
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα.	21
2.2.1. Υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα με ΥΑΕ.	21
2.2.2. Παρασκευή Nutrient Broth (NB) και Nutrient Agar (NA).	22
2.2.3. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA).	23
2.3. Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας και απομόνωση μικροοργανισμών με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.	24
2.3.1. Συνθήκες αποθήκευσης των προς ανάλυση δειγμάτων.	24
2.3.2. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.	24
2.3.3. Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού και απομόνωση βακτηρίων/ζυμών και μυκήτων.	26
2.3.4. Διατήρηση απομονώσεων βακτηρίων και μυκήτων.	26
2.3.5. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου.	27
2.3.6. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών: Μέθοδος Folin-Ciocalteu.	27
2.3.7. Μέτρηση απορρόφησης-Μελέτη αποχρωματισμού.	38
2.3.8. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας (Zucconi <i>et al.</i> , 1981).	29
2.3.9. Μέτρηση pH.	30
2.3.10. Μέτρηση αγωγιμότητας.	30
2.3.11. Αντίδραση καταλάσης.	30
2.3.12. Μικροσκοπική παρατήρηση-Χρώση Gram.	30
2.3.13. Μελέτη της ανάπτυξης κυττάρων βακτηρίων και ζυμών σε φαινολικά συστατικά και Tween 20.	31
2.4. Εξαγωγή γονιδιακού DNA.	31
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	33
2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1. Μέτρηση του pH και της αγωγιμότητας των προς ανάλυση δειγμάτων.	38

3.2. Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου.....	38
3.3. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με την χρήση βακτηρίων/ζυμών...	40
3.4. Μελέτη φυσιολογικών και χημειοταξινομικών χαρακτηριστικών.....	42
3.5. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA	43
3.6. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με την χρήση μυκήτων.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ	55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
4.1. Συζήτηση	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Προέλευση και ημερομηνία παραλαβής των προς ανάλυση δειγμάτων.	21
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των δειγμάτων.	38
Πίνακας 3. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα GAR.	39
Πίνακας 4. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα G-old.	39
Πίνακας 5. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα FWW.	39
Πίνακας 6. Φυσιολογικά και χημειοταξινομικά χαρακτηριστικά βακτηρίων και ζυμών	43
Πίνακας 7. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα G-old.	45
Πίνακας 8. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα GAR.	46
Πίνακας 9. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα FWW.	47
Πίνακας 10. Κατηγορίες των απομονωθέντων βακτηρίων/ζυμών, βάση των μεταβολών που προκάλεσαν στα ΥΑΕ.	48
Πίνακας 11. Βιοαποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση των επιλεγμένων βακτηρίων/ζυμών.	48
Πίνακας 12. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα FWW.	51
Πίνακας 13. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα G-old.	52
Πίνακας 14. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα GAR.	53
Πίνακας 15. Κατηγορίες των απομονωθέντων μυκήτων, βάση των μεταβολών που προκάλεσαν στα ΥΑΕ.	53
Πίνακας 16. Βιοαποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση των επιλεγμένων μυκήτων.	54

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. <i>o</i> - Διάσπαση της κατεχόλης.	16
Εικόνα 2. <i>m</i> - Διάσπαση της κατεχόλης.	16
Εικόνα 3. Αναερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.	17
Εικόνα 4. Αντιδράσεις φαινολικών ριζών-Μηχανισμός δράσεως λακκάσης.....	18
Εικόνα 5. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA τριών στελεχών βακτηριών.	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1. Απόβλητα ελαιοτριβείων.

1.1.1. Τύποι ελαιοτριβείων.

Η επεξεργασία του ελαιοκάρπου και η παραγωγή ελαιολάδου είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους ελαιοτριβείων, στα κλασσικά-παραδοσιακά, στα φυγοκεντρικά και στα μεικτά. Τα βασικά στάδια της μεθόδου εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, δηλαδή το σπάσιμο του καρπού και η μάλαξη της ελαιοζύμης, είναι ίδια και για τους τρεις τύπους ελαιοτριβείων. Εντούτοις, ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη επιτυγχάνεται με διαφορετικό τρόπο σε καθένα από τους τρεις τύπους ελαιοτριβείων.

Μετά την μάλαξη, στα κλασσικά-παραδοσιακά ελαιοτριβεία η ελαιοζύμη τροφοδοτείται σε ένα υδραυλικό πιεστήριο. Με την πίεση που ασκείται επιτυγχάνεται διαχωρισμός του γαλακτώματος ελαίου και νερού (χυμώδης φάση) από τα στερεά συστατικά (ελαιοπυρήνας). Κατόπιν, το γαλάκτωμα ελαίου-νερού οδηγείται σε κάθετο διαχωριστήρα για την τελική παραλαβή του ελαιολάδου (Hamdi, 1992).

Η παραγωγή ελαιολάδου με τον παραδοσιακό τρόπο έχει σχεδόν αντικατασταθεί, σε μεγάλο ποσοστό από τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων στα οποία, μετά την μάλαξη της ελαιοζύμης, λαμβάνει χώρα φυγοκέντριση δύο σταδίων. Αρχικά, η ελαιοζύμη αραιώνεται με νερό και έπειτα τροφοδοτείται σε έναν οριζόντιας διάταξης φυγοκεντρική, ο οποίος χρησιμοποιείται για τον πρώτο διαχωρισμό του κλάσματος του ελαίου από την ελαιοπυρήνα και το νερό. Κατόπιν, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντριση του ελαίου σε κάθετο φυγοκεντρική για την παραλαβή του καθαρού ελαιολάδου (Bořja *et al.*, 1995).

Στα μεικτού τύπου ελαιοτριβεία η παραλαβή του ελαιολάδου επιτυγχάνεται με την μέθοδο της αποστάλαξης, η οποία βασίζεται στην διαφορά της επιφανειακής τάσης μεταξύ χάλυβα-φυτικών υγρών και χάλυβα-ελαίου. Η ελαιοζύμη, μετά την μάλαξη, τροφοδοτείται στον ελαιοδιαχωριστήρα ο οποίος φέρει χαλύβδινα πλακίδια. Το λάδι λόγω μεγαλύτερης συνάφειας με το χάλυβα διαβρέχει την επιφάνεια των πλακιδίων και απορρέει, ενώ τα φυτικά

υγρά λόγω μικρότερης συνάφειας με το χάλυβα σχηματίζουν μεγάλες σταγόνες οι οποίες είναι αδύνατο να διηθηθούν. Το έλαιο αυτό φυγοκεντρείται, παραλαμβάνοντας το τελικό καθαρό ελαιόλαδο.

Εκτός από τους τύπους ελαιουργείων που αναφέρθηκαν, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και ένας νέος τύπος φυγοκεντρητή δύο φάσεων, ο οποίος δίνει τα υγρά του καρπού μαζί με τον ελαιοπυρήνα. Στον τύπο αυτό των ελαιουργείων η παραγωγή των ΥΑΕ είναι αρκετά μικρότερη από αυτή των υπολοίπων.

1.1.2. Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.

Η διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου δίνει συνήθως μία λιπαρή φάση (20%), ένα στερεό υπόλειμμα (30%) και μία υδάτινη φάση (50%), η οποία αποτελείται από το νερό που περιέχεται στον ελαιοκάρπο κατά την φυσική του κατάσταση και από το νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά το πλύσιμο και την επεξεργασία των ελαιοκάρπων. Η υδάτινη αυτή φάση αποτελεί τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) (Botja *et al.*, 1993: 1995). Μικρά τεμαχίδια οργανικών ιστών του ελαιοκάρπου και ένα σταθερό γαλάκτωμα ελαίου περιέχονται επίσης στην σύσταση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Botja *et al.*, 1995).

Η χημική σύσταση των ΥΑΕ ποικίλει εξαιρετικά μεταξύ διαφόρων ελαιοτριβείων, από περιοχή σε περιοχή, και από χώρα σε χώρα, γεγονός που οφείλεται στην εφαρμοζόμενη επεξεργασία παραγωγής ελαιολάδου (Botja *et al.*, 1993), την ποιότητα του νερού, την περίοδο συγκομιδής, την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκάρπου (Gharsallah, 1993). Τα ΥΑΕ μπορούν να χαρακτηριστούν ως ένα σκουρόχρωμο, θολό με χαρακτηριστική οσμή υγρό (Martinez *et al.*, 1986: Moreno *et al.*, 1987) του οποίου η τιμή του pH κυμαίνεται από 4 έως 6 και περιέχει στην σύνθεσή του περίπου 10% οργανικό φορτίο, του οποίου τα σημαντικότερα (ποιοτικώς) συστατικά είναι οι πολυφαινόλες (Ragazzi *et al.*, 1967: Moreno *et al.*, 1987), κάποιες ποσότητες φλαβονοειδών, οργανικών οξέων και αρκετών ανόργανων στοιχείων, όπως π.χ. άλατα καλίου, ασβεστίου και νατρίου (Moreno *et al.*, 1987). Εκτός των συστατικών που αναφέρθηκαν, το οργανικό κλάσμα των ΥΑΕ αποτελείται και από σάκχαρα, ταννίνες, πολυαλκοόλες, πηκτίνες και λιπίδια (Hamdi, 1993: Yesilada *et al.*, 1998).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η μεγάλη συγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών, συμβάλλει στην αντιμικροβιακή και φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ (Perez *et al.*, 1986: Rodriguez *et al.*, 1988: Gonzalez *et al.*, 1990: Yesilada *et al.*, 1998: Hamdi *et al.*, 1993).

1.1.3. Παραγόμενες ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Ο όγκος των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε εθνικό και διεθνές επίπεδο είναι τεράστιος (Μπαλατσούρας, 1986). Στις ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου, η παραγωγή των ΥΑΕ υπολογίζεται περίπου στα 30 εκατομμύρια κυβικά μέτρα κάθε χρόνο (Bozja *et al.*, 1995). Σημαντικότερο πρόβλημα αντιμετωπίζουν οι τρεις κυριότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογειακής λεκάνης, η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα (Tomati *et al.*, 1990), οι οποίες καλύπτουν περίπου το 78% της Παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (Fedeli, 1977).

Πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι παράγονται 1.5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων και 400.000 τόνοι στερεών υπολειμμάτων-παραπροϊόντων ετησίως (Οιχαλιώτης *et al.*, 1999).

1.1.4. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιβακτηριακή δραστηριότητα, η οποία οφείλεται μερικώς στην παρουσία κάποιων φαινολικών συστατικών στην σύνθεσή τους (De Caro *et al.*, 1959; Ragazzi *et al.*, 1967; Sorlini *et al.*, 1986; Rodriguez *et al.*, 1988; Bozja *et al.*, 1990), όπως της πυροκατεχίνης, της τυροσόλης, του πρωτοκατεχικού και καφεϊκού οξέος, τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών (Ragazzi *et al.*, 1967; Gonzalez *et al.*, 1990). Στην ίδια διαπίστωση οδηγήθηκε και ο Gonzalez και οι συνεργάτες του (1990) στην προσπάθεια καθορισμού της φύσης των συστατικών, στα οποία οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ. Στην μελέτη αυτή ερευνήθηκε η ανασταλτική δράση των αποβλήτων και των φαινολικών οξέων που είναι δυνατό να βρεθούν στην σύνθεση των ΥΑΕ. Το βακτήριο του εδάφους *Bacillus megaterium* ATCC 33085 και άλλα βακτήρια που απομονώθηκαν, από μολυσμένο και μη μολυσμένο με απόβλητα χόμα, χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της βιοτοξικότητας. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε η ανασταλτική δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου κατά της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Gonzalez *et al.*, 1990).

Επίσης τα λιπαρά οξέα λινολενικό, λαυρικό, λινελαϊκό και μυριστικό είναι δυνατόν να επιτύχουν αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus megaterium* ATCC 33085. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ύπαρξη ενός μικρού ποσοστού (σε μέση τιμή περίπου 0.5%) γαλακτωματοποιημένου ελαίου στην σύνθεση των αποβλήτων, οδήγησε τον Gonzalez

και τους συνεργάτες του (1990) στο συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ ίσως να οφείλεται στην συνεργιστική δράση φαινολικών και λιπαρών συστατικών.

1.1.5. Τοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ρυπογόνος και φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ οφείλεται στο μεγάλο οργανικό τους φορτίο, και κυρίως στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων φαινολικών συστατικών και λιπαρών οξέων (Caraso *et al.*, 1991; Bonari *et al.*, 1993; Aliota *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2003).

Στην παραπάνω διαπίστωση οδήγησαν οι υψηλές τιμές του BOD των ΥΑΕ. Το BOD (Biological Oxygen Demand=Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο) είναι ένα μέτρο μέτρησης της 'οργανικής' μόλυνσης και εκφράζει την ποσότητα σε βάρος του διαλυμένου οξυγόνου που απαιτείται για να διασπαστούν από μικροοργανισμούς οι βιοαποικοδομήσιμες οργανικές ουσίες συγκεκριμένου όγκου δείγματος. Για τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, η τιμή του BOD είναι περίπου 100 Kg/m^3 (Balice *et al.*, 1982; Borja *et al.*, 1994).

Λόγω του γεγονότος ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ είναι μη βιοαποικοδομήσιμο είναι απαραίτητη και η μέτρηση του COD (Kopsidas, 1994). Το COD (Chemical Oxygen Demand=Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο) μετρά το οξυγόνο που χρειάζεται για την οξείδωση της οργανικής ύλης, που περιέχεται σε ένα δείγμα, από ένα ισχυρό χημικό οξειδωτικό. Για τα ΥΑΕ η τιμή του COD κυμαίνεται περίπου στα 220 Kg/m^3 (Balice *et al.*, 1982; Borja *et al.*, 1994).

Η παρεμποδιστική επίδραση των ΥΑΕ στην βλάστηση των σπόρων διαρκεί συνήθως 2-3 μήνες ενώ ο βαθμός τοξικότητας στα φυτά εξαρτάται από την καλλιέργεια και το στάδιο ανάπτυξής τους, εντούτοις δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική φυτοτοξική δράση σε δέντρα όταν είχαν λιπανθεί με μικρές ποσότητες ΥΑΕ (Krogmeier *et al.*, 1989; Casa *et al.*, 2003).

Επίσης η διοχέτευση ανεπεξέργαστων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε υδάτινους αποδέκτες (χειμάρρους, θάλασσα, λίμνες) δημιουργεί εύκολα συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, οι οποίες είναι καταστροφικές για τους περισσότερους οργανισμούς. Συγκεκριμένα η τοξική επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε διάφορα είδη κυπρίνων έχει αποδειχθεί (Fiestas, 1977), ενώ έχει αναφερθεί ότι πολλά συστατικά των ΥΑΕ είναι τοξικά για τα ψάρια και άλλες μορφές ζωής στο νερό (Balice *et al.*, 1984).

1.1.6. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Οι δυσκολίες και το υψηλό κόστος της διαχείρισης των υγρών αποβλήτων (Andrich *et al.*, 1992) της βιομηχανίας ελαιολάδου και εδάδιμων ελιών, εξακολουθούν να ταλανίζουν όλες τις ελαιοπαραγωγικές χώρες.

Μολονότι τα τελευταία 20 χρόνια, έχουν γίνει πολλές μελέτες για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Cereti *et al.*, 2004), παρόλα αυτά η μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, η υψηλή αλατότητα και το βαρύ οργανικό, βιοαποικοδομήσιμο ή μη, φορτίο (COD και BOD) (Hamdi, 1993: Dias *et al.*, 2004) δεν επέτρεψαν την εξεύρεση μίας αποτελεσματικής λύσης.

Η μελέτη και η ανάπτυξη μεθόδων διαχείρισης των ΥΑΕ δυσχεραίνονται ακόμη περισσότερο λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ΥΑΕ (Gharsallah, 1993).

Εκτός των προβλημάτων που δημιουργούνται λόγω της φυσικοχημικής σύνθεσης των ΥΑΕ, υπάρχουν και άλλα που αφορούν i) την ύπαρξη μη ικανοποιητικού συλλεκτικού συστήματος ii) την τεχνοοικονομική δομή των ελαιοτριβείων iii) το διάσπαρτο της γεωγραφικής κατανομής τους (Kopsidas, 1994) και iv) την μεγάλη παραγόμενη ποσότητα (Οιχαλιώτης *et al.*, 1999).

1.1.6.1. Φυσικοχημικές μέθοδοι.

Διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι έχουν, στο παρελθόν, πραγματοποιηθεί για την αντιμετώπιση του προβλήματος των ΥΑΕ. Μία τέτοια μέθοδος είναι η συσσώρευση των υγρών αποβλήτων σε δεξαμενές ή τεχνητές λεκάνες, με σκοπό την συμπύκνωση του αποβλήτου και ταυτόχρονη διάσπαση των συστατικών του με αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση του BOD και COD συμβάλλοντας στην προοδευτική μείωση του φαινολικού φορτίου.

Η μέθοδος της εξάτμισης είναι γνωστή εδώ και πάρα πολλά χρόνια (Fiestas, 1981), όμως η εφαρμογή της εννοείται μόνο σε περιοχές με ιδιαίτερα κλιματικά πλεονεκτήματα, όπως περιοχές με χαμηλές βροχοπτώσεις και έντονη εξάτμιση.

Η εφαρμογή της μεθόδου όμως, ακόμη και στις περιοχές με τα ζητούμενα κλιματικά πλεονεκτήματα π.χ. Κύπρος και Κρήτη, κατέστη προβληματική λόγω της έντονης δυσοσμίας

καθώς και της αδυναμίας διαχείρισης της ιλύος που συσσωρευόταν στον πυθμένα των δεξαμενών.

Η πιο παλιά και απλή φυσικοχημική μέθοδος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η προσθήκη διαφόρων χημικών αντιδραστηρίων, όπως $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO , και διάφορων πολυηλεκτρολυτών (Fiestas, 1977). Η προσθήκη $\text{Ca}(\text{OH})_2$ προκαλεί αύξηση του pH σε αλκαλικές τιμές και μείωση της ανεπιθύμητης οσμής των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων.

Με την χρήση των παραπάνω αντιδραστηρίων ρυθμίζεται η τιμή του pH των ΥΑΕ και επιτυγχάνεται παρακράτηση των διαλυμένων οργανικών υλών από τα κατακρυμνιζόμενα άλατα. Με την μέθοδο αυτή μειώνεται το οργανικό φορτίο των ΥΑΕ κατά 60-70%, όμως παράγεται στερεό υπόλειμμα σε ποσοστό 20% των ΥΑΕ που καθιστά την εφαρμογή της μεθόδου μειονεκτική.

Με την χρήση των οσμωτικών μεμβρανών επιτυγχάνεται συγκράτηση των αμινοξέων, βιταμινών, σακχάρων και άλλων οργανικών συστατικών. Η μείωση του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ μέσω της μεθόδου αυτής είναι δυνατό να φτάσει στο 97%, όμως η χρησιμοποίηση πολλών μεμβρανών (αχρηστεύονται πολύ γρήγορα λόγω φραξίματος), η διαχείριση του στερεού υπολείμματος και το υψηλό κόστος των μεμβρανών δεν επιτρέπει την πρακτική της χρήση.

Κατά την μέθοδο της υπερδιήθησης γίνεται χρήση μεμβρανών, οι οποίες, μέσω του πορώδους, τους διαχωρίζουν τις διαλυμένες ουσίες των ΥΑΕ με βάση το μέγεθος των μορίων τους. Αυτή η μέθοδος όμως είναι αδύνατο να εφαρμοστεί πρακτικά, λόγω των ίδιων μειονεκτημάτων με την αντίστροφη ώσμωση.

