

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΛΕΥΚΗΣ
ΣΗΨΕΩΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

ΚΑΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Καλαμάτα 2006

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΛΕΥΚΗΣ
ΣΗΨΕΩΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

ΚΑΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Εισηγητής: Δρ Γεώργιος Ζερβάκης

Καλαμάτα 2006

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Ζερβάκη Γεώργιο, Διευθυντή του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, και τον Δρ. Ντούγια Σπυρίδωνα, Επιστημονικού συνεργάτη του ΤΕΙ Καλαμάτας και του Ινστιτούτου Ελαίας, για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά την ανάθεση, την διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στο προσωπικό του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας, και ιδιαίτερα στην κυρία Ασημούλα Καρδιμάκη, για τη βοήθεια τους στη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου Στέφανο για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά την διάρκεια των σπουδών μου στην Καλαμάτα. Επίσης, ευχαριστώ την παρέα μου στην Καλαμάτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πειραματική διαδικασία, η οποία αναφέρεται διεξοδικά στις παρακάτω σελίδες, αποσκοπεί στη συγκριτική αξιολόγηση είκοσι μυκήτων λευκής σήψεως στην αποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Κάθε στέλεχος επώαστηκε επί 5 εβδομάδες στους 25 °C σε αποστειρωμένο διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v. Για την αξιολόγηση, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βιομάζας, του δείκτη βλαστικότητας, των ολικών φαινολικών συστατικών, του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) και του αποχρωματισμού των ΥΑΕ. Επιπλέον, μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα, των παραγόμενων από τους μύκητες λευκής σήψεως ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση, Μπ-υπεροξειδάση, λιγνίνη υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατριλικής αλκοόλης.

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας διαπιστώθηκε ότι το καλύτερο στέλεχος, ως προς την ικανότητα να αποδομεί, ήταν ο *Trametes versicolor* CCBAS-614, αφού σημείωσε τη μεγαλύτερη παραγωγή του ενζύμου λακκάση (225 U l⁻¹) και τη μεγαλύτερη αποδόμηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κατά 58%, ενώ παρουσίασε αύξηση του δείκτη βλαστικότητας από 0.41 σε 6.6% και σημαντική μείωση του χρώματος των ΥΑΕ κατά 70%.

Ικανοποιητικά αποτελέσματα παρουσίασε ο μύκητας *Hericiium erinacius* IK-3001, προκαλώντας τη μεγαλύτερη αύξηση του δείκτη βλαστικότητας, από 0.41 σε 13.2% και μειώνοντας το ολικό φαινολικό φορτίο και το χρώμα των ΥΑΕ κατά 88 και 68% αντίστοιχα. Ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα των στελεχών του γένους *Pleurotus*, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη μείωση