Η μέθοδος της θερμικής συμπύκνωσης βρίσκεται ακόμη σε πειραματική φάση, λόγω της ανάγκης προσδιορισμού πολλών ακόμη παραμέτρων, για την εφαρμογή της. Με την μέθοδο αυτή γίνεται προσπάθεια συμπύκνωσης των ΥΑΕ, με εξάτμιση, μέσω ειδικών εξατμοποιητών (Amirante, 1983). Η μείωση του όγκου των αποβλήτων κατά 75%, η επανάκτηση του λαδιού που περιέχονται στα ΥΑΕ σε ποσοστό 0.1-0.3% αλλά και η δυνατότητα χρησιμοποίησης του εξατμισμένου-συμπυκνωμένου νερού στο ίδιο ελαιοτριβείο, είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου. Το μεγάλο κόστος και η διαχείριση του στερεού υπολείμματος προβάλλουν ως τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής.

Επίσης στην τεχνητή εξάτμιση επιτυγχάνεται μείωση του COD των ΥΑΕ κατά 90%, μέσω ειδικών συσκευών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην θερμική αποσύνθεση των αποβλήτων, μέσω μιας πυρολυτικής επεξεργασίας δύο σταδίων.

Μια ακόμη φυσικοχημική μέθοδος, η οποία όμως βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο, είναι και η ηλεκτρολυτική οξείδωση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, χρησιμοποιώντας ως άνοδο Ti/Pt και ως κάθοδο ανοξειδωτο χάλυβα (Βλυσσίδης, 1997). Η μέθοδος αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του COD κατά 93%. Εντούτοις, η διαχείριση των ΥΑΕ μέσω της ηλεκτρόλυσης δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα, λόγω των τεράστιων ποσοτήτων ενέργειας που απαιτούνται για την εφαρμογή της μεθόδου (Βλυσσίδης, 1997).

Μία άλλη μέθοδος είναι η επεξεργασία των ΥΑΕ με το αντιδραστήριο Fenton, το οποίο αποτελείται από υπεροξείδιο του υδρογόνου και ένα σιδηρούχο άλας ($\text{Fe}^{-2} / \text{H}_2\text{O}_2$), προκαλώντας την χημική οξείδωση του οργανικού φορτίου (Gemjak *et al.*, 2003). Η οξείδωση του οργανικού φορτίου επιτυγχάνεται μέσω των ριζών υδροξυλίου, οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με το σιδηρούχο άλας (Rivas *et al.*, 2001). Ο διαφορετικός τρόπος με τον οποίο αντιδρούν τα φαινολικά συστατικά στην μέθοδο αυτή (κυρίως λόγω του αριθμού των υδροξυλίων που υπάρχουν στον αρωματικό τους δακτύλιο), η παραγωγή τοξικών συστατικών κατά την διάσπαση του οργανικού φορτίου, και η δυσκολία καθορισμού των βέλτιστων συνθηκών όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και οι αρχικές συγκεντρώσεις του H_2O_2 και του σιδηρούχου άλατος, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση Fenton και να αποικοδομηθεί ένα απόβλητο ορισμένου οργανικού φορτίου, καθιστούν την εφαρμογή της μεθόδου μειονεκτική (Rivas *et al.*, 2001: 2003: Gemjak *et al.*, 2003).

1.1.6.2 Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Διάφορες μεθοδολογίες έχουν προταθεί και δοκιμασθεί στην προσπάθεια εξεύρεσης μίας αποτελεσματικής λύσης για την επεξεργασία των ΥΑΕ, εντούτοις καθολική λύση του προβλήματος αυτού δεν έχει καταστεί εφικτή.

Η δυσκολία στην διάσπαση και την απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ, μέσω συμβατικών μεθόδων επεξεργασίας (Flouri *et al.*, 1996: Dias *et al.*, 2004), προβάλλει την εξεύρεση μίας κατάλληλης διαδικασίας βιοαποικοδόμησης ως την αποτελεσματικότερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση του προβλήματος διαχείρισης των ΥΑΕ (Dias *et al.*, 2004).

Η αποικοδόμηση των οργανικών και των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ μπορεί να επιτευχθεί μέσω μικροοργανισμών, που εισάγονται στα ΥΑΕ ως εμβόλιο εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα ευνοϊκές συνθήκες για την επικράτησή τους όπως π.χ. κατάλληλος αερισμός, θερμοκρασία, pH (Fiestas, 1977). Η χρησιμοποίηση επιλεγμένων μικροοργανισμών κατά την

βιοεπεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου στοχεύει κυρίως στην μείωση του ρυπαντικού φορτίου και την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως π.χ. βιοαερίου. Ανάλογα με τον τύπο μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν (αεροβικούς ή αναεροβικούς) τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας των ΥΑΕ χωρίζονται σε συστήματα αεροβικής ή αναεροβικής επεξεργασίας (Οιχαλιώτης *et al.*, 1999).

Λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου και της μεγάλης περιεκτικότητας σε άζωτο, τα ΥΑΕ αποτελούν ένα πλούσιο υπόστρωμα για την ανάπτυξη αζωτοβακτηρίων, ιδιαίτερα στελεχών του γένους *Azotobacter* (Chatjipavlidis *et al.*, 1996). Στη μελέτη αυτή, ΥΑΕ τα οποία είχαν προκατεργαστεί με H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον και μεταφερθεί σε αεριζόμενο βιοαντιδραστήρα, εμβολιάστηκαν με το αζωτοβακτήριο *Azotobacter vinelandii*. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής, ήταν η μείωση των τοξικών συστατικών των ΥΑΕ, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων (π.χ. αυξίνες) και μεγάλων ποσοτήτων μικροβιακών πολυσακχαριτών. Η εφαρμογή των επεξεργασμένων αυτών ΥΑΕ στο έδαφος προκάλεσε αύξηση της ανθεκτικότητας του εδάφους ενάντια στο φυτοπαθογόνο *Pythium* και *Phytophthora*, προφανώς λόγω της κατάλληλης μικροβιακής χλωρίδας που επικράτησε και των μεταβολιτών τους που παράχθηκαν (Chatjipavlidis *et al.*, 1996).

Επίσης κατά την επεξεργασία ΥΑΕ με το βακτήριο *Lactobacillus plantarum* παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών (46%), του χρώματος (58%) και του COD (55%), εντούτοις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως μόνο 10% (Ayed *et al.*, 2003).

Η ικανότητα μερικών επιλεγμένων ζυμών να αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, οδήγησε τον Gharsallah (1993) στην χρησιμοποίηση των ζυμών *Candida crusei*, *Saccharomyces chevalerie* και *Saccharomyces rouxii* στην επεξεργασία των ΥΑΕ.

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

Ο βασιδομύκητας *Euc-1*, ένας μύκητας που έχει την ικανότητα παραγωγής του ενζύμου λακκάση, το οποίο οξειδώνει πλήθος φαινολικών ενώσεων καθώς και αμίνες, χρησιμοποιήθηκε από τον Dias και τους συνεργάτες του (2004) για την βιοδιάσπαση των ΥΑΕ. Ο μύκητας εμβολιάστηκε σε υποστρώματα που περιείχαν κατάλληλη ποσότητα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Στο τέλος της επώασης, παρουσιάστηκε σημαντική μείωση του τοξικού φορτίου των ΥΑΕ, όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις του COD, των φαινολικών

συστατικών και του χρώματος. Συγκεκριμένα επιτεύχθηκε μείωση του COD κατά 45%, των φαινολικών συστατικών κατά 90% και του χρώματος κατά 73% (Dias *et al.*, 2004). Εντούτοις, τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίαζαν μικρή περιεκτικότητα σε ΥΑΕ, περίπου 20%.

Ο Perez και οι συνεργάτες του (1987) έχουν επίσης αναφέρει αποχρωματισμό των ΥΑΕ χρησιμοποιώντας τους βασιδιομύκητες *Phanerochaete chrysosporium* και *Phanerochaete flavidopalba*.

Επιπροσθέτως, ο μύκητας *Aspergillus niger* χρησιμοποιείται ευρύτατα για την βιοαποικοδόμηση των ΥΑΕ, μειώνοντας κύρια το οργανικό φορτίο, δίνοντας χαμηλές τιμές COD και φυτοτοξικότητας (Cereti *et al.*, 2004).

Ο μύκητας *Lentinula edodes* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή λακκάσης με σκοπό την ενζυματική κατεργασία των ΥΑΕ (D'annibale *et al.*, 1996; Casa *et al.*, 2003), προκαλώντας την μείωση των φαινολικών συστατικών και ιδιαίτερα των ορθο-διφαινολών. Παρόλα αυτά, το οργανικό φορτίο παρέμεινε αμετάβλητο. Η επεξεργασία των ΥΑΕ με το ένζυμο λακκάση προκάλεσε μείωση της φυτοτοξικότητας, αυξάνοντας την βλαστικότητα των σπόρων του σιταριού *Triticum durum*.

Κατά την επεξεργασία των ΥΑΕ με τους μύκητες *Coriulus versicolor* και *Funalia trogli*, παρουσιάστηκε μείωση των φαινολικών συστατικών και του COD, καθώς και αποχρωματισμός των ΥΑΕ. Συγκεκριμένα, ο μύκητας *Coriulus versicolor* μείωσε κατά 90% τα φαινολικά συστατικά και κατά 63% το COD, ενώ αποχρωμάτισε το δείγμα κατά 65%. Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και ο μύκητας *Funalia trogli* ο οποίος μείωσε τα φαινολικά συστατικά κατά 93%, το COD κατά 70%, ενώ αποχρωμάτισε το δείγμα κατά 81% (Yesilada *et al.*, 1996). Η βιοαποικοδόμηση των ΥΑΕ αποδόθηκε σε αυξημένη παραγωγή του ενζύμου λακκάση κατά την ανάπτυξη των μυκήτων αυτών.

Επίσης, η αερόβια προκατεργασία των ΥΑΕ με τον μύκητα *Aspergillus terreus* σε συνδυασμό με την αναερόβια ζύμωση των στερεών υπολειμμάτων του υλικού αυτού, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του φαινολικού φορτίου τους κατά 94%, αλλά και της φυτοτοξικότητας τους κατά 87%. Επιπλέον σημειώθηκε και αύξηση της παραγόμενης ποσότητας του μεθανίου κατά 30% (Bojja *et al.*, 1993).

Εξίσου σημαντικό είναι και το γεγονός ότι οι μύκητες του γένους *Pleurotus* διαθέτουν ένα αποδοτικό ενζυμικό μηχανισμό αποδόμησης των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ, μειώνοντας σημαντικά την φυτοτοξική τους δράση (Sanjust *et al.*, 1991; Zervakis *et al.*, 1996; Martirani *et al.*, 1996) προκαλώντας ταυτόχρονα τον αποχρωματισμό τους (Flouri *et al.*, 1996; Tsioulpas *et al.*, 2002).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι μύκητες *Pleurotus pulmonarius* και *Pleurotus cornycopiae* έχουν την ικανότητα να αποχρωματίζουν και να μειώνουν την φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ, ενώ οι *Phlebia radiata*, *Dichomitus squalens* και *Polyporus frondosus* προκαλούν μόνο τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ (Balis, 1991).

1.1.6.3. Ελαιοτριβεία δύο φάσεων.

Η επιτακτική ανάγκη εύρεσης λύσης στο πρόβλημα των ΥΑΕ των βιομηχανιών ελαιολάδου, οδήγησε τις εταιρίες, στις αρχές της δεκαετίας του ενενήντα, στην κατασκευή ενός νέου τύπου διαχωριστήρα (decanter) δύο φάσεων, η χρησιμοποίηση του οποίου έχει προσφάτως εξαπλωθεί στα ελαιουργεία της Ισπανίας, Ιταλίας και Ελλάδος (Jones *et al.*, 2000).

Η αρχή λειτουργίας του διαχωριστήρα δύο φάσεων έγκειται στον διαχωρισμό της ελαιοζύμης σε δύο φάσεις, στην υγρή που περιέχει μόνο το ελαιόλαδο και την στερεή, η οποία περιέχει τον ελαιοπυρήνα μαζί με τα φυτικά υγρά του καρπού (ελαιοπυρηνόλυμα). Χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η χρησιμοποίηση νερού μόνο στον ελαιοδιαχωριστήρα και όχι κατά την μάλαξη της ελαιοζύμης.

Αν και τα ημίρρευστα απόβλητα (alpeorujo) που παράγονται από τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων είναι λιγότερα σε όγκο, εντούτοις το ρυπαντικό τους φορτίο είναι αρκετά υψηλό αφού παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση τοξικών συστατικών ανά μονάδα όγκου. Επίσης περιέχουν μια αρκετά σημαντική ποσότητα λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατο-διαλυτών υδατανθράκων καθώς και ένα μικρό αλλά ενεργό κλάσμα πολύφαινολικών ουσιών (Albuquerque *et al.*, 2004), το οποίο είναι σχετικά ανθεκτικό στην αποικοδόμηση (Gonzalez *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 2000).

Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργικών συστημάτων δύο φάσεων είναι δυνατό να φυγοκεντρηθούν σε υψηλή θερμοκρασία, σε ειδικές μονάδες επεξεργασίας (rapasso) για την παραγωγή πυρηνελαίου. Το παραπροϊόν της δεύτερης αυτής φυγοκέντρωσης ξηραίνεται και υπόκεινται σε χημική κατεργασία με ένα εξάνιο για την συλλογή της επιπλέον ποσότητας λαδιού. Το τελικό ημιστερεό παραπροϊόν αυτής της διαδικασίας είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί υπό προϋποθέσεις, ως καύσιμη ύλη για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (Albuquerque *et al.*, 2004).

Η διάθεση του alpeorujo (πάστα) αποτελεί πρόβλημα διεθνώς και κυρίως λόγω των επιζήμιων αποτελεσμάτων που έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί στην σταθερότητα του εδάφους

όταν προστίθεται σ' αυτό και της φυτοτοξικής δράσης του, η οποία οφείλεται στην παρουσία του οργανικού φορτίου του (Tejada *et al.* 1997). Τελευταία, διεξάγονται διεθνώς προσπάθειες διάσπασης των φαινολικών συστατικών του alpeorujo και βιομετατροπής του σε οργανικό υπόστρωμα-βελτιωτικό μέσω της πραγμάτωσης θερμόφιλης αερόβιας ζυμώσεως (Jones *et al.*, 2000).

1.1.6.4. Ελεγχόμενη εφαρμογή σε εδαφικούς αποδέκτες.

Η ελεγχόμενη εφαρμογή των ΥΑΕ στο έδαφος θα μπορούσε να αποτελέσει μία αποδοτική και ανέξοδη λύση στο πρόβλημα της βιομηχανίας ελαιολάδου και εδάδιμων ελιών, εάν η απουσία οποιασδήποτε σημαντικής ζημίας στην καλλιέργεια θα μπορούσε να εξασφαλιστεί (Andrich *et al.*, 1992).

Η φετάρδευση (άρδευση των εδαφών με προκατεργασμένα ή μη ΥΑΕ) έχει πολλούς υποστηρικτές λόγω κυρίως της απουσίας συνθετικών χημικών ουσιών ή βαρέων μετάλλων και της παρουσίας αξιοσημείωτων ποσοτήτων οργανικών ουσιών, καλίου, φωσφόρου και μαγνησίου στην σύνθεση των ΥΑΕ (Proietti *et al.*, 1988: Molfese και Milano, 1989: Saviozzi *et al.*, 1990: Saviozzi *et al.*, 1991: Andrich *et al.*, 1992) αλλά και λόγω του εμπλουτισμού του εδάφους με εξειδικευμένους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ενισχύουν την αντοχή του έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Chatjipavlidis *et al.*, 1997: Ntougias *et al.*, 2003).

1.1.6.5. Συνεπεξεργασία με πυρηνόξυλο.

Η διαχείριση των ΥΑΕ μέσω συνεπεξεργασίας τους με πυρηνόξυλο, έχει ευρύτατα εφαρμοστεί σε πειραματικό επίπεδο (Μπαλής, 1984). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο μεγάλο οργανικό φορτίο των ΥΑΕ και στην δυνατότητα χρησιμοποίησής τους ως πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για θερμόφιλους/θερμοανθεκτικούς μικροοργανισμούς.

Το πυρηνόξυλο (εκχειλισμένος ελαιοπυρήνας) διαβρέχεται με τα ΥΑΕ, σε κατάλληλη αναλογία, ακολουθεί αερόβια ζύμωση λόγω της ανάπτυξης θερμόφιλων / θερμοανθεκτικών μικροοργανισμών, προκαλώντας την μείωση των διαφόρων τοξικών συστατικών, δημιουργώντας ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα (Ntougias *et al.*, 2003).

Η συγκομποστοποίηση (ή θερμόφιλη μικροβιακή χώνευση) έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μη φυτοτοξικού εδαφικού βελτιωτικού, το οποίο περιέχει τα χουμικά

συστατικά της κομποστοποίησης, ένα πλήθος μικροοργανισμών αλλά και τα λιπαντικά στοιχεία των ΥΑΕ, που συμβάλλουν στη αύξηση της γονιμότητας του εδάφους (Balis *et al.*, 1991).

Το μεγάλο κόστος της εφαρμογής, λόγω της ανάγκης πλήρους αυτοματοποιημένου ελέγχου του μικροπεριβάλλοντος κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης (Agellis *et al.*, 1999) προκαλεί περιορισμό στην χρήση της.

1.1.7. Χρήσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Αν και τα ΥΑΕ είθισται να αποκαλούνται πηγή δυσεπίλυτων προβλημάτων, παρόλα αυτά παρουσιάζουν δυναμική για την χρησιμοποίησή τους. Οι περισσότερες από αυτές που αναφέρονται παρακάτω είναι ακόμη σε ερευνητικό επίπεδο, όμως η προοπτική να βρουν μελλοντική εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο είναι ενθαρρυντική.

1.1.7.1. Απομόνωση φαινολικών συστατικών.

Τα ΥΑΕ παρουσιάζουν μία χημειοτακτική απωθητική δράση ενάντια στο κύριο εχθρό της ελιάς, την μύγα *Dacus oleae* (Lo Scalzo *et al.*, 1993). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η απωθητική αυτή δράση των ΥΑΕ οφείλεται σε κάποια φαινολικά συστατικά τους. Επειδή όμως η απευθείας εφαρμογή των ΥΑΕ στα ελαιόδεντρα δεν δίνει τα ίδια αποτελέσματα για την καταπολέμηση του προβλήματος, γίνονται προσπάθειες για την απομόνωση των φαινολικών αυτών συστατικών. Έτσι είναι πιθανό κάποια στιγμή τα ΥΑΕ να χρησιμοποιούνται, αντί των φυτοφαρμάκων, για την αντιμετώπιση του δάκου (Lo Scalzo *et al.*, 1993).

Πολλά από τα φαινολικά συστατικά των ΥΑΕ έχουν παρουσιάσει υπογλυκαιμικές και υπολιπιδικές δραστηριότητες που μπορούν να είναι πολύ ενδιαφέρουσες για τις έρευνες για την υγεία του ανθρώπου. Αυτή η σε βάθος μελέτη εστιάζεται στη δυνατότητα ανάκτησης βιολογικών ενεργών ενώσεων από τα ΥΑΕ (Romani *et al.*, 1998).

Ακόμη τα φυσικά φαινολικά συστατικά των ΥΑΕ είναι δυνατό να βρουν κάποια εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων, βασιζόμενα στην αντιβακτηριακή / αντιοξειδωτική τους δράση (Tuncel *et al.*, 1993).

1.1.7.2. Παραγωγή μεθανίου.

Τα ΥΑΕ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεθανίου, μέσω αναερόβιας ζύμωσης. Η περαιτέρω μελέτη της βιομετατροπής της οργανικής ύλης των ΥΑΕ σε μεθάνιο, μπορεί μελλοντικά να επιτρέψει την χρησιμοποίηση των ΥΑΕ για την παραγωγή ενέργειας.

Πλεονεκτήματα της επεξεργασίας των ΥΑΕ μέσω αναερόβιας ζύμωσης είναι η απουσία ανάγκης παροχής οξυγόνου (το άμεσα διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα λειτουργεί σαν αποδέκτης ηλεκτρονίων) γεγονός που καθιστά την αναερόβια διαδικασία οικονομικότερη από την αερόβια, αλλά και η παραγωγή μικρότερων ποσοτήτων ιλύος.

Στην αντίπερα όχθη, η αργή διαδικασία της αναερόβιας ζύμωσης, που κυμαίνεται από πέντε μέρες σε απόβλητα που έχουν υποστεί βιομετατροπή με αερόβια επεξεργασία ως και σαράντα μέρες σε απόβλητα που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία (Fiesta *et al.*, 1981: Rozzi *et al.*, 1984: Borja *et al.*, 1993) είναι δυνατό να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα στην εφαρμογή της μεθόδου. Επίσης, το μεγάλο κόστος λόγω της απόλυτα ελεγχόμενης διαδικασίας σε βιομηχανικό επίπεδο δρα ανασταλτικά στη υιοθέτηση της εφαρμογής αυτής.

1.1.7.3. Καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών.

Κατά την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών, λαμβάνει χώρα ελεγχόμενη βιομετατροπή των λιγνοκυτταρινούχων υλικών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την διαπίστωση ότι οι μύκητες του γένους *Pleurotus* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ΥΑΕ οδήγησε στην μελέτη καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών σε θρεπτικό υπόστρωμα αποβλήτων ελαιουργείων.

Κατά την ανάπτυξη των μυκήτων προκαλείται μείωση του φαινολικού φορτίου, της τοξικότητας και του χρώματος των ΥΑΕ, συμβάλλοντας στην αύξηση της απόδοσης παραγωγής εδώδιμων μανιταριών (Zervakis *et al.*, 1996). Αν και οι ποσότητες των ΥΑΕ που είναι δυνατό να απορροφηθούν μέσω αυτής της μεθόδου, είναι περιορισμένες σίγουρα αποτελεί μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για την αξιοποίηση του πυρηνόξυλου. Ενδιαφέρον επίσης προκαλούν και οι προοπτικές χρησιμοποίησης του εξαντλημένου υλικού ως εδαφοβελτιωτικού αλλά και ως ζωοτροφή.

1.1.7.4. Ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων για την παραγωγή πρωτεϊνών.

Τις περισσότερες φορές η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ΥΑΕ δεν είναι εφικτή, λόγω του μεγάλου, τοξικού φορτίου τους. Έχει αποδειχθεί όμως ότι κάποιες ζύμες και μύκητες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε τέτοια περιβάλλοντα και να παράγουν μονοκυτταρικές πρωτεΐνες όταν η περιεκτικότητα των ΥΑΕ σε αναγωγικά και μη αναγωγικά σάκχαρα είναι αρκετά υψηλή (8% περίπου) (Fiestas, 1977). Ο μύκητας *Aspergillus niger* έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά στην παραγωγή των πρωτεϊνών (Gharsallah, 1993).

Οι πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται κατ'αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικό διατροφής για ζώα. Εντούτοις, η ταχεία αποικοδόμηση των σακχάρων του ελαιοκάρπου κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του και διάφορα άλλα οικονομικοτεχνικά προβλήματα, καθιστούν προς το παρόν την εφαρμογή της μεθόδου ανέφικτη (Μιχελάκης, 2000).

1.1.7.5. Λίπανση καλλιεργειών με ΥΑΕ.

Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας των ΥΑΕ σε κάλιο και οργανική ύλη (Andrich *et al.*, 1992) έχει προταθεί η πιθανή χρησιμοποίηση των ΥΑΕ στην λίπανση καλλιεργειών.

Μολονότι η εφαρμογή των ΥΑΕ στο έδαφος θα μπορούσε να βελτιώσει σε μεγάλο ποσοστό τις φυσικοχημικές ιδιότητες του, παρόλα αυτά η φυτοτοξική δράση που έχει παρατηρηθεί σε κάποιες περιπτώσεις πάνω στα φυτά (Andrich *et al.*, 1992) καθώς και η υψηλή αλατότητα ($8-18 \text{ mS cm}^{-1}$) και οξύτητα (pH 4-6) (Μιχελάκης, 2000) έχει αποτρέψει την συστηματική εφαρμογή τους στις καλλιέργειες.

Σήμερα τα ΥΑΕ μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην λίπανση των εδαφών σε περιορισμένες περιπτώσεις και υπό προϋποθέσεις. Έτσι η εφαρμογή των ΥΑΕ συνίσταται να γίνεται τουλάχιστον τρεις βδομάδες πριν την σπορά (Proietti *et al.*, 1995; Casa *et al.*, 2003), επειδή έχει αποδειχθεί ότι η τοξική δράση των ΥΑΕ είναι μεγαλύτερη κατά την εκβλάστηση (Krogmeier *et al.*, 1989; Casa *et al.*, 2003). Επίσης, η λίπανση πρέπει να γίνεται κλιμακωτά και σε μικρές δόσεις, και δεν πρέπει να επαναλαμβάνεται σε χρονικό διάστημα μικρότερο από δύο χρόνια.

1.1.7.6. Καταπολέμηση ασθενειών φυτών.

Η δράση των ΥΑΕ προκατεργασμένων ή μη, ενάντια ορισμένων φυτικών ασθενειών έχει παρατηρηθεί σε πολλές έρευνες. Συγκεκριμένα η καταπολέμηση του μικροοργανισμού *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* με την χρήση των ΥΑΕ έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αν και πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι η χρήση ορισμένων μόνο συστατικών των ΥΑΕ, όπως π.χ. η υδροξυτυροσόλη, θα ήταν αποτελεσματικότερη ενάντια του βακτηρίου αυτού. Επισημαίνεται των φυτοπαθογόνων εδάφους *Phytophthora* και *Fusarium*, έχει επίσης παρατηρηθεί κατά την εφαρμογή ΥΑΕ σε υποστρώματα αερόβιας ζυμώσεων (Ntougias *et al.*, 2003).

1.2. Μηχανισμός διάσπασης φαινολικών συστατικών.

1.2.1. Αερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.

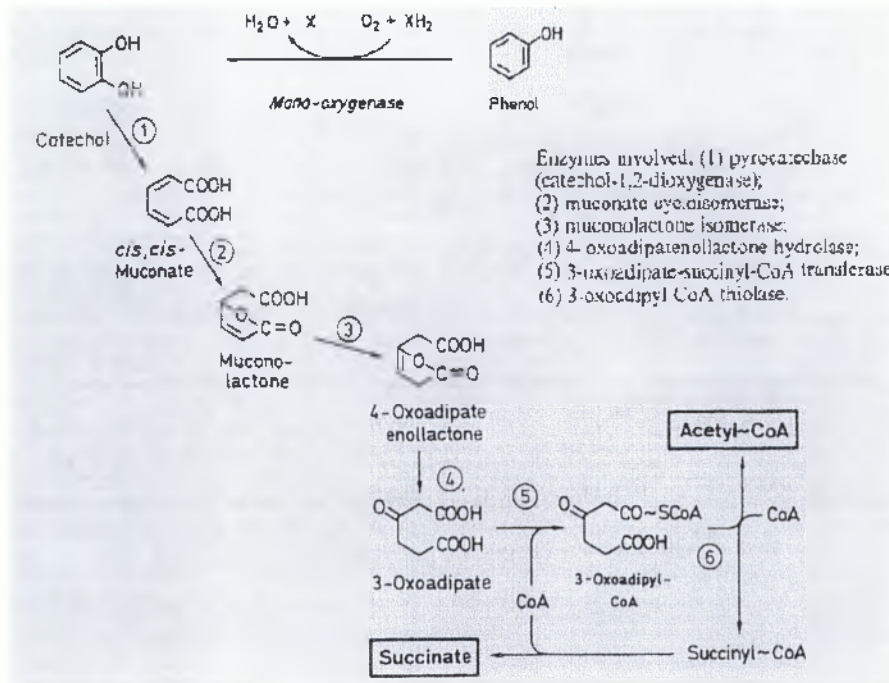
Η αποικοδόμηση των αρωματικών δακτυλίων των φαινολικών συστατικών είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί κάτω από αερόβιες συνθήκες, μέσω βακτηρίων και μυκήτων. Το ποσοστό του οξυγόνου που είναι διαθέσιμο, την στιγμή που λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση, συμβάλει ουσιαστικά στην ταχεία μετατροπή των φαινολικών συστατικών.

Η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου δύναται να πραγματοποιηθεί μεταξύ δύο γειτονικών ομάδων υδροξυλίου (*ο*- διάσπαση) ή μεταξύ ενός υδροξυλιομένου ατόμου άνθρακα και ενός μη υδροξυλιομένου ατόμου άνθρακα σε μετά- θέση (*μ*- διάσπαση), παρουσία μοριακού οξυγόνου, με την βοήθεια του ενζύμου πυροκατεχάση.

Αρχικά τα φαινολικά συστατικά υδροξυλιώνονται από μονοξυγενάσες. Ένα από τα άτομα του μοριακού οξυγόνου ενώνεται με τον αρωματικό δακτύλιο και παράγεται ένα υδροξύλιο, ενώ το άλλο συμμετέχει στην παραγωγή ενός μορίου νερού. Η υδροξυλίωση του φαινολικού συστατικού έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του σε κατεχόλη.

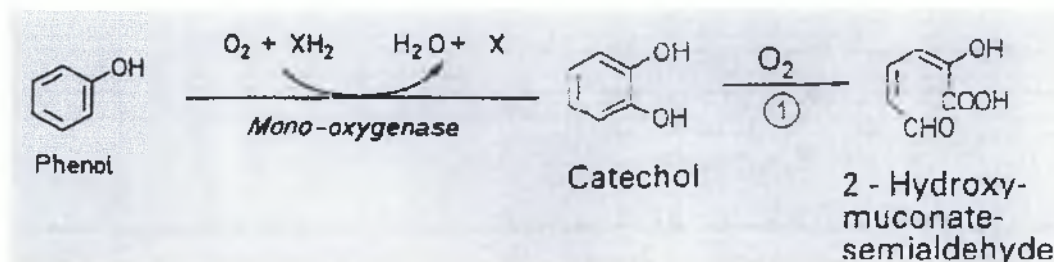
Προτού λάβει χώρα η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου της κατεχόλης, είναι δυνατό να αντικατασταθούν και οι υπόλοιπες ομάδες του δακτυλίου, όπως π.χ. χλώρο- νίτρο- και σούλφο- ομάδες από υδροξύλια. Στην *ο*- διάσπαση, η οποία δίδεται στην Εικόνα 2, η κατεχόλη διασπάται με την βοήθεια του ενζύμου *ο*-πυροκατεχάση και δίνει ένα ανοιχτό

δικαρβονικό οξύ, το *cis, cis*- μουκονικό, το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω και δίνει ως τελικό προϊόν το 3-οξοαδυπικό. Το τελευταίο ενεργοποιείται μέσω του CoA, σχηματίζοντας ακέτυλο-CoA και ηλεκτρώλο-CoA (Schlegel, 1993).



Εικόνα 1. *o*- Διάσπαση της κατεχόλης.

Στην *m*- διάσπαση, η οποία δίδεται στην Εικόνα 2, η κατεχόλη διασπάται με την βοήθεια του ενζύμου *m*-πυροκατεχάση σε 2-υδρόξυ-μουκονική ημιαλδεύδη. Ανάλογα με τα υποκατάστατα της αλειφατικής αλυσίδας, η τελευταία μεταβολίζεται περαιτέρω σε πυροσταφυλλικό, ακεταλδεύδη, οξάλοοξικό, φουμαρικό, ακετοξικό, ή ηλεκτρικό (Schlegel, 1993).

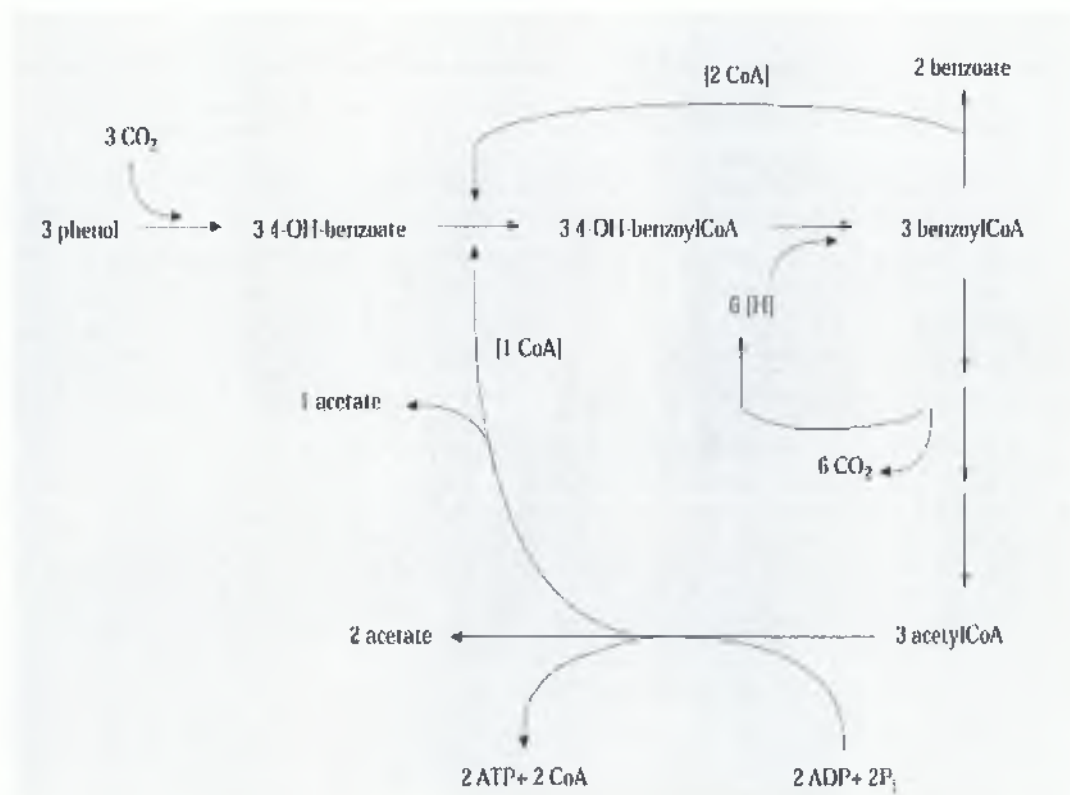


Εικόνα 2. *m*- Διάσπαση της κατεχόλης.

1.2.2. Αναερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.

Η ακριβής πορεία της αναερόβιας αποικοδόμησης των φαινολικών συστατικών, δεν έχει ακόμη βρεθεί, και εξακολουθούν να υπάρχουν αναπάντητα ερωτήματα σε σχέση με τα ένζυμα που εμπλέκονται, την συμμετοχή των ηλεκτρο-μεταφορέων πρωτεϊνών, και την ηλεκτροχημική μεταβολή κατά τον σχηματισμό του ATP. Εντούτοις η μετατροπή των φαινολικών συστατικών σε βένζυλο-CoA, αποτελεί την πιθανότερη εκδοχή της αναερόβιας αποικοδόμησης.

Η πορεία αυτή δίνεται σχηματικά στην παρακάτω Εικόνα:



Εικόνα 3. Αναερόβια αποικοδόμηση φαινολικών συστατικών.

Βάση της προτεινόμενης πορείας της αποικοδόμησης των φαινολικών συστατικών, τρία μόρια φαινόλης δίνουν τρία μόρια 4-υδρόξυ-βένζυλο-CoA. Κατόπιν ένα μόριο 4-υδρόξυ-βένζυλο-CoA δίνει τρία μόρια ακετόνης, ενώ δύο μόρια 4-υδρόξυ-βένζυλο-CoA, δίνουν 2 μόρια βενζοϊκού (Karlsson *et al.*, 1999).

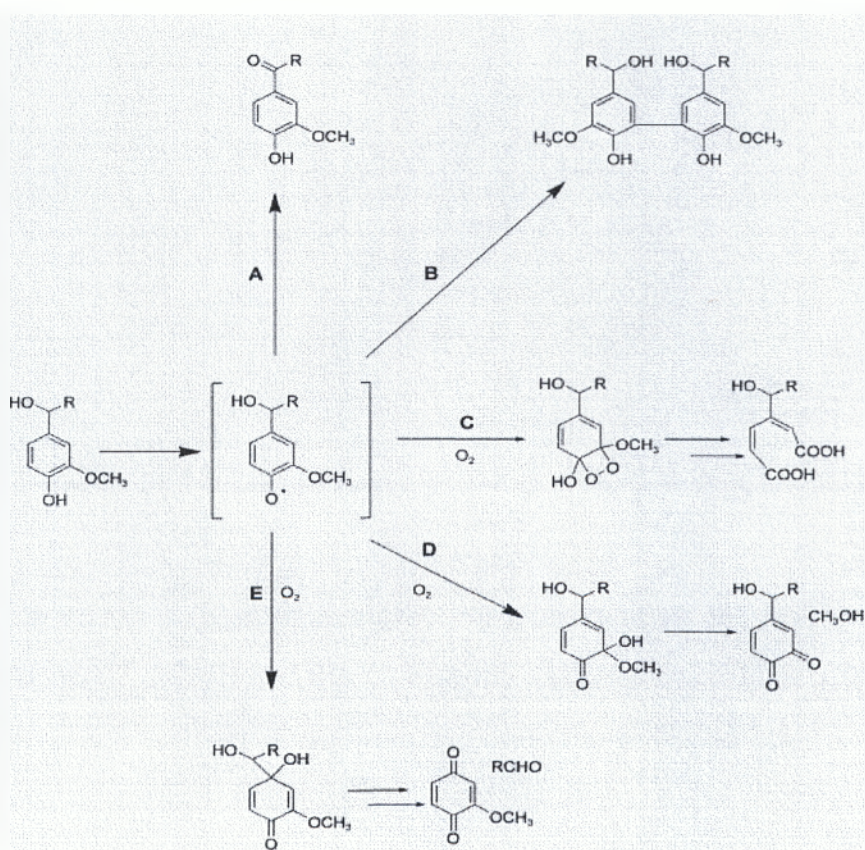
1.2.3. Δράση του ενζύμου λακκάση.

Η λακκάση είναι ένα ένζυμο, το οποίο παράγεται από μύκητες και συμπλέκεται με τέσσερα κέντρα χαλκού. Επίσης παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην θερμοκρασία και είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξείδωση διάφορων αρωματικών ενώσεων.

Ανάλογα με το είδος του μύκητα, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της, η λακκάση παρουσιάζει διαφορετικές δυνατότητες οξείδωσης.

Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών με την βοήθεια του ενζύμου της λακκάσης, προάγεται μέσω μίας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία προκαλεί ταχεία αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου ενός υδροξυλίου του αρωματικού δακτυλίου της φαινολικής ένωσης και το μετασχηματισμό αυτής σε φαινολική ρίζα (Crestini *et al.*, 2003).

Η φαινολική ρίζα είναι δύναται να ακολουθήσει διάφορες πορείες, όπως αυτές παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 4:



Εικόνα 4. Αντιδράσεις φαινολικών ριζών-Μηχανισμός δράσεως λακκάσης.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, δυσανάλογες αντιδράσεις (πορεία A) είναι δυνατό να προκληθούν, οξειδώνοντας το υδροξύλιο που βρίσκεται δίπλα από την αλειφατική ομάδα R, ένωση δύο ριζών δίνει ένα συμπυκνωμένο προϊόν (πορεία B), περαιτέρω οξείδωση των φαινολικών ριζών δύναται να δώσει ανοιγμένα δικαρβονικά οξέα (πορεία C) ή κιννόνες και μεθανόλες (πορεία D και E αντίστοιχα).

1.3. Στοιχεία μοριακής βιολογίας.

1.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Σημαντική ώθηση στην τεχνολογία του DNA προσέδωσε η εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η οποία διεκπεραιώνεται ολοκληρωτικά *in vitro* χωρίς να απαιτείται η παρουσία κυττάρων. Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει (Σκούρας, 1993; Χατζόπουλος, 2001).

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγράψει, από ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές παρασκευάζονται με χημική σύνθεση και γι'αυτο η τεχνική PCR χρησιμοποιείται μόνο για κλωνοποίηση κλασμάτων DNA με γνωστή την αλληλουχία των δυο άκρων τους. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών, η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντάς το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να εμφανιστεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.

1.3.2. Εύρεση αλληλουχίας βάσεων DNA.

Ο καθορισμός της αλληλουχίας βάσεων οποιουδήποτε καθαρού κλάσματος DNA πραγματοποιείται με την δράση της DNA πολυμεράσης, που επιτρέπει την *in vitro* αντιγραφή τμημάτων του υπό ανάλυση κλάσματος DNA, κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα αντίγραφα του DNA να τερματίζονται σ'ένα καθορισμένο νουκλεοτίδιο (Χατζόπουλος, 2001).

Η μέθοδος αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός συνόλου διαφορετικών αντιγράφων DNA που σταματούν σε κάθε θέση μέσα στο αρχικό DNA και διαφέρουν σε μήκος κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Τα αντίγραφα του DNA μπορεί να διαχωριστούν με βάση το μήκος τους με ηλεκροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και να καθοριστεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του αρχικού DNA από τη σειρά των αντιγράφων DNA στην πηκτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα.

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και την μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας των παραπροϊόντων ελαιοτριβείων, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικής χρονικής περιόδου και προελεύσεως δείγματα: δύο υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου τριών φάσεων (ΥΑΕ) και ένα στερεό απόβλητο ελαιοτριβείου (πάστα-αίρεουγιο).

Εκτός από την απομόνωση των μικροοργανισμών, τα δύο ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή υγρών και στερεών θρεπτικών υποστρώματων, στα οποία καλλιεργήθηκαν οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν και από τα τρία δείγματα.

Η προέλευση και η ημερομηνία παραλαβής των τριών δειγμάτων δίδονται από τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1. Προέλευση και ημερομηνία παραλαβής των προς ανάλυση δειγμάτων.

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΙΔΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
1	GAR	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	18/1/2004
2	G-old	ΥΑΕ	Γαργαλιάνοι	1/11/2004
3	FWW	ΠΑΣΤΑ	Κρήτη	16/2/2004

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα.

2.2.1. Υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα με ΥΑΕ.

Υλικά και Όργανα

- ΥΑΕ (GAR ή G-old)

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

Πορεία Παρασκευής

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος, τα ΥΑΕ αρχικά κατεργάστηκαν με πυκνό διάλυμα CaO μέχρι ρυθμίσεως του pH στην τιμή 6. Το κατεργασμένο ΥΑΕ διηθήθηκε, και το αιώρημα που προέκυψε, αποτέλεσε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα συγκεντρώσεως 100% v/v. Θρεπτικά υποστρώματα συγκεντρώσεως 25% και 50% v/v παρασκευάστηκαν κατόπιν κατάλληλης αραίωσης. Στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 1.7% w/v άγαρ. Τα θρεπτικά υποστρώματα τοποθετήθηκαν στον αυτόκαυστο και αποστειρώθηκαν για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm. Στερεά θρεπτικά υποστρώματα μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκαν να στερεοποιηθούν.

2.2.2. Παρασκευή Nutrient Broth (NB) και Nutrient Agar (NA).

Υλικά και Όργανα

- Nutrient Broth (Scharlau)
- Απιονισμένο νερό
- Άγαρ
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Κωνικές φιάλες των 500 και 1000 ml

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 και 500 ml
- Ζυγός ακριβείας
- Αυτόκαυστο

Πορεία Παρασκευής

Η παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος Nutrient Broth (NB) (Scharlau) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1.3 g σκόνης Nutrient Broth σε 100 ml αποστειρωμένου ύδατος (1.3% w/v). Η παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος Nutrient Agar (NA), πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1.7% w/v άγαρ, σε παρασκευασμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Broth (NB). Τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm. Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (NA) μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.2.3. Παρασκευή Potato Dextrose Agar (PDA).

Υλικά και Όργανα

- Potato Dextrose Broth (Scharlau)
- Απιονισμένο νερό
- Άγαρ
- Υδρόφιλο βαμβάκι
- Κωνικές φιάλες των 500 και 1000 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 και 500 ml
- Ζυγός ακριβείας
- Αυτόκαυστο

Πορεία Παρασκευής

Πραγματοποιήθηκε αρχικά η παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB-Scharlau) με την προσθήκη 2.4 g Potato Dextrose Broth σε 100 ml απιονισμένου ύδατος (2.4% w/v). Η παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος Potato

Dextrose Agar (PDA), πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1.7% w/v άγαρ, σε ήδη παρασκευασμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) αποστειρώθηκε για 20 min υπό πίεση 2.1 Atm και μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

2.3. Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας και απομόνωση μικροοργανισμών με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

2.3.1. Συνθήκες αποθήκευσης των προς ανάλυση δειγμάτων.

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου GAR και G-old που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία διατηρούνταν (προ αναλύσεως) σε ψυγείο στους 3°C. Λόγω του γεγονότος αυτού, η εφαρμογή της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων απαιτούσε την παραμονή των υγρών αποβλήτων σε συνθήκες δωματίου, έως ότου αποκτήσουν την θερμοκρασία αυτού.

Το στερεό απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (πάστα) αναλύθηκε μικροβιακά αμέσως μετά την παραλαβή του, οπότε και το δείγμα αυτό βρισκονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την μικροβιακή ανάλυση, η πάστα αποθηκεύτηκε σε ψυγείο στους 3°C.

2.3.2. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Υλικά και Όργανα

- Δείγματα FWW, GAR και G-old
- NaCl
- Απιονισμένο νερό
- Βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Κωνική φιάλη των 250 ml
- Σιφόνιο

- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόκαυστο

Πειραματική πορεία

Για τις διαδοχικές αραιώσεις, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου χρησιμοποιήθηκαν ως έχουν, ενώ η πάστα, παραχθείσα από την επεξεργασία των δύο φάσεων, προστέθηκε σε κατάλληλη ποσότητα φυσιολογικού ορού (0.85% w/v NaCl). Συγκεκριμένα, 10 g πάστας (υπο-ποσότητες συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία αυτής) ομογενοποιήθηκαν με 95 ml αραιού διαλύματος NaCl (0.85% w/v) υπό ασηπτικές συνθήκες για 20 min στις 200 rpm σε περιστρεφόμενο θάλαμο επώασης και θερμοκρασία 25°C (Zuberer, 1994). Το αιώρημα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την πραγμάτωση των διαδοχικών αραιώσεων.

Όλοι οι βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 9 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Η παρασκευή τρυβλίων για εφαρμογή της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων στα υγρά απόβλητα ελαιουργείου πραγματοποιήθηκε όπως αναγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Παρασκευάστηκαν τρυβλία συγκεντρώσεως 25% και 100% (v/v) σε ΥΑΕ. Στην περίπτωση της πάστας, 100 g αυτής ομογενοποιήθηκαν με 1000 ml απιονισμένου ύδατος για 20 min στις 200 rpm σε περιστρεφόμενο θάλαμο επώασης και θερμοκρασία 25°C (Zuberer, 1994). Το υπερκείμενο διηθήθηκε και όγκος αυτού συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε η τελική ποσότητα του αιωρήματος να είναι 1 L. Η παρασκευή τρυβλίων Petri πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1.7% w/v άγαρ. Όλη η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων πραγματοποιήθηκε ασηπτικά.

Για την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων, 1 ml από το επιλεγμένο δείγμα (αιώρημα πάστας FWW, ή υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου GAR ή G-old) προστέθηκε στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα. Το δείγμα ανακινήθηκε, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρη ανάμιξη με το διάλυμα του φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια, η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο, μεταφέροντας 1 ml από την πρώτη αραιώση (αραίωση 10^{-1}) στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση 10^{-2}). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε, με τον ίδιο τρόπο, μέχρι τον 7^ο δοκιμαστικό σωλήνα (10^{-7} αραιώση). Με την ολοκλήρωση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, το αιώρημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα περιείχε το ένα δέκατο των μικροβιακών κυττάρων (ή σπορίων) σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο δοκιμαστικό σωλήνα. Από κάθε αραιώση, 0.2 ml αιωρήματος εμβολιάστηκαν σε τρυβλία συγκεντρώσεως 25% και 100% (v/v) σε ΥΑΕ, για την περίπτωση των δειγμάτων GAR ή G-old, ενώ στην περίπτωση της πάστας πραγματοποιήθηκε επίστρωση του αιωρήματος κάθε αραιώσης σε

τρυβλία, η παρασκευή των οποίων αναγράφεται στην αρχή της παραγράφου αυτής. Ακολούθησε επώαση στους 25°C.

2.3.3. Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού και απομόνωση βακτηρίων/ζυμών και μυκήτων.

Τέσσερις μέρες μετά την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων και την διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλία Petri έγινε καταμέτρηση των αποικιών, για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων βακτηρίων/ζυμών και των σπορίων των μυκήτων. Ακολούθησε απομόνωση βακτηρίων και μυκήτων (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών), λαμβάνοντας υπόψη την μορφολογία των αποικιών (χρώμα, μέγεθος και σχήμα) καθώς επίσης και την κυτταρική δομή των απομονώσεων αυτών (μικροσκοπική μελέτη).

2.3.4. Διατήρηση απομονώσεων βακτηρίων και μυκήτων.

Τα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών) ανακαλλιεργούνταν κάθε 20 μέρες σε τρυβλία που περιείχαν 25% ΥΑΕ και θερμοκρασία 25°C. Επίσης, πραγματοποιήθηκε αποθήκευση σε γλυκερόλη για τα βακτήρια (Feltham *et al.*, 1978), και σε σωλήνες (slopes και tubes) που περιείχαν PDA για τους μύκητες. Υγρές καλλιέργειες βακτηρίων (εμβολιασμός βακτηρίων σε LB) αναμίχθηκαν με γλυκερόλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σε γλυκερόλη να είναι 20% v/v. Η αποθήκευση των βακτηρίων επαναλαμβάνονταν κάθε δύο μήνες. Πολλά βακτηριακά στελέχη δεν ήταν δυνατό να αναπτυχθούν σε LB (1% w/v υδρολυμένη καζεΐνη, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης και 1% w/v NaCl, παρουσία ή απουσία άγαρ για την παρασκευή στερεού ή υγρού θρεπτικού υποστρώματος αντίστοιχα), οπότε η διατήρησή τους πραγματοποιήθηκε με ανακαλλιέργεια σε τρυβλία που περιείχαν ΥΑΕ.

2.3.5. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου.

Αποστειρωμένο υγρό απόβλητο ελαιοουργείων G-old κατάλληλης συγκέντρωσης (25%, 50% ή 100% v/v) χρησιμοποιήθηκε για το εμβολιασμό όλων των στελεχών βακτηρίων και

μυκήτων (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών). Επίσης, μη εμβολιασμένο αποστειρωμένο υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου της ίδιας συγκεντρώσεως χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Προ αποστειρώσεως, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου κατεργάστηκαν με διάλυμα CaO μέχρι ρυθμίσεως του pH στην τιμή 6 και κατόπιν διηθήθηκαν.

Μετά τον εμβολιασμό, ακολούθησε επώαση των βακτηρίων/ζυμών στους 25°C υπό περιστροφή στις 120 rpm για 7 ημέρες, ενώ τα στελέχη των μυκήτων (εκτός ζυμών) επώασθηκαν σε μη περιστρεφόμενο θάλαμο στους 25°C για 20 ημέρες. Πραγματοποιήθηκε καθημερινή ανάδευση των καλλιεργειών μυκήτων με το χέρι. Με το πέρας της επώασης, το εμβολιασμένο υγρό απόβλητο διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί (Whatman 40) για να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας, έτσι ώστε να μην παρεμποδίζεται η περαιτέρω μελέτη της βιοαποικοδόμησης (όπως π.χ. μελέτη του αποχρωματισμού).

2.3.6. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών: Μέθοδος Folin-Ciocalteu.

Υλικά και Όργανα

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

Πειραματική πορεία

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων έλαβε χώρα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.*, 1994). Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml

προστέθηκαν 1% v/v του προς ανάλυση δείγματος (πυκνά δείγματα είχαν αρχικά αραιωθεί καταλλήλως), 5% v/v αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και 15% v/v διαλύματος Na_2CO_3 αρχικής συγκεντρώσεως 20% w/v, συμπληρώνοντας το υπόλοιπο της ογκομετρικής φιάλης με απιονισμένο νερό και αναμιγνύοντας το περιεχόμενο αυτής σε χρονικό διάστημα μικρότερου των 8 min. Το δείγμα αυτό (φιάλη) αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Με το πέρας των δύο ωρών, μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 760 nm. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα συριγγικού οξέος γνωστής συγκεντρώσεως (οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ήταν 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 μg συριγγικού οξέος/ml) με σκοπό την δημιουργία καμπύλης αναφοράς και τον προσδιορισμό της ποσότητας φαινολικών στα προς ανάλυση δείγματα.

2.3.7. Μέτρηση απορρόφησης-Μελέτη αποχρωματισμού.

Υλικά και Όργανα

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

Πειραματική πορεία

Για την μέτρηση της απορρόφησης, κατάλληλη ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος εισήχθη σε μικροσωλήνες (eppendorfs). Ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος στις 11000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για χρονικό διάστημα 3 min, και στο υπερκείμενο αυτού, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 500, 525 και 600 nm μετά την ρύθμιση του φασματοφωτόμετρου. Στα πυκνά δείγματα, πραγματοποιήθηκε αραιώση, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της απορρόφησης και η ρύθμιση του οργάνου. Πραγματοποιήθηκε

αραίωση 1:9, 1:4 και 1:1 v/v, ΥΑΕ:H₂O, κατά την μέτρηση του αποχρωματισμού δειγμάτων ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100, 50 και 25% v/v αντίστοιχα.

2.3.8. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας (Zuccopí *et al.*, 1981).

Υλικά και Όργανα

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

Πειραματική πορεία

Η μέτρηση της βλαστικότητας των σπόρων καρδάμου (*Lepidium sativum*, L) πραγματοποιήθηκε βάση του πρωτοκόλλου του Zuccopí και των συνεργατών του (1981). Βάση αυτού, τρία διηθητικά χαρτιά προστέθηκαν καταλλήλως στο εσωτερικό ενός τρυβλίου Petri, και στην επιφάνεια αυτών τοποθετήθηκαν 25 σπόροι καρδάμου, οι οποίοι διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος κατάλληλης αραίωσης (ΥΑΕ). Κατόπιν τοποθετήθηκε το σκέπασμα του τρυβλίου και τα τρυβλία τυλίχτηκαν με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί έτσι ώστε να διατηρεί την υγρασία του. Οι σπόροι αφέθηκαν να βλαστήσουν στους 25°C για τρεις μέρες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τον μαρτυρά (ταυτόχρονα) με την διαφοροποίηση ότι η ποσότητα του δείγματος αντικαταστήθηκε με αντίστοιχη ποσότητα πόσιμου νερού. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα. Με το πέρας των τριών ημερών, μετρήθηκε ο αριθμός εκβλαστημένων σπορίων καθώς και το μήκος της ρίζας τους.

Πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:4 και 1:1 v/v, ΥΑΕ:H₂O, κατά την μέτρηση της βλαστικότητας δειγμάτων ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100 και 50% v/v αντίστοιχα.

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

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

2.3.9. Μέτρηση pH.

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

2.3.10. Μέτρηση αγωγιμότητας.

Η μέτρηση της αγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση ενός Wissenschaftlich-Technische Werkstätten LF530 αγωγιμόμετρου. Ανάλογα με την θερμοκρασία του δείγματος, πραγματοποιούνταν ρύθμιση των ενδείξεων του οργάνου αυτού, μετρώντας ακολούθως την αγωγιμότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων.

2.3.11. Αντίδραση καταλάσης.

Μια σταγόνα διαλύματος 3% w/v H₂O₂ τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και κύτταρα του προς ανάλυση μικροοργανισμού μεταφέρθηκαν σ' αυτήν. Εμφάνιση φυσαλίδων σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 5 min πιστοποιεί θετική αντίδραση καταλάσης.

2.3.12. Μικροσκοπική παρατήρηση-Χρώση Gram.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός μικροσκοπίου (Zeiss) παρουσία ή απουσία χρωστικής (σαφρανίνη).

Για τη πραγμάτωση της χρώσης Gram (στην περίπτωση των βακτηρίων) έλαβε χώρα προσήλωση κυττάρων βακτηρίου σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα βακτηριακά κύτταρα

καλύφθηκαν με κρυσταλλικό ιώδες για 1 min και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος KI για ένα επιπλέον λεπτό. Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70% v/v για 30 sec και κατόπιν προστέθηκε σαφρανίνη για άλλα 10 sec. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε κάτω από το μικροσκόπιο (Zeiss), όπου πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση της χρώσης των κυττάρων.

2.3.13. Μελέτη της ανάπτυξης κυττάρων βακτηρίων και ζυμών σε φαινολικά συστατικά και Tween 20.

Τα επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών δοκιμάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 0.5% w/v κινναμωμικό, συριγγικό ή βανιλίνη, ως την μοναδική πηγή άνθρακα. Στην περίπτωση του κινναμωμικού και συριγγικού οξέος, η ρύθμιση του pH στην τιμή 7 πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 1 N NaOH, ενώ στην περίπτωση της βανιλίνης η ρύθμιση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού (0.06 M Na₂HPO₄-0.04 M NaH₂PO₄). Για την μελέτη της λιπολυτικής δράσης των βακτηρίων και ζυμών, χρησιμοποιήθηκε Tween 20 (1% v/v) ως την μοναδική πηγή άνθρακα. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού. Τα θρεπτικά αυτά υποστρώματα εμβολιάστηκαν με τα εξεταζόμενα στελέχη και επώαστηκαν επί τρεις ημέρες. Εκτίμηση της αύξησεως των βακτηρίων και των ζυμών πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm (Επισημαίνεται ότι η εκτίμηση της αύξησης των ζυμών είναι απλώς ενδεικτική-ποιοτική, αφού φαινόμενα που σχετίζονται με το μεγάλο μέγεθος των κυττάρων τους είναι δυνατό να επηρεάσουν την διαπερατότητα).

2.4. Εξαγωγή γονιδιακού DNA.

Υλικά

- Μικρές σπάτουλες
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- Δυο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65°C και 37°C αντίστοιχα

- Σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5ml (Eppendorfs)
- Φυγόκεντρος (Biofuge 28RS, Hiraesus instruments)
- Μικρο-φυγόκεντρος (Biofuge pico, Hiraesus instruments)

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

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

Διαδικασία

Λόγω της αδυναμίας των επιλεγμένων βακτηρίων να αναπτύσσονται σε εμπειρικό υπόστρωμα, μεταφέρθηκε βιομάζα των προς ανάλυση βακτηρίων, από το τρυβλίο σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (eppendorfs) με την βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας. Σε κάθε μικροσωλήνα προστέθηκαν 567 μl TE (pH 8), 30 μl 10% w/v SDS και 3 μl προνάσης (20 mg ml⁻¹). Το δείγμα τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h, με σκοπό την διευκόλυνση της λύσης των κυττάρων. Στην συνέχεια προστέθηκαν 100 μl 5 M NaCl και 80 μl CTAB/NaCl, με σκοπό την μετουσίωση πρωτεϊνών και την απομάκρυνση πολυσακχαριτών. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 20 min. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v), ανακινώντας το δείγμα ισχυρά, με σκοπό την απενεργοποίηση

των ενζύμων και τον καθαρισμό της υδατικής φάσης από τις πρωτεΐνες. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε καινούργιους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης. Η υδατική φάση εκχειλίστηκε εκ νέου με ίση ποσότητα χλωροφορμίου με σκοπό την απομάκρυνση τυχών πρωτεϊνών καθώς και υπολειμμάτων φαινόλης. Το δείγμα μας κατόπιν ανακινήθηκε και φυγοκεντρήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες. Το DNA κατακρημνίστηκε με την προσθήκη 0.6 όγκων (vol) παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20°C για 30 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 20 min. Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.4 ml αιθανόλης (70%, v/v). Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και το DNA αναδιαλύθηκε σε 0.2 ml ύδατος.

Σε κάθε δείγμα, προστέθηκαν 10 μl RNάση συγκέντρωσης (10 μM) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min. Τα δείγματα εκχειλίστηκαν με ίση ποσότητα φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης, (25:24:1, v/v/v) με σκοπό την απενεργοποίηση και απομάκρυνση της RNάσης. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 8000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο των δειγμάτων μεταφέρθηκε σε καινούργιους αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (eppendorfs) και εκχειλίστηκαν εκ νέου με ίση ποσότητα χλωροφορμίου, απομακρύνοντας τυχών υπολείμματα φαινόλης. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 10 min, συλλέγοντας το υπερκείμενο. Το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη 3 όγκων (vol) παγωμένης αιθανόλης 100% (v/v) και 0.1 όγκων 3 M CH_3COONa . Έπειτα, πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 1 h. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το DNA εκπλύθηκε με 0.5 ml 70% (v/v) αιθανόλης, το οποίο και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 15 min. Στο στάδιο αυτό το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το DNA αναδιαλύθηκε σε 50 μl TE. Τέλος τα δείγματα (DNA) αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Όργανα – Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρισης των 1.5 ml (eppendorfs)
- Αυτόματες μικροπιπέτες

- Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0.2 ml (PCR tube)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Στατό
- Μηχανή PCR (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK)
- Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H₂O
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer) (δημιουργεί άριστες συνθήκες για τη δράση του ένζυμου πολυμεράση)
- 50 mM MgCl₂ (δρα ως καταλύτης της ενζυμικής αντίδρασης πολυμερισμού)
- 40 mM διαλύματος δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 10 mM έκαστο δεοξυνουκλεοτίδιο (40 mM dNTPs: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)
- Εκκινητές:
 ~50 μM A-for (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3')
 ~50 μM C-rev (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')
- DyNazyme EXT DNA πολυμεράση, 1 U/μl, Finnzyme OY, Finland

Διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι ποσότητες αντιδραστηρίων:

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

Προς διευκόλυνση, πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλύματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Master-mix, 6 δειγμάτων). Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν εξαπλάσιες ποσότητες όλων των παραπάνω αντιδραστηρίων εκτός από το DNA των δειγμάτων που προστέθηκε σε κάθε σωλήνα αντιδράσεως πολυμερισμού (0.2 ml

PCR tube) ξεχωριστά. Σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε παρασκευή 'τυφλού δείγματος-μαρτύρα' όπου ακολουθείται η άνωθεν πορεία εκτός της εισαγωγής του DNA.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θήκες του μηχανήματος πολυμερισμού (PROGENE, TECHNE LTD, CAMBRIDGE, UK). Οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες:

1. Στάδιο: 2 min στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
2. Στάδιο: 35 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:
 - 30 sec στους 94°C (αποδιάταξη DNA)
 - 30 sec στους 52°C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινήτων)
 - 1min και 15 sec στους 72°C (δράση πολυμεράσης– προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)
3. Στάδιο: 10 min στους 72°C (δράση πολυμεράσης – προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων)

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

2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.

Όργανα και υλικά

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: Ηλεκτροφορητικό δοχείο, υποδοχέας πηκτής αγαρόζης, χτένες δημιουργίας πηγαδιών, (HORIZON 58, LIFE TECHNOLOGIES, GIBCO BRL)
- Τροφοδοτικό: (Power PAC 300, BIO-RAD, USA)
- Συσκευή υπεριώδους φωτός: (Consort TFX-20M)
- Αυτόματες μικροπιπέτες: (GILSON, FRANCE)
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ζυγό: KERN 572-35 (Kern & Sohn GmbH, Germany)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτών αγαρόζης: (KODAK, MDS 290, EASTMAN KODAK COMPANY Rochester, USA)

- Αγαρόζη, (Electrophoresis Grade Agarose, Life Technologies GIBCO BTL UK)
- 50x TAE pH 8: (242 g Tris-HCl, 57.1 ml π. CH₃COOH και 0.5 M EDTA)
- 1x TAE (20 ml 50x TAE σε 1 l απιονισμένο νερού)
- Διάλυμα φορτώσεως (loading dye), χρωστική
- 144 g (20 M) γλυκίνη
- 0.25% (w/v) Bromophenol blue (μπλε της βρωμοφαινόλης)
- 30.25 g/l (0.25 M) Tris
- 0.25% (w/v) cyanol
- 1% w/v SDS
- 40% (w/v) σακχαρόζη
- Διάλυμα θεικού μαγνησίου 1 mM MgSO₄
- 5 mg/ml αρχικού διαλύματος, 0.5 mg/l τελική συγκέντρωση (CH₃CH₂Br).
- 4 μl δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (DNA ladder)
- 100bp (80 ng/ml, EZ Load, CAT. NO 170-8353, BIO-RAD)
- 100bp (130 ng/μl αρχική συγκέντρωση, 110 ng/μl τελική συγκέντρωση παρουσία διαλύματος φορτώσεως, 3407A, TaKaRa, SHUZO CO, LTD, Shiga, Japan).

Διαδικασία

Παρασκευάζεται πηκτή 50 ml 1% w/v σε αγαρόζη. Το παρασκεύασμα τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων έως ότου πραγματοποιηθεί πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Το διάλυμα αφιείται να κρυώσει και να αποκτήσει θερμοκρασία περίπου ίση με 50°C.

Τοποθετείται ο υποδοχέας σε οριζόντια θέση (χωρίς κλίση), σφραγίζονται οι ανοιχτές πλευρές του και εφαρμόζεται η ειδική χτένα στην κατάλληλη θέση. Το περιεχόμενο της φιάλης, εισάγεται στον υποδοχέα και απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες. Η πηκτή αγαρόζης σταθεροποιείται και η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή. Η χτένα απομακρύνεται και σχηματίζονται οι θέσεις 'πηγάδια' για τα δείγματα του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν.

Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προετοιμάζονται με μίξη 8 μl ενισχυμένου τμήματος DNA και 5 μl διαλύματος φόρτωσης.

Τα δείγματα μαζί με μάρτυρα και δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (100 bp Ladder), τοποθετούνται προσεκτικά με μικροπιπέτα σε κάθε μια από τις θέσεις ηλεκτροφόρησης ('πηγάδια'). Τα δείγματα υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 5V/cm. Με το

πέρασ της ηλεκτροφόρισης, η πηκτή χρωματίζεται σε διάλυμα 0.5 mg/l βρωμιούχου αιθιδίου ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$) για 30 min και αποχρωματίζεται σε αραιό διάλυμα θεικού μαγνησίου.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μέτρηση του pH και της αγωγιμότητας των προς ανάλυση δειγμάτων.

Το pH και η αγωγιμότητα (EC) τόσο των υγρών όσο και στερεών αποβλήτων ελαιουργείων, που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των μικροοργανισμών και για την παρασκευή υγρών και στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων, δίδονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Δείγμα	Τύπος Δείγματος	pH	EC
GAR	ΥΑΕ	4.90 ± 0.06	13.25 ± 1.34
G-old	ΥΑΕ	4.86 ± 0.07	11.76 ± 1.07
FWW	ΠΑΣΤΑ	5.87 ± 0.13*	3.75 ± 0.11*

*1:2, wt/vol πάστας:H₂O.

Παρατηρήθηκαν αναμενόμενα αποτελέσματα, με το pH των δειγμάτων να είναι όξινο. Το pH του στερεού αποβλήτου ήταν ελαφρώς υψηλότερο από το pH των δύο υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, τα οποία έδωσαν παρόμοια τιμή pH. Η αγωγιμότητα όλων των δειγμάτων ήταν αρκετά υψηλή.

3.2. Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου.

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μικροβιακού φορτίου, με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, τόσο σε υγρά όσο και σε στερεά απόβλητα ελαιουργείων (εκφρασμένων ως αριθμό κυττάρων ή σπορίων ανά ml ΥΑΕ ή g ξηρού βάρους). Για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού, πραγματοποιήθηκε επίστρωση σε τρυβλία συγκεντρώσεως 10% σε αιώρημα πάστας (μελέτη alpeorujo) και 25% ή 100% σε ΥΑΕ (μελέτη υγρών αποβλήτων).

Πίνακας 3. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα GAR.

Δείγμα	Ποσοστό ΥΑΕ στα τρυβλία επίστρωσης	Πληθυσμός βακτηριών-ζυμών (κύτταρα ml ⁻¹)	Αριθμός σπορίων μυκήτων (σπόροι ml ⁻¹)
GAR	25%	4.5 x 10 ³	-
	100%	3.2 x 10 ³	2 x 10 ²

Πίνακας 4. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα G-old.

Δείγμα	Ποσοστό ΥΑΕ στα τρυβλία επίστρωσης	Πληθυσμός βακτηριών-ζυμών (κύτταρα ml ⁻¹)	Αριθμός σπορίων μυκήτων (σπόροι ml ⁻¹)
G-old	25%	2.2 x 10 ⁷	1.8 x 10 ⁶
	100%	2.8 x 10 ⁷	2.8 x 10 ⁶

Πίνακας 5. Εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στο δείγμα FWW.

Δείγμα	Ποσοστό αιωρήματος στα τρυβλία επίστρωσης	Πληθυσμός βακτηριών-ζυμών (κύτταρα g ⁻¹)*	Αριθμός σπορίων μυκήτων (σπόροι g ⁻¹)*
FWW	10%	8.4 x 10 ⁸	3.9 x 10 ⁹

* g ξηρού βάρους.

Βάση της εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου, παρατηρήθηκε ότι το δείγμα GAR παρουσιάζει το μικρότερο φορτίο, έχοντας τα επίπεδα τόσο του πληθυσμού βακτηριών-ζυμών, όσο και των σπορίων μυκήτων, χαμηλά. Το μικροβιακό φορτίο του δείγματος GAR ήταν τουλάχιστον τέσσερις τάξεις μεγέθους μικρότερο των άλλων δύο δειγμάτων.

Στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων, γίνεται για λόγους ευκολίας διάκριση μεταξύ μυκήτων και ζυμών, αν και οι ζύμες ανήκουν στο βασίλειο των *Μυκήτων*. Γενικά, παρόμοια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για τις ζύμες και τα βακτήρια, αφού οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι μονοκύτταροι.

3.3. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών.

Στόχος της πειραματικής διαδικασίας ήταν η απομόνωση και επιλογή μικροοργανισμών, ικανών να βιοαποικοδομούν τόσο τα υγρά όσο και τα στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων. Για να διαπιστωθεί εάν κάποιο από τις απομονώσεις βακτηρίων/ζυμών διέθετε την ικανότητα μεταβολής της χημικής σύνθεσης και της τοξικότητας των ΥΑΕ, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και βιοτοξικότητας σε εμβολιασμένα, με τα στελέχη αυτά, δείγματα ΥΑΕ παρουσία μάρτυρα. Τα χαρακτηριστικά των ΥΑΕ, των οποίων οι τιμές μετρήθηκαν ήταν το pH, η αγωγιμότητα, το φαινολικό φορτίο, η απορρόφηση του φωτός στα 525 nm και η φυτοτοξικότητα μέσω προσδιορισμού του δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου.

Στους Πίνακες 7, 8 και 9 παρατίθενται συνολικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ που είχαν εμβολιαστεί με κάποιο από τα στελέχη βακτηρίων ή ζυμών συγκριτικά με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του μάρτυρα.

Σε οκτώ απομονώσεις που δοκιμάστηκαν σε ΥΑΕ 'θεωρητικής' συγκέντρωσεως 100% (Πίνακας 8), εμφανίζεται ότι τα ΥΑΕ 100% δεν παρουσίαζαν φυτοτοξική δράση. Αυτό οφείλεται στο ότι τα δείγματα αυτά ήταν τα πρώτα που αναλύθηκαν και δεν είχε προηγηθεί ανάδευση στο ΥΑΕ που χρησιμοποιήθηκε, με αποτέλεσμα αυτά τα δείγματα να είναι πολύ αραιά και να μην αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 100%. Αν και η χρήση των συγκεκριμένων στελεχών δεν έδειξε μεταβολή των άλλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, εντούτοις η μέτρηση της φυτοτοξικότητας θα πρέπει να επαναληφθεί μελλοντικά.

Βάση των μεταβολών στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και στη βιοτοξικότητα, τα στελέχη αυτά διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες (Πίνακας 10):

Κατηγορία 1^η: Τα στελέχη της πρώτης κατηγορίας αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), μείωναν το φαινολικό φορτίο και την αγωγιμότητα, και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 2^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), μείωναν το φαινολικό φορτίο, και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 3^η: Τα στελέχη της τρίτης κατηγορίας αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), μείωναν το φαινολικό φορτίο και αύξαναν το pH.

Κατηγορία 4^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην τέταρτη κατηγορία αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), μείωναν την αγωγιμότητα, και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 5^η: Τα στελέχη της πέμπτης κατηγορίας αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 6^η: Τα στελέχη της κατηγορίας αυτής, προκαλούσαν αύξηση του δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας) και της απορρόφησης του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 7^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην έβδομη κατηγορία μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας), το φαινολικό φορτίο και την αγωγιμότητα, και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 8^η: Τα στελέχη της όγδοης κατηγορίας μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας), και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 9^η: Τα στελέχη της ένατης κατηγορίας προκαλούσαν μείωση του δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας) και αύξηση της απορρόφησης του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 10^η: Τα στελέχη της δέκατης κατηγορίας μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας) και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 11^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην ενδέκατη κατηγορία μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας) και το pH.

Κατηγορία 12^η: Τα στελέχη της δωδέκατης κατηγορίας προκαλούσαν μείωση του δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας) και αύξηση του pH.

Κατηγορία 13^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην δέκατη τρίτη κατηγορία μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας).

Κατηγορία 14^η: Τα στελέχη της δέκατης τέταρτης κατηγορίας αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 15^η: Τα στελέχη που ανήκουν στην δέκατη πέμπτη κατηγορία αύξαναν το pH και μείωναν την αγωγιμότητα.

Κατηγορία 16^η: Τα στελέχη της δέκατη έκτη κατηγορία αύξαναν την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 17^η: Τα στελέχη της δέκατης έβδομης κατηγορίας, δεν προκαλούσαν κάποια μεταβολή στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ.

Βάση των αποτελεσμάτων, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις βιοαποικοδόμησης των ΥΑΕ από τα στελέχη που ανήκουν στις έξι πρώτες ομάδες.

Η πειραματική διαδικασία για τα εννιά αυτά στελέχη βακτηρίων και ζυμών επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στον Πίνακα 11 παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων.

Τα εννέα αυτά επιλεγμένα στελέχη παρουσίασαν σαφή μείωση της βιοτοξικότητας των ΥΑΕ, τουλάχιστον κατά 100%. Μερικά στελέχη μείωναν το επίπεδο της βιοτοξικότητας κατά 13 φορές.

Η μείωση της βιοτοξικότητας συνοδεύτηκε και από σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου σε πέντε περιπτώσεις (δείγματα ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη FWW-9, FWW-12A, FWW-12B, GAR-15 και GAR-21). Στα δείγματα αυτά το φαινολικό φορτίο μειώθηκε τουλάχιστον κατά 15%. Στα δείγματα που επεξεργάστηκαν με τα στελέχη GAR-15 και FWW-12A, η μείωση έφτασε στα επίπεδα του 37% και 43% αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες τέσσερις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου μικρότερη του 10%, ενώ κατά την επεξεργασία με το στέλεχος G-old-13 δεν παρατηρήθηκε μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών.

Τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με τις απομονώσεις G-old-13, GAR-15, GAR-17 αύξαναν το χρώμα κατά 60%, ενώ το δείγμα που εμβολιάστηκε με το στέλεχος FWW-12B παρουσίασε μείωση του χρώματος κατά 29%.

Σε όλα τα δείγματα παρουσιάστηκε αύξηση του pH, εκτός των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με τα στελέχη FWW-12B και GAR-17.

3.4. Μελέτη φυσιολογικών και χημειοταξινομικών χαρακτηριστικών.

Μελετήθηκαν ορισμένα φυσιολογικά και χημειοταξινομικά χαρακτηριστικά των εννέα επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών. Πέντε στελέχη άνηκαν στο βασίλειο των *Βακτηρίων*, ενώ τα άλλα τέσσερα ήταν ζύμες (Πίνακας 6). Τα στελέχη FWW-9, FWW-12A, GAR-17 και GAR-22 ήταν Gram-αρνητικά, ενώ το στέλεχος GAR-20 ήταν Gram-θετικό βακτήριο.

Από τα εννέα αυτά στελέχη, δύο (FWW-9 και GAR-22) παρουσίασαν ισχυρή λιπολυτική δράση, τέσσερα ήταν ασθενώς λιπολυτικά ενώ τα εναπομείναντα (FWW-12A και FWW-12B) δεν παρουσίασαν λιπολυτική δράση.

Μόνο ένα από τα πέντε βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκε στο εμπειρικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutriend Broth (NB).

Κατά την δοκιμασία τριών φαινολικών συστατικών ως μοναδική πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη GAR-21 και GAR-22 παρουσίασαν μικρή αύξηση στο βανιλλικό και κινναμωμικό ανιόν αντίστοιχα, ενώ ικανοποιητική αύξηση στην παρουσία κινναμωμικού ανιόντος παρουσίασε το στέλεχος FWW-9.

Όλα τα στελέχη ήταν θετικά ως προς την αντίδραση της καταλάσης, αν και τα στελέχη FWW-9, GAR-15, GAR-17 και GAR-20 έδωσαν ασθενή αντίδραση.

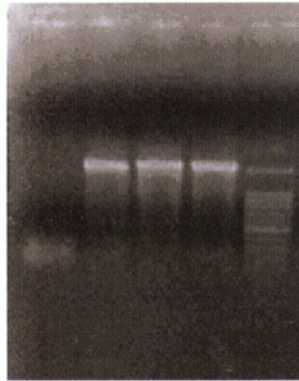
Πίνακας 6. Φυσιολογικά και χημειοταξινομικά χαρακτηριστικά βακτηρίων και ζυμών.

Στέλεχος	Κατηγορία	Καταλάση	Tween 20	Συριγγικό	Κινναμωμικό	Βανιλίνη
FWW-9	βακτήριο	l	+	-	+	-
FWW-12A	βακτήριο	p	-	-	-	-
GAR-17	βακτήριο	l	w	-	-	-
GAR-20	βακτήριο	l	-	-	-	-
GAR-22	βακτήριο	p	+	-	w	-
FWW-12B	ζύμη	p	-	-	-	-
G-old-13	ζύμη	p	w	-	-	-
GAR-15	ζύμη	l	w	-	-	-
GAR-21	ζύμη	p	w	-	-	w

∴ δεν αναπτύσσεται, για $OD_{600\text{ nm}} < 0.06$ ∴ w: ασθενή ανάπτυξη, για $0.15 > OD_{600\text{ nm}} > 0.06$ ∴ +: αναπτύσσεται, για $OD_{600\text{ nm}} > 0.15$ ∴ l: ασθενή αντίδραση ∴ p: θετική αντίδραση.

3.5. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA.

Από τα πέντε βακτηριακά στελέχη απομονώθηκε γονιδιακό DNA, η ποιότητα και ποσότητα αυτού εξαρτιόταν από την φύση του κάθε στελέχους. Πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για τα στελέχη αυτά, αλλά μέχρι στιγμής τα τρία από τα πέντε στελέχη έδωσαν προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16S rDNA (λίγο μεγαλύτερο από 1500 βάσεις), η καθαρότητα και το μέγεθος τους φαίνεται στην Εικόνα 5. Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αποθηκεύτηκαν στους -20°C , με σκοπό την μελλοντική εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδίου αυτού.



Εικόνα 5. Ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA τριών στελεχών βακτηριών.

Από αριστερά προς τα δεξιά: τυφλό, FWW-9, FWW-12A και GAR-17, και δείκτης μοριακών μεγεθών.

Πίνακας 7. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα G-old.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
G-old-1	25%	5.57	5.50	4.30	4.50	3.92	3.67	2.67	2.94	0.62 ± 0.16	2.88 ± 0.73	GI↓
G-old-2	25%	5.74	5.50	4.40	4.50	3.67	3.67	3.02	2.94	0.12 ± 0.06	2.88 ± 0.73	GI↓
G-old-3	25%	5.34	5.50	4.30	4.50	4.17	3.67	3.43	2.94	1.92 ± 0.71	2.88 ± 0.73	A↑
G-old-4	25%	5.41	5.50	4.30	4.50	4.17	3.67	3.44	2.94	1.22 ± 0.64	2.88 ± 0.73	A↑
G-old-5	25%	5.46	5.50	4.20	4.50	4.17	3.67	3.24	2.94	3.73 ± 2.10	2.88 ± 0.73	
G-old-6	25%	5.32	5.50	4.30	4.50	3.92	3.67	3.01	2.94	0.11 ± 0.07	2.88 ± 0.73	GI↓
G-old-7	25%	6.04	5.81	4.57	4.56	3.92	3.67	1.98	2.02	1.50 ± 0.75	4.26 ± 1.38	
G-old-8	25%	6.12	5.81	4.40	4.56	3.80	3.67	2.26	2.02	2.68 ± 1.03	4.26 ± 1.38	
G-old-9	25%	5.73	5.81	4.50	4.56	3.67	3.67	2.11	2.02	5.45 ± 2.11	4.26 ± 1.38	
G-old-10	25%	6.09	5.81	4.53	4.56	4.05	3.67	1.73	2.02	0.92 ± 0.61	4.26 ± 1.38	GI↓, A↑
G-old-11	25%	5.99	5.81	4.37	4.56	3.80	3.67	2.08	2.02	1.01 ± 0.28	4.26 ± 1.38	GI↓
G-old-12	25%	5.81	5.81	4.29	4.56	3.92	3.67	1.79	2.02	0.88 ± 0.24	4.26 ± 1.38	GI↓
G-old-13*	25%	6.19	5.81	4.44	4.56	3.55	3.67	2.58	2.02	10.81 ± 3.37	4.26 ± 1.38	GI↑, A↑
G-old-14	25%	6.07	5.98	4.54	4.50	3.67	3.55	1.98	1.86	14.40 ± 4.76	17.07 ± 5.04	
G-old-15	25%	6.13	6.03	4.45	4.56	3.17	3.30	2.88	1.80	14.53 ± 2.99	14.82 ± 1.44	A↑
G-old-16A	25%	6.06	6.03	4.48	4.56	3.30	3.30	2.69	1.80	4.03 ± 0.39	14.82 ± 1.44	GI↓, A↑
G-old-16B	25%	6.04	6.03	4.56	4.56	3.05	3.30	2.12	1.80	6.20 ± 2.15	14.82 ± 1.44	GI↓
G-old-17	25%	5.90	6.03	4.46	4.56	3.42	3.30	2.83	1.80	7.64 ± 3.48	14.82 ± 1.44	GI↓, A↑
G-old-18	25%	5.99	6.03	4.50	4.56	3.30	3.30	2.78	1.80	9.03 ± 3.46	14.82 ± 1.44	GI↓, A↑
G-old-19A	25%	5.16	6.03	4.75	4.56	3.30	3.30	2.14	1.80	2.60 ± 1.12	14.82 ± 1.44	GI↓, pH↓
G-old-19B	25%	4.88	6.03	4.80	4.56	3.30	3.30	1.93	1.80	0.00 ± 0.00	14.82 ± 1.44	GI↓, pH↓
G-old-20A	25%	6.04	5.98	4.50	4.50	3.55	3.55	1.89	1.86	9.00 ± 3.03	17.07 ± 5.04	
G-old-20B	25%	5.25	5.98	4.65	4.50	3.30	3.55	2.16	1.86	7.50 ± 3.30	17.07 ± 5.04	GI↓, pH↓

* επιλεγμένο στέλεχος' pH: φαινολικά' A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm' GI: δείκτης βλαστικότητας' EC: αγωγιμότητα' ↑: αύξηση' ↓: μείωση.

Πίνακας 8. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα GAR.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
GAR-2	100%	6.28	5.65	14.57	14.33	13.70	12.20	0.97	1.17	68.75 ± 3.95	74.01 ± 1.93	
GAR-3	25%	5.71	5.50	3.90	4.50	3.42	6.35	3.41	2.936	5.82 ± 2.38	2.88 ± 0.73	A↑
GAR-4	25%	5.21	5.50	4.40	4.50	3.67	3.67	2.72	2.936	2.40 ± 0.94	2.88 ± 0.73	
GAR-9	100%	5.34	5.65	14.93	14.33	13.70	12.20	1.11	1.17	61.55 ± 6.68	74.01 ± 1.93	
GAR-9B	25%	6.63	5.50	4.20	4.50	3.67	3.67	3.77	2.94	3.59 ± 0.40	2.88 ± 0.73	pH↓, A↑
GAR-10	100%	5.39	5.65	14.34	14.33	12.20	12.20	0.99	1.17	69.28 ± 9.35	74.01 ± 1.93	
GAR-12	100%	5.24	5.65	15.05	14.33	13.70	12.20	1.52	1.17	75.21 ± 4.46	74.01 ± 1.93	A↑
GAR-13A	100%	5.54	5.65	14.93	14.33	13.70	12.20	1.21	1.17	68.31 ± 6.33	74.01 ± 1.93	
GAR-13B	25%	5.47	5.98	4.59	4.50	3.55	3.55	2.01	1.86	10.79 ± 2.01	17.07 ± 5.04	
GAR-14	25%	5.59	5.50	4.30	4.50	3.55	3.67	3.34	2.94	3.24 ± 1.55	2.88 ± 0.73	A↑
GAR-15*	50%	7.53	5.81	6.52	7.86	2.85	6.35	0.46	0.26	63.70 ± 3.96	22.23 ± 4.99	GI↑, pH↓, pH↑, A↑, EC↓
GAR-16	100%	5.72	5.65	14.42	14.33	13.20	12.20	1.16	1.17	76.90 ± 0.98	74.01 ± 1.93	
GAR-17*	50%	7.89	5.81	7.83	7.86	3.60	6.35	0.60	0.26	56.40 ± 0.96	22.23 ± 4.99	GI↓, pH↓, pH↑, A↑
GAR-18	100%	5.76	5.65	14.82	14.33	12.70	12.20	1.14	1.17	61.69 ± 3.85	74.01 ± 1.93	GI↓
GAR-20*	50%	7.97	5.81	7.74	7.86	3.85	6.35	0.30	0.26	52.12 ± 1.84	22.23 ± 4.99	GI↑, pH↓, pH↑
GAR-21*	50%	7.85	5.81	7.64	7.86	4.10	6.35	0.59	0.26	70.41 ± 2.81	22.23 ± 4.99	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
GAR-22*	50%	8.57	5.81	7.91	7.86	3.35	6.35	0.70	0.26	46.02 ± 2.38	22.23 ± 4.99	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
GAR-24	25%	5.78	5.98	4.63	4.50	3.55	3.55	2.25	1.86	13.89 ± 6.20	17.07 ± 5.04	A↑
GAR-25	100%	5.74	5.65	14.75	14.33	13.20	12.20	1.19	1.17	77.74 ± 7.36	74.01 ± 1.93	
GAR-26	25%	6.81	5.50	4.00	4.50	3.67	3.67	2.79	2.94	2.10 ± 0.83	2.88 ± 0.73	pH↑, EC↓
GAR-26B	25%	7.17	5.98	4.52	4.50	3.67	3.55	1.78	1.86	5.44 ± 1.69	17.07 ± 5.04	GI↓, pH↑
GAR-27	25%	7.07	5.98	4.43	4.50	2.92	3.55	2.30	1.86	20.94 ± 8.02	17.07 ± 5.04	pH↑, A↑

* επιλεγμένο στέλεχος' pH: φαινολικά' A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm' GI: δείκτης βλαστικότητας' EC: αγωγιμότητα' ↑: αύξηση' ↓: μείωση.

Πίνακας 9. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση βακτηρίων/ζυμών που απομονώθηκαν από το δείγμα FWW.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
FWW-1	25%	5.62	5.71	5.04	5.30	0.25	2.80	1.46	1.49	2.55 ± 0.28	2.47 ± 0.85	
FWW-4A	25%	6.86	5.71	5.04	5.30	0.24	2.80	2.35	1.49	4.22 ± 2.02	2.47 ± 0.85	pH↑, A↑
FWW-4B	25%	6.79	5.71	5.22	5.30	0.30	2.80	2.53	1.49	4.16 ± 1.23	2.47 ± 0.85	pH↑, A↑
FWW-7	25%	7.35	5.71	5.11	5.30	0.24	2.80	3.38	1.49	1.42 ± 0.42	2.47 ± 0.85	pH↑, A↑
FWW-8A	25%	7.38	5.71	5.02	5.30	0.23	2.80	2.23	1.49	1.95 ± 0.64	2.47 ± 0.85	pH↑, A↑
FWW-8B	25%	6.95	5.71	5.36	5.30	0.24	2.80	2.39	1.49	3.00 ± 0.89	2.47 ± 0.85	pH↑, A↑
FWW-9*	25%	6.58	5.71	5.24	5.30	0.25	2.80	2.62	1.49	8.26 ± 0.20	2.47 ± 0.85	GI↑, pH↑, A↑
FWW-10	25%	7.45	5.71	4.59	5.30	0.20	2.80	2.15	1.49	0.94 ± 0.53	2.47 ± 0.85	GI↓, pH↓, pH↑, A↑, Ec↓
FWW-12A*	25%	8.49	5.71	5.30	5.30	0.17	2.80	3.19	1.49	15.63 ± 1.15	2.47 ± 0.85	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
FWW-12B*	25%	6.80	5.71	4.71	5.30	0.26	2.80	2.77	1.49	4.69 ± 0.27	2.47 ± 0.85	GI↑, Ec↓, pH↑, A↑
FWW-14	25%	7.03	5.96	4.46	4.57	0.21	2.67	3.65	1.73	18.11 ± 5.83	9.50 ± 4.27	pH↑, A↑
FWW-17	25%	7.52	5.96	4.34	4.57	0.24	2.67	2.54	1.73	0.55 ± 0.29	9.50 ± 4.27	GI↓, pH↑, A↑
FWW-18	25%	5.62	5.96	4.65	4.57	0.31	2.67	2.08	1.73	8.19 ± 2.78	9.50 ± 4.27	
FWW-20A	25%	7.62	5.96	4.31	4.57	0.23	2.67	2.52	1.73	1.12 ± 0.66	9.50 ± 4.27	GI↓, pH↑, A↑
FWW-20B	25%	7.53	5.96	4.40	4.57	0.23	2.67	2.56	1.73	3.06 ± 0.68	9.50 ± 4.27	GI↓, pH↑, A↑

* επιλεγμένο στέλεχος' pH: φαινολικά' A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm' GI: δείκτης βλαστικότητας' EC: αγωγιμότητα' ↑: αύξηση' ↓: μείωση.

Πίνακας 10. Κατηγορίες των απομονωθέντων βακτηριων/ζυμών, ροση των μεταβολών που προκαλούν στα ΥΑΕ.

Κατηγορίες	Μεταβολές των χαρακτηριστικών της κάθε κατηγορίας	Στελέχη
Κατηγορία 1 ^η	GI↑, pH↓, pH↑, A↑, Ec↓	GAR-15
Κατηγορία 2 ^η	GI↑, pH↓, pH↑, A↑	GAR-17, GAR-21, GAR-22, FWW-12A
Κατηγορία 3 ^η	GI↑, pH↓, pH↑	GAR-20
Κατηγορία 4 ^η	GI↑, Ec↓, pH↑, A↑	FWW-12B
Κατηγορία 5 ^η	GI↑, pH↑, A↑	FWW-9
Κατηγορία 6 ^η	GI↑, A↑	G-old-13
Κατηγορία 7 ^η	GI↓, pH↓, pH↑, A↑, Ec↓	FWW-10
Κατηγορία 8 ^η	GI↓, pH↑, A↑	FWW-17, FWW-20A, FWW-20B
Κατηγορία 9 ^η	GI↓, A↑	G-old-16A, G-old-17, G-old-18
Κατηγορία 10 ^η	GI↓A↓	G-old-10
Κατηγορία 11 ^η	GI↓, pH↓	G-old-19A, G-old-19B, G-old-20B
Κατηγορία 12 ^η	GI↓, pH↑	GAR-26B
Κατηγορία 13 ^η	GI↓	G-old-1, G-old-2, G-old-6, G-old-11, G-old-12, G-old-16B, G-old-18
Κατηγορία 14 ^η	pH↑, A↑	FWW-4A, FWW-4B, FWW-7, FWW-8A, FWW-8B, FWW-14, GAR-9B, GAR-27
Κατηγορία 15 ^η	pH↑, Ec↓	GAR-26
Κατηγορία 16 ^η	A↑	GAR-3, GAR-12, GAR-14, GAR-24, G-old-3, G-old-4, G-old-15
Κατηγορία 17 ^η		GAR-2, GAR-4, GAR-9, GAR-10, GAR-13A, GAR-13B, GAR-16, GAR-25, FWW-1, FWW-18, G-old-5, G-old-7, G-old-8, G-old-9, G-old-14, G-old-20A

* pH: φαινολικά A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm GI: δείκτης βλαστικότητας EC: αγωγιμότητα ↑ αύξηση ↓ μείωση.

Πίνακας 11. Βιοαποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση των επιλεγμένων βακτηριων/ζυμών.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
FWW-9	25%	6.34 ± 0.05	5.85 ± 0.01	4.05 ± 0.02	4.16 ± 0.01	2.04 ± 0.01	2.42 ± 0.01	1.76 ± 0.04	1.94 ± 0.02	76.40 ± 5.83	3.24 ± 0.96	GI↑, pH↓, pH↑
FWW-12A	25%	8.46 ± 0.04	5.85 ± 0.01	4.21 ± 0.01	4.16 ± 0.01	1.37 ± 0.01	2.42 ± 0.01	2.00 ± 0.02	1.94 ± 0.02	58.20 ± 6.33	3.24 ± 0.96	GI↑, pH↓, pH↑
FWW-12B	25%	5.75 ± 0.09	5.85 ± 0.01	4.21 ± 0.01	4.16 ± 0.01	1.94 ± 0.01	2.42 ± 0.01	1.37 ± 0.02	1.94 ± 0.02	54.50 ± 0.71	3.24 ± 0.96	GI↑, pH↓, A↓
G-old-13	25%	6.60 ± 0.01	5.90 ± 0.01	5.21 ± 0.05	5.31 ± 0.03	3.77 ± 0.01	3.42 ± 0.01	1.29 ± 0.06	0.80 ± 0.02	24.71 ± 2.77	11.65 ± 0.91	GI↑, pH↑, A↑
GAR-15	25%	8.57 ± 0.02	5.90 ± 0.01	5.21 ± 0.04	5.31 ± 0.03	2.13 ± 0.01	3.42 ± 0.01	1.61 ± 0.09	0.80 ± 0.02	34.52 ± 4.38	11.65 ± 0.91	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
GAR-17	25%	6.23 ± 0.02	5.81 ± 0.02	4.83 ± 0.02	4.97 ± 0.01	2.82 ± 0.01	3.14 ± 0.01	1.33 ± 0.10	0.81 ± 0.06	42.16 ± 0.53	17.07 ± 3.20	GI↑, A↑
GAR-20	25%	6.88 ± 0.04	5.81 ± 0.02	4.98 ± 0.02	4.97 ± 0.01	2.92 ± 0.01	3.14 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.81 ± 0.06	46.90 ± 1.15	17.07 ± 3.20	GI↑, pH↑
GAR-21	25%	6.84 ± 0.02	5.81 ± 0.02	4.90 ± 0.01	4.97 ± 0.01	2.58 ± 0.01	3.14 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.81 ± 0.06	30.60 ± 4.27	17.07 ± 3.20	GI↑, pH↓, pH↑
GAR-22	25%	6.96 ± 0.01	5.81 ± 0.02	4.78 ± 0.01	4.97 ± 0.01	2.89 ± 0.01	3.14 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.81 ± 0.06	46.90 ± 0.89	17.07 ± 3.20	GI↑, pH↑

* pH: φαινολικά A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm GI: δείκτης βλαστικότητας EC: αγωγιμότητα ↑ αύξηση ↓ μείωση.

3.6. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με την χρήση μυκήτων.

Οι μύκητες που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να βιοαποικοδομούν τόσο υγρά όσο και στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων. Για να διαπιστωθεί εάν κάποιος από τους μύκητες που απομονώθηκαν διέθετε την ικανότητα μεταβολής της χημικής σύνθεσης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων και της βιοτοξικότητας αυτών, ΥΑΕ εμβολιάστηκαν με αυτές τις απομονώσεις. Στα δείγματα αυτά μετρήθηκαν οι ίδιοι παράμετροι όπως και στην περίπτωση των βακτηριακών απομονώσεων.

Στους Πίνακες 12, 13 και 14 δίδονται συνολικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ που είχαν εμβολιαστεί με κάποιο από τα στελέχη μυκήτων καθώς και οι αντίστοιχες μετρήσεις του μάρτυρα.

Βάση των μεταβολών στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και στη βιοτοξικότητα, τα στελέχη μυκήτων διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες (Πίνακας 15):

Κατηγορία 1^η: Οι μύκητες της πρώτης κατηγορίας αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), μείωναν το φαινολικό φορτίο, και αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 2^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας), το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 3^η: Οι μύκητες της τρίτης κατηγορίας αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας) και το pH.

Κατηγορία 4^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην τέταρτη κατηγορία αύξαναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (μείωση φυτοτοξικότητας).

Κατηγορία 5^η: Οι μύκητες της πέμπτης κατηγορίας προκαλούσαν μείωση της απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 6^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην έκτη κατηγορία αύξαναν το pH και μείωναν την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 7^η: Οι μύκητες της έβδομης κατηγορίας αύξαναν το pH.

Κατηγορία 8^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην όγδοη κατηγορία προκαλούσαν μείωση του δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας) και της απορρόφησης του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 9^η: Οι μύκητες της ένατης κατηγορίας αύξαναν την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 10^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην δέκατη κατηγορία αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 11^η: Οι μύκητες της ενδέκατης κατηγορίας μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας).

Κατηγορία 12^η: Οι μύκητες που ανήκουν στην δωδέκατη κατηγορία μείωναν τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (αύξηση φυτοτοξικότητας), αύξαναν το pH και την απορρόφηση του φωτός στα 525 nm.

Κατηγορία 13^η: Οι μύκητες της δέκατης τρίτης κατηγορίας δεν προκαλούσαν κάποια μεταβολή στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ.

Βάση των αποτελεσμάτων, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις βιοαποικοδόμησης των ΥΑΕ από τους μύκητες που ανήκουν στις τέσσερις πρώτες ομάδες. Η πειραματική διαδικασία για τους δεκαεννέα αυτούς μύκητες επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στον Πίνακα 16 παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών.

Από την μελέτη των δεκαεννέα επιλεγμένων στελεχών μυκήτων, η πλειονότητα αυτών (δεκαπέντε στελέχη) προκάλεσε αποχρωματισμό των ΥΑΕ κατά 18 έως 55 % (ανάλογα με το στέλεχος) σε σχέση με τον μάρτυρα. Επισημαίνεται ότι δώδεκα από αυτά τα στελέχη προκάλεσαν αποχρωματισμό των ΥΑΕ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% (Πίνακας 16). Επίσης δώδεκα στελέχη μυκήτων μείωναν το ολικό φαινολικό φορτίο κατά ποσοστό μεγαλύτερο του 10%. Μάλιστα τα στελέχη F-GAR-25, F-G-old 25, F-FWW-3A, F-FWW-14, F-FWW-15 προκάλεσαν μείωση των φαινολικών κατά ποσοστό 25 έως 30%. Σε οχτώ στελέχη μυκήτων παρουσιάστηκε αύξηση του pH των ΥΑΕ, ενώ επισημαίνεται ότι δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην αγωγιμότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων. Τέλος, όλα τα στελέχη παρουσίασαν αύξηση της βλαστικότητας κατά ποσοστό τουλάχιστον 100%. Στην περίπτωση των στελεχών F-GAR-25, F-G-old-17, F-G-old-19, F-G-old-20, F-G-old-25, F-FWW-14 και F-FWW-15, παρατηρήθηκε μείωση της φυτοτοξικότητας κατά 2.5 έως 4 φορές.

Πίνακας 12. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα FWW.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
F-FWW-1A	25%	5.95	5.66	4.85	4.93	2.42	2.67	1.90	1.84	12.75 ± 3.85	8.85 ± 3.38	
F-FWW-1B	25%	5.91	5.66	4.89	4.93	2.80	2.67	2.11	1.84	2.70 ± 1.26	8.85 ± 3.38	GI↓
F-FWW-2	25%	6.17	5.87	4.41	4.36	3.17	3.17	2.30	1.72	8.25 ± 2.03	8.30 ± 3.79	A↑
F-FWW-3*	25%	6.36	5.66	4.80	4.93	2.55	2.67	1.75	1.84	30.29 ± 8.52	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-3A*	25%	6.06	5.66	4.66	4.93	2.42	2.67	1.80	1.84	24.23 ± 5.45	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-3B	25%	5.96	5.66	4.75	4.93	2.80	2.67	2.04	1.84	20.07 ± 6.17	8.85 ± 3.38	
F-FWW-5	25%	6.27	5.87	4.41	4.36	2.92	3.17	1.70	1.72	4.67 ± 0.61	8.30 ± 3.79	
F-FWW-6	25%	6.18	5.87	4.51	4.36	3.05	3.17	1.91	1.72	6.00 ± 0.18	8.30 ± 3.79	
F-FWW-7*	25%	6.92	5.95	4.50	4.53	2.55	3.17	2.52	1.88	21.19 ± 2.74	13.55 ± 0.72	GI↑, pH↑
F-FWW-8	25%	6.64	5.95	4.57	4.53	3.17	3.17	2.20	1.88	14.44 ± 1.69	13.55 ± 0.72	pH↑
F-FWW-9	25%	6.86	5.95	4.47	4.53	2.67	3.17	2.16	1.88	13.95 ± 1.58	13.55 ± 0.72	pH↑
F-FWW-10B	25%	6.80	5.95	4.42	4.53	2.92	3.17	2.10	1.88	13.90 ± 2.36	13.55 ± 0.72	pH↑
F-FWW-12	25%	6.86	5.95	4.47	4.53	2.80	3.17	2.52	1.88	16.68 ± 1.56	13.55 ± 0.72	pH↑, A↓
F-FWW-12	25%	5.90	5.66	4.92	4.93	2.80	2.67	2.04	1.84	8.92 ± 3.67	8.85 ± 3.38	
F-FWW-12A	25%	6.01	5.66	4.88	4.93	2.92	2.67	1.77	1.84	7.64 ± 3.03	8.85 ± 3.38	
F-FWW-12B*	25%	5.90	5.66	4.70	4.93	2.55	2.67	1.87	1.84	27.05 ± 7.19	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-14*	100%	8.28	5.42	15.27	14.59	7.70	14.70	3.75	1.94	45.63 ± 0.46	8.38 ± 1.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-FWW-15*	100%	8.22	5.42	14.55	14.59	8.20	14.70	3.75	1.94	78.32 ± 8.30	8.38 ± 1.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-FWW-17	100%	5.27	5.42	14.48	14.59	14.70	14.70	1.65	1.94	1.06 ± 0.52	8.38 ± 1.95	GI↓, A↓
F-FWW-18*	25%	5.97	5.66	4.70	4.93	2.30	2.67	1.95	1.84	26.29 ± 2.03	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-18A*	25%	5.90	5.66	4.60	4.93	2.42	2.67	1.75	1.84	30.65 ± 0.93	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-18B*	25%	5.96	5.66	4.58	4.93	2.55	2.67	1.76	1.84	39.57 ± 7.95	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-20	100%	5.23	5.42	14.34	14.59	14.20	14.70	1.58	1.94	2.22 ± 0.51	8.38 ± 1.95	GI↓, A↓
F-FWW-21	100%	5.37	5.42	14.21	14.59	12.20	14.70	1.79	1.94	12.02 ± 3.91	8.38 ± 1.95	
F-FWW-22	100%	5.13	5.42	14.30	14.59	14.20	14.70	1.56	1.94	2.17 ± 0.34	8.38 ± 1.95	GI↓, A↓
F-FWW-23	100%	5.17	5.42	15.09	14.59	13.70	14.70	1.60	1.94	3.72 ± 0.77	8.38 ± 1.95	GI↓, A↓
F-FWW-24	100%	5.66	5.42	15.03	14.59	13.70	14.70	2.14	1.94	13.94 ± 1.92	8.38 ± 1.95	
F-FWW-25*	25%	6.13	5.66	4.76	4.93	2.80	2.67	1.88	1.84	34.85 ± 2.12	8.85 ± 3.38	GI↑
F-FWW-26	100%	5.16	5.42	14.80	14.59	14.20	14.70	1.40	1.94	5.35 ± 1.60	8.38 ± 1.95	A↓

* επιλεγμένο στέλεχος' pH: φαινολικά' A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm' GI: δείκτης βλαστικότητας' EC: αγωγιμότητα' ↑: αύξηση' ↓: μείωση.

Πίνακας 13. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα G-old.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
F-G-OLD-1	25%	7.19	5.89	5.56	5.74	2.17	1.92	1.30	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-2A	25%	6.48	5.89	5.5	5.74	2.67	1.92	1.36	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-2B	25%	6.35	5.89	5.49	5.74	2.55	1.92	1.38	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-3	25%	6.45	5.89	5.49	5.74	2.42	1.92	1.23	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-4	25%	6.16	5.89	5.61	5.74	2.30	1.92	1.11	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓
F-G-OLD-5	25%	6.43	5.89	5.60	5.74	2.17	1.92	1.13	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓
F-G-OLD-6	25%	6.29	5.89	5.71	5.74	2.17	1.92	1.08	0.96	0.00 ± 0.00	5.12 ± 3.72	GI↓
F-G-OLD-7	25%	5.67	5.95	5.39	5.65	2.42	2.05	0.95	0.98	0.00 ± 0.00	21.17 ± 2.04	GI↓
F-G-OLD-8	25%	6.09	5.95	5.43	5.65	2.42	2.05	1.12	0.98	0.00 ± 0.00	21.17 ± 2.04	GI↓
F-G-OLD-9	25%	6.04	5.95	5.53	5.65	2.30	2.05	1.08	0.98	0.00 ± 0.00	21.17 ± 2.04	GI↓
F-G-OLD-10	25%	6.08	5.95	5.43	5.65	2.05	2.05	1.06	0.98	0.00 ± 0.00	21.17 ± 2.04	GI↓
F-G-OLD-11	25%	7.33	5.95	5.62	5.65	2.42	2.05	1.21	0.98	12.22 ± 3.12	21.17 ± 2.04	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-12	25%	5.66	5.95	5.45	5.65	2.30	2.05	0.96	0.98	15.04 ± 5.18	21.17 ± 2.04	
F-G-OLD-13	25%	6.04	5.95	5.35	5.65	2.30	2.05	1.22	0.98	0.00 ± 0.00	21.17 ± 2.04	GI↓
F-G-OLD-14	25%	5.89	5.94	5.65	5.76	2.05	2.05	1.22	1.08	0.00 ± 0.00	14.51 ± 1.32	GI↓
F-G-OLD-15	25%	7.06	5.94	5.69	5.76	2.05	2.05	1.31	1.08	12.05 ± 3.16	14.51 ± 1.32	pH↑, A↑
F-G-OLD-16	25%	5.65	5.94	5.65	5.76	2.17	2.05	1.12	1.08	0.00 ± 0.00	14.51 ± 1.32	GI↓
F-G-OLD-17*	25%	7.00	5.94	5.47	5.76	2.05	2.05	1.17	1.08	35.22 ± 2.56	14.51 ± 1.32	GI↑, pH↑
F-G-OLD-18	25%	5.55	5.94	5.51	5.76	2.17	2.05	1.05	1.08	0.00 ± 0.00	14.51 ± 1.32	GI↓
F-G-OLD-19*	25%	8.18	5.94	5.94	5.76	2.17	2.05	1.78	1.08	30.10 ± 0.78	14.51 ± 1.32	GI↑, pH↑, A↑
F-G-OLD-20*	25%	7.06	5.94	5.57	5.76	2.42	2.05	1.36	1.08	38.14 ± 5.72	14.51 ± 1.32	GI↑, pH↑, A↑
F-G-OLD-21	25%	6.72	5.99	5.81	5.70	2.30	2.05	2.00	1.09	0.00 ± 0.00	18.22 ± 5.16	GI↓, pH↑, A↑
F-G-OLD-22	25%	8.36	5.99	5.49	5.70	2.30	2.05	2.08	1.09	15.12 ± 4.06	18.22 ± 5.16	pH↑, A↑
F-G-OLD-23	25%	6.16	5.99	5.51	5.70	2.30	2.05	1.28	1.09	0.00 ± 0.00	18.22 ± 5.16	GI↓
F-G-OLD-25*	25%	8.16	5.99	5.38	5.71	1.30	2.05	1.67	1.09	37.04 ± 2.18	18.22 ± 5.16	GI↑, pH↓, pH↑, A↑

* επιλεγμένο στέλεχος ρh: φαινολικά A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm GI: δείκτης βλαστικότητας EC: αγωγιμότητα ↑: αύξηση ↓: μείωση.

Πίνακας 14. Βιοαποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων που απομονώθηκαν από το δείγμα GAR.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
F-GAR-1*	25%	7.98	6.04	3.19	3.18	2.17	2.92	1.06	0.71	39.10 ± 4.02	18.18 ± 2.18	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-GAR-2*	25%	7.86	6.04	3.25	3.18	2.17	2.92	1.08	0.71	30.20 ± 0.18	18.18 ± 2.18	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-GAR-12	25%	7.91	6.04	3.41	3.18	2.42	2.92	1.11	0.71	16.12 ± 1.28	18.18 ± 2.18	pH↑, A↑
F-GAR-23A*	25%	7.85	6.04	3.35	3.18	2.30	2.92	1.08	0.71	36.10 ± 3.13	18.18 ± 2.18	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-GAR-23B*	25%	8.1	6.04	3.32	3.18	2.05	2.92	1.15	0.71	36.14 ± 2.55	18.18 ± 2.18	GI↑, pH↓, pH↑, A↑
F-GAR-25	25%	8.12	6.04	3.25	3.18	1.92	2.92	1.25	0.71	42.15 ± 2.21	18.18 ± 2.18	GI↑, pH↓, pH↑, A↑

* επιλεγμένο στέλεχος ρh: φαινολικά A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm GI: δείκτης βλαστικότητας EC: αγωγιμότητα †: αύξηση ‡: μείωση.

Πίνακας 15. Κατηγορίες των απομονωθέντων μυκήτων, βάση των μεταβολών που προκάλεσαν στα ΥΑΕ.

Κατηγορίες	Μεταβολές των χαρακτηριστικών της κάθε κατηγορίας	Στελέχη
Κατηγορία 1 ^η	GI↑, pH↓, pH↑, A↑	F-FWW-14, F-FWW-15, F-GAR-1, F-GAR-2, F-GAR-23A, F-GAR-23B, F-GAR-25, F-G-old-25
Κατηγορία 2 ^η	GI↑, pH↑, A↑	F-G-old-19, F-G-old-20
Κατηγορία 3 ^η	GI↑, pH↑	F-FWW-7, F-G-old-17
Κατηγορία 4 ^η	GI↑	F-FWW-3, F-FWW-3A, F-FWW-12B, F-FWW-18A, F-FWW-18B, F-FWW-18, F-FWW-25
Κατηγορία 5 ^η	A↓	F-FWW-26
Κατηγορία 6 ^η	pH↑, A↓	F-FWW-12
Κατηγορία 7 ^η	pH↑	F-FWW-8, F-FWW-9, F-FWW-10B
Κατηγορία 8 ^η	GI↓, A↓	F-FWW-17, F-FWW-20, F-FWW-22, F-FWW-23
Κατηγορία 9 ^η	A↑	F-FWW-2
Κατηγορία 10 ^η	pH↑, A↑	F-GAR-12, F-G-old-15, F-G-old-22
Κατηγορία 11 ^η	GI↓	F-FWW-1B, F-G-old-4, F-G-old-5, F-G-old-6, F-G-old-7, F-G-old-8, F-G-old-9, F-G-old-10, F-G-old-13, F-G-old-14, F-G-old-16, F-G-old-18, F-G-old-23
Κατηγορία 12 ^η	GI↓, pH↑, A↑	F-G-old-1, F-G-old-2A, F-G-old-2B, F-G-old-3, F-G-old-11, F-G-old-21
Κατηγορία 13 ^η	GI↓	F-G-old-1, F-G-old-2, F-G-old-6, F-G-old-11, F-G-old-12, F-G-old-16B, F-G-old-18

* ρh: φαινολικά A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm GI: δείκτης βλαστικότητας EC: αγωγιμότητα †: αύξηση ‡: μείωση.

Πίνακας 16. Βιοαποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση των επιλεγμένων μυκήτων.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Ποσοστό ΥΑΕ	pH		EC (mS cm ⁻¹)		Φαινολικά (mg ml ⁻¹)		A (525 nm)		GI (%)		Μεταβολές χαρακτηριστικών
		Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	Δείγματος	Μάρτυρα	
F-GAR-1	25%	5.98 ± 0.02	5.73 ± 0.02	3.96 ± 0.02	3.92 ± 0.01	2.72 ± 0.00	2.92 ± 0.01	1.26 ± 0.03	2.17 ± 0.03	35.12 ± 3.48	17.54 ± 1.12	GI↑, A↓
F-GAR-2	25%	6.05 ± 0.02	5.73 ± 0.02	3.94 ± 0.02	3.92 ± 0.01	2.73 ± 0.01	2.92 ± 0.01	1.27 ± 0.02	2.17 ± 0.03	34.18 ± 3.14	17.54 ± 1.12	GI↑, A↓
F-GAR-23A	25%	6.42 ± 0.02	5.73 ± 0.02	3.89 ± 0.02	3.92 ± 0.01	2.66 ± 0.01	2.92 ± 0.01	1.41 ± 0.01	2.17 ± 0.03	35.74 ± 2.12	17.54 ± 1.12	GI↑, A↓
F-GAR-23B	25%	6.51 ± 0.07	5.73 ± 0.02	3.93 ± 0.00	3.92 ± 0.01	2.60 ± 0.00	2.92 ± 0.01	1.55 ± 0.10	2.17 ± 0.03	38.52 ± 1.02	17.54 ± 1.12	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-GAR-25	25%	7.61 ± 0.07	5.73 ± 0.02	3.94 ± 0.02	3.92 ± 0.01	2.15 ± 0.00	2.92 ± 0.01	2.82 ± 0.06	2.17 ± 0.03	48.17 ± 3.64	17.54 ± 1.12	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-G-old-17	25%	6.34 ± 0.01	5.94 ± 0.03	3.89 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.79 ± 0.00	3.14 ± 0.00	1.59 ± 0.05	2.42 ± 0.01	32.24 ± 4.05	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, A↓
F-G-old-19	25%	7.73 ± 0.01	5.94 ± 0.03	4.05 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.77 ± 0.00	3.14 ± 0.00	1.99 ± 0.02	2.42 ± 0.01	41.10 ± 2.58	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-G-old-20	25%	6.82 ± 0.02	5.94 ± 0.03	3.86 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.59 ± 0.01	3.14 ± 0.00	1.46 ± 0.11	2.42 ± 0.01	50.97 ± 4.12	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-G-old-25	25%	7.93 ± 0.02	5.94 ± 0.03	4.12 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.32 ± 0.00	3.14 ± 0.00	2.20 ± 0.04	2.42 ± 0.01	41.74 ± 2.38	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑
F-FWW-3	25%	6.37 ± 0.05	5.73 ± 0.02	3.93 ± 0.00	3.92 ± 0.01	2.47 ± 0.00	2.92 ± 0.01	1.46 ± 0.09	2.17 ± 0.03	36.14 ± 3.15	17.54 ± 1.12	GI↑, pH↓, A↓
F-FWW-3A	25%	6.31 ± 0.04	5.94 ± 0.03	3.90 ± 0.03	3.93 ± 0.05	2.38 ± 0.00	3.14 ± 0.00	1.46 ± 0.07	2.42 ± 0.01	27.20 ± 1.04	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, A↓
F-FWW-7	25%	6.35 ± 0.07	5.94 ± 0.03	3.83 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.76 ± 0.01	3.14 ± 0.01	1.55 ± 0.01	2.42 ± 0.01	25.82 ± 0.88	12.28 ± 0.95	GI↑, A↓
F-FWW-12B	25%	6.03 ± 0.01	5.73 ± 0.02	3.94 ± 0.00	3.92 ± 0.01	2.72 ± 0.00	2.92 ± 0.01	1.20 ± 0.04	2.17 ± 0.03	36.88 ± 4.70	17.54 ± 1.12	GI↑, A↓
F-FWW-14**	25%	7.48 ± 0.08	5.94 ± 0.03	3.93 ± 0.02	3.93 ± 0.05	2.19 ± 0.00	3.14 ± 0.01	1.35 ± 0.12	2.22 ± 0.01	48.32 ± 3.04	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-FWW-15**	25%	7.50 ± 0.04	5.94 ± 0.03	3.91 ± 0.05	3.93 ± 0.05	2.26 ± 0.00	3.14 ± 0.01	1.29 ± 0.04	2.22 ± 0.01	54.30 ± 2.13	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↓
F-FWW-18	25%	6.25 ± 0.03	5.73 ± 0.02	3.96 ± 0.02	3.92 ± 0.01	2.53 ± 0.01	2.92 ± 0.01	1.38 ± 0.01	2.17 ± 0.03	34.41 ± 2.18	17.54 ± 1.12	GI↑, pH↓, A↓
F-FWW-18A	25%	6.13 ± 0.00	5.73 ± 0.02	3.93 ± 0.01	3.92 ± 0.01	2.73 ± 0.01	2.92 ± 0.01	1.43 ± 0.01	2.17 ± 0.03	37.81 ± 1.36	17.54 ± 1.12	GI↑, A↓
F-FWW-18B	25%	6.10 ± 0.06	5.73 ± 0.02	3.94 ± 0.00	3.92 ± 0.01	2.47 ± 0.00	2.92 ± 0.01	1.75 ± 0.02	2.17 ± 0.03	36.13 ± 2.10	17.54 ± 1.12	GI↑, pH↓, A↓
F-FWW-25	25%	6.67 ± 0.08	5.94 ± 0.03	3.79 ± 0.01	3.93 ± 0.05	2.75 ± 0.00	3.14 ± 0.00	1.65 ± 0.04	2.42 ± 0.01	27.70 ± 0.92	12.28 ± 0.95	GI↑, pH↓, pH↑, A↓

* επιλεγμένο στέλεχος' rh: φαινολικά' A: απορρόφηση του φωτός στο 525 nm' GI: δείκτης βλαστικότητας' EC: αγωγιμότητα' ↑: αύξηση' ↓: μείωση.

**1:4, (δείγμα:H₂O) αραιώση, για τη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός στα 525 nm, του δείγματος και του μάρτυρα αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συζήτηση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και επιλογή μικροοργανισμών ικανών να βιοαποικοδομούν τόσο τα στερεά όσο και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή φυτοτοξική και αντιμικροβιακή δράση.

Από την μελέτη του μικροβιακού φορτίου το δείγμα GAR, που παραλήφθηκε τον Γενάρη του 2004, παρουσίασε το μικρότερο μικροβιακό φορτίο με την μεγαλύτερη βιοτοξικότητα. Από το δείγμα αυτό απομονώθηκε η πλειονότητα των επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών, ενώ ο αριθμός των απομονωμένων μυκήτων ήταν ο μικρότερος. Το γεγονός αυτό, πιθανώς να οφείλεται στο ό,τι τα συγκεκριμένα βακτήρια και ζύμες, σε σχέση με τα στελέχη μυκήτων, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε τοξικό περιβάλλον, προσαρμόζοντας την φυσιολογία τους στις ακραίες συνθήκες των υγρών αποβλήτων.

Η κατηγοριοποίηση των εξήντα ένα στελεχών βακτηρίων και ζυμών και των πενήντα οχτώ απομονώσεων μυκήτων σε δεκαεπτά και δεκατρείς ομάδες αντίστοιχα, συνηγορεί στην ύπαρξη τουλάχιστον του ιδίου αριθμού στελεχών μικροοργανισμών (τουλάχιστον τριάντα στελέχη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων, συνολικά), αφού οι ιδιαίτερες μεταβολές που παρατηρήθηκαν σε κάθε μία από τις κατηγορίες αυτές πιστοποιούν την ύπαρξη ξεχωριστού μηχανισμού προσαρμογής των μικροοργανισμών αυτών στο απόβλητο αυτό.

Με βάση τα αποτελέσματα των μεταβολών των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ, μετά την επεξεργασία τους με τα επιλεγμένα στελέχη, παρατηρήθηκε ότι όλα τα επιλεγμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προκαλούν σημαντική αύξηση της βλαστικότητας, και μείωση του φαινολικού φορτίου και του χρώματος. Οι μεταβολές των χαρακτηριστικών αυτών, σε τρία από τα πέντε και τρία από τα τέσσερα επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών αντίστοιχα, ήταν εξαιρετικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια FWW-9, FWW-12A και η ζύμη FWW-12B αύξαναν την βλαστικότητα από δεκατρείς έως δεκαεπτά φορές. Το βακτηριακό στέλεχος FWW-12A και τα στελέχη ζυμών GAR-15 και GAR-21 μείωναν το ολικό φαινολικό φορτίο κατά 25 έως 43%, ενώ το βακτήριο GAR-22 προκάλεσε αποχρωματισμό των ΥΑΕ κατά 17%. Ανάλογες μεταβολές αυτών των χαρακτηριστικών έχουν αναφερθεί σε πειράματα με τα βακτήρια *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* και *Lactobacillus*

plantarum. Το βακτήριο *Azotobacter chroococcum* προκαλούσε αύξηση της βλαστικότητας κατά 30% και μείωση του COD κατά 73% (Bořja *et al.*, 1993). Το βακτήριο *Lactobacillus plantarum* προκαλούσε μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών κατά 46%, του χρώματος κατά 58% και του COD κατά 55% (Ayed *et al.*, 2003). Εντούτοις η συγκέντρωση των ΥΑΕ που χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό υπόστρωμα στα πειράματα με τα βακτήρια *Azotobacter chroococcum* και *Lactobacillus plantarum* ήταν 15 και 10% αντίστοιχα, ενώ στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση των ΥΑΕ ήταν τουλάχιστον 25%. Το βακτήριο *Azotobacter vinelandii* προκαλούσε αύξηση της βλαστικότητας κατά 104% κατά την επεξεργασία ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% (Chatjiravlidis *et al.*, 1996), αφού όμως είχε προηγηθεί κατεργασία των ΥΑΕ με άλκαλι και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Στελέχη ζυμών, όπως *Candida crusei*, *Saccharomyces chevalerie* και *Saccharomyces rouxii*, τα οποία έχουν την ικανότητα να μειώνουν το COD έχουν επίσης αναφερθεί (Gharsallah, 1993). Στην περίπτωση των στελεχών μυκήτων, πέντε από τα δεκαεννέα επιλεγμένα στελέχη μείωναν τα ολικά φαινολικά συστατικά κατά 24 έως 30% (F-GAR-25, F-G-old-25, F-FWW-3A, F-FWW-14 και F-FWW-15). Τα στελέχη F-GAR-25, F-G-old-17, F-G-old-19, F-G-old-20, F-G-old-25, F-FWW-14 και F-FWW-15, παρουσίαζαν και σημαντική μείωση της φυτοτοξικότητας (2.5 έως 4 φορές). Αποχρωματισμό των ΥΑΕ, από 35 έως 55%, προκάλεσαν σχεδόν όλοι οι επιλεγμένοι μύκητες. Παρόμοια μείωση του χρώματος και των φαινολικών συστατικών έχουν επίσης αναφερθεί σε πειράματα τα οποία είχαν πραγματοποιηθεί με την χρήση των μυκήτων *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochaete chrysosporium* και βασιδιομύκητα Euc-1 (Yesilada *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 2004). Εντούτοις, καμία πληροφορία δεν δίδεται σχετικά με το αν το επεξεργασμένο απόβλητο παρουσίαζε μείωση της φυτοτοξικότητας του.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του φαινολικού φορτίου και της βλαστικότητας, εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της μείωσης του φαινολικού φορτίου με την αύξηση της βλαστικότητας των ΥΑΕ (Πίνακες 11 και 16). Διαπιστώνεται ότι όχι όλες, αλλά τρεις από τις τέσσερις επιλεγμένες ζύμες, δύο από τα πέντε επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και δεκατέσσερις από τις δεκαεννέα απομονώσεις επιλεγμένων μυκήτων παρουσίασαν ταυτόχρονη μείωση φαινολικού φορτίου και φυτοτοξικότητας.

Όλα τα επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών έδωσαν θετική αντίδραση καταλάσης. Αυτό πιθανώς να πιστοποιεί ένα παράπλευρο μηχανισμό αντοχής σε περιβάλλον που περιέχει μεγάλη συγκέντρωση ριζών υπεροξειδίου ή/και την ικανότητα αποικοδόμησης του δείγματος εξαιτίας της οξειδωσης, βιολογικής ή μη, μέσω του μηχανισμού των ριζών του υπεροξειδίου.

Περαιτέρω μελέτη βασικών φυσιολογικών και χημειοταξινομικών χαρακτηριστικών των επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών έδειξε ότι η πλειονότητα αυτών παρουσιάζουν

λιπολυτική δράση (βακτήρια FWW-9, GAR-17, GAR-22 και ζύμες G-old-13, GAR-15, GAR-21). Γενικά, τα ΥΑΕ παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση λιπαρών συστατικών, τα οποία είναι δυνατό να δράσουν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Rodriguez *et al.*, 1988: Borja *et al.*, 1990). Είναι λοιπόν αναμενόμενο οι λιπολυτικοί μικροοργανισμοί να ευνοούνται σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσεως λιπαρής ύλης.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γονιδιακού DNA των επιλεγμένων βακτηρίων καθώς και ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA σε τρία από τα πέντε επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων για τα οποία πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), με σκοπό την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων. Η εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων των γονιδίων 16S rDNA και 18S rDNA στην περίπτωση των επιλεγμένων βακτηρίων και μυκήτων (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών) αντίστοιχα θα συμβάλει στην εύρεση της φυλογενετικής θέσης των στελεχών αυτών, δίδοντας χρήσιμες πληροφορίες για την φυσιολογία αυτών και την τυχόν συγγένεια τους με άλλους μικροοργανισμούς, των οποίων ο μηχανισμός αποικοδόμησης φαινολικών/αρωματικών συστατικών είναι γνωστός.

Περαιτέρω διερεύνηση του μεταβολισμού διαφόρων φαινολικών συστατικών ως την μοναδική πηγή άνθρακα θα μπορούσε να συμβάλει στην κατανόηση του μηχανισμού αποικοδόμησης φαινολικών συστατικών κατά την χρήση των επιλεγμένων αυτών στελεχών.

Τέλος, τα επιλεγμένα αυτά στελέχη βακτηρίων και μυκήτων (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών) (Πίνακες 11 και 16), που αποικοδομούν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για την μελέτη της συνεργιστικής δράσης αυτών, είτε με την χρήση των στελεχών κάθε κατηγορίας μικροοργανισμών ξεχωριστά ή με την χρήση όλων των επιλεγμένων στελεχών (bacterial and fungal consortium).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alburquerque, J. A., Gonzalvez, J., Garcia, D. And Gegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* **91**, 195-200.
- Aliotta, G., Gafiero, G., De Feo, V., Di Blasio, V., Iacovino, R. and Oliva, A. (2000). Allelochemicals from rue (*Ruta Graveolens* L.) and olive (*Olea Europa* L.) oil mill waste as potential pesticides. *Current Topics in Phytochemistry* **3**, 167-177.
- Amirante, and Di Renzo, G. C. (1990). Impianti di concentrazione termica e di osmosi per la depurazione dei reflui oleari. Tecnologie per lo smaltimento e la riutilizzazione dei fanghi, 177. In: *Olio d'oliva e olive da tavola: tecnologia e qualita*. Accademia Nazionale dell'Olivo, Pescara, Italy.
- Andreoni, V., Bonfanti, , Daffonchio, D., Sorlini, C. and Villa, M. (1993). Anaerobic digestion of olive mill effluents: microbiological and processing aspects. *Journal of Environmental Science and Health* **A28**, 2041-2059.
- 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.
- Arnold, T. and Targett N. M. (2000). Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1393-1410.
- Ayed, L. and Hamdi, M. (2003). Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 59-65.
- Balice, V., Boari, G., Cera, O. and Abbaticchio, (1982). Indagine analitica sulle acque di vetetazione. *Inquinamento* **8**, 49-53.
- 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.

- 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.
- Bonari, E., Macchia, M., Angelini, L. G. and Ceccarini, L. (1993). The wastewaters from olive oil extraction: their influence on the germinative characteristics of some cultivated and weed species. *Agricoltura Mediterranea* **123**, 273-280.
- Borja, R., Banks, C. J., Alba, J. and Escobar, J. (1995). The temperatures dependence of the kinetic parameters derived for the aerobic treatment of wastewater from the washing of olive prior to the oil production process. *Journal of Environmental Science and Health* **30**, 1693-1705.
- Borja, R., Garrido, S. E., Martinez, L., Ramos-Comenzana, A. and Martin, A. (1993). Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry* **28**, 397-404.
- Borja, R. 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., Martin, A., Banks, C.J., Alonso, V. and Chica, A. (1995). A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environmental Pollution* **88**, 13-18.
- Borja, R., Martin, A., Fiestas, J. A. and Maestro, R. (1990). Study on the inhibition of olive mill wastewater biomethanation in bioreactors with microorganisms immobilized on various types of support. *Grasas y Aceites* **41**, 397-403.
- Borja, R., Martin, A., Alonso, V., Garcia, I. and Banks, C. J. (1995). Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research* **29**, 489-495.

- Borja, R., Martin, A., Gomez, L. F. and Ramos-Comenzana, A. (1993). Anaerobic digestion of olive mill wastewater pre-treated with *Azotobacter chroococcum*. *Resources, Conservation and Recycling* **9**, 201-211.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A. and Scognamiglio, F. (1991). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewater. *Phytochemistry* **31**, 4125-4128.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, 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., Sermanni, G. G. and Lo Cascio, B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*triticum durum* desf.) germinability. *Chemosphere* **50**, 959-966.
- Cereti, C. F., Rossini, F., Federici, F., Quaratino, D., Vassilev, N. and Fenice, M. (2004). Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*triticum durum* drsf.). *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.
- Crestini, C., Jurasek, L., and Argyropoulos D. S. (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemical European Journal* **9**, 5371-5378.
- D'annibale, A., 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.

- D'annibale, A., Chrestini, C., Vinciguerra, V. and Sermanni, G. G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology* **61**, 209-218.
- D'annibale, A. and Stazi, S. R. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula-edodes* laccase: stability and removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* **77**, 1151-1158.
- De Caro, M. and Ligorì, M. G. (1959). Attività antibiotica di un estratto desunto dalle acque di vegetazione delle olive. *Istituzione Super Sanita* **22**, 223-243.
- 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.
- Feltham, R. K. A., Power, A. K., Pell, P. A. and Sneath, P. H. A. (1978). A simple method for storage of bacteria at 76°C. *Journal of Applied Bacteriology* **44**, 313-316.
- Fiestas Ros De Ursinos, J. A. (1977). Depuración de aguas residuales en las industrias de aceitunas y aceites de oliva. *Grasas y Aceites* **28**, 113-121.
- Fiestas, J. A. (1981). Différentes utilisations des margines. In : *Proceedings of Séminaire International sur la Valorisation des Sous-Produits de l'Olivier*, pp. 93-100. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Tunisie.
- Flouri, F., Sotirchos, D., Ioannidou, S. and Balis, C. (1996). Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 189-192.
- Genjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Cáceres, J., Bauer, R. and Fernández-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.
- Gonzalez, D. M., Moreno, E., Sarmiento, Q. J. and Cormenzana, R. A. (1990). Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin): inhibitory activity of phenols and fatty acids. *Chemosphere* **20**, 423-432.
- Hamdi, M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill waste waters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **37**, 155-163.
- Hamdi, M. (1993). Future prospects and constraints of olive oil mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Engineering* **8**, 209-214.
- Hamdi, M., Festino, C. and Aubart, C. (1992). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fully mixed reactors and in fixed film reactors. *Process Biochemistry* **27**, 37-42.
- 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.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. and Heinaru A. (2000). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and r-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 195-205.
- 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.
- Karlsson, A., Ejlertsson, J., Nezirevic, D. and Svensson, B. H. (1999). Degradation of phenol under meso- and thermophilic, anaerobic conditions. *Anaerobe* **5**, 25-35.
- Kopsidas, G. C. (1992). Wastewater from the preparation of table olives. *Water Resource* **26**, 629-631.

- Krogmeier, M. G. and Bremner, J. M. (1989). Effects of phenolic acids on seed germination and seedling growth in soil. *Biology and Fertility of Soils* **8**, 116-122.
- Lo Scalzo, R. and Scarpati, M. L. (1993). A new secoiridoid from olive wastewaters. *Journal of Nature Products* **56**, 621-623
- Martin, A., Borja, R., Garcia, I. and Fiestas, J. A. (1991). Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process Biochemistry* **26**, 101-107.
- Martinez, J., Perez, J., Moreno, E. and Ramos-Carmenzana, A. (1986). Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechin en su posible aprovechamiento. *Grasas y Aceites* **37**, 215-223.
- Martirani, L., Giardina, , Marzullo, L. and Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **30**, 1914-1918.
- Molfese, S. and Milano, A. (1989). Acque reflue dei frantoi: allarmismo per scarichi biodegradabili. *L'informatore Agrario* **9**, 227-232.
- Moreno, E., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1987). Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios* **51**, 169-174.
- Ntougias, S., Ehaliotis, C., Zervakis, G. I., Katsaris, P., and Papadopoulou, K. (2003). Monitoring the composting process of different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants, pp. 666-673. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology*. (T. D. Lekkas, ed.), University of the Aegean and GlobalNEST, Lemnos, Greece.
- Perez, D. J., Esteban, E., Gomez, M. and Gallardo-Lara, F. (1986). Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *Journal of Environmental Science and Health* **B21**, 349-357.

- Perez, J., Hernandez, M. T., Ramos-Cormenzana, A. and Mertinez, J. (1987). Caracterization de fenoles del pigmento del alpechin y transformacion por phaneroechaete chrysosporium. *Grasas y Aceites* **38**, 367-371.
- 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.
- Proietti, M., Palliotti, A., Tombesi, A. and Cenci, G. (1995). Chemical and microbiological modifications of two different cultivated soils induced by olive oil wastewater administration. *Agricoltura Mediterranea* **125**, 160-171.
- Ragazzi, E. and Veronesse, G. (1967). Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive. *Annual Chimie* **57**, 1398-1413.
- Rivas, F. J., Beltran, F. J., Gimeno, O. and Frades, J. (2001). Treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry* **49**, 1873-1880.
- Rivas, F. J., Beltran, F. J., Gimeno, O. and Alvarez, P. (2003). Optimisation of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines. *Journal of Hazardous Materials* **B29**, 277-290.
- Rodriguez, M. M. A., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1988). Effects of extracts obtained from olive mill waste waters on Bacillus megaterium ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 219-226.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, M. and Vincieri, F. (1998). In: *Polyphenol content in olive oil waste-waters*, pp. 517-518. XIXth International Conference on Polyphenols, Lille, France.
- Rozzi, A., Santori, M. and Spinoza, L. (1984). In: *Anaerobic digestion in Italy with special references to treatment of olive oil mill wastes*, pp. 96-103. EEC, Athens, Greece.

- Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Augusto, R. and Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **31**, 223-235.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R. and Riffaldi, R. (1990). Cinetica della decomposizione nel terreno del carbonio organico delle acque de vegetazione. *Agrochimica* **34**, 157-164.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R. and Lupetti, A. (1991). Effetti dello spandimento di acque di vegetazione sul terreno agrario. *Agrochimica* **35**, 135-146.
- Sorlini, C., Andreoni, V., Ferrari, A. and Ranalli, G. (1986). In: *The influence of some phenolic acids present in oil mill waters on microbial groups for the methanogenesis*, pp. 81-88. International Symposium on Olive by Products Valorization, Seville, Spain.
- Tejada, M., Ruiz, J. L., Dodao, M. and Gonzalez, J. L. (1997). Evolution de parametros fisicos de un suelo tras la adiccion de distintos tipos de orujos de aceituna. *Aetas de Horticultura* **18**, 514-518.
- Tomati, U. and Galli., E. (1990). The fertilizing value of waste waters from olive processing industry, pp. 117-124. In: *Humns, its structure and role in agriculture and environment*. Instituto di Radiobiochemica et Ecologia, Roma.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou., D. and Agellis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains *Pleurotus* sp. in respect to their phenol oxidase (lacasse) activity. *Bioresource Technology* **84**, 251-257.
- Tuncel, G. and Nergiz, C. (1993). Antimicrobial effects of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology* **17**, 300-302.
- Vinciguerra, V., D'annibale, A., Monache, G. D. and Sermanni, G. G. (1995). Correlated effects during bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*. *Bioresource Technology* **51**, 221-226.

- Weaver, R. W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A. and Wollum, A. (1994). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Yesilada, O. and Sam, M. (1998). Toxic effects of biodegraded and detoxified olive oil mill wastewater on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicological and Environmental Chemistry* **65**, 87-94.
- Yesilada, O., Sik, S. and Sam, M. (1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects on agitation, initial cod concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 37-42.
- Zervakis, G., Yatras, P. and Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *International Bioremediation and Biodegradation* **38**, 237-243.
- Zuberer, D. A. (1994). Recovery and enumeration of viable bacteria, 119-144. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. (Weaver, R. W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai A. and Wollum, A.). Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA.
- Zucconi F., Pera A., Forte M. and De Bertoldi M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* **22**, 54-57.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βλυσσίδης, Α. (1997). Μέθοδος διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων με το σύστημα της ηλεκτρόλυσης. *Επιστήμη και Τεχνολογία* 2, 46.
- Μιχελάκης Ν. (2000). Απόβλητα ελαιουργείων-Οικονομική εφικτότητα των μεθόδων διαχείρισης των αποβλήτων. *Ελαιοκομία-αφιέρωμα*. Εκδόσεις Γεωργική Τεχνολογία, 150-157.
- Οιχαλιώτης, Κ. Δ. και Ζερβάκης, Γ. (1999). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων. Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. *Ελιά και Ελαιόλαδο* 14, 6-16 και 52-61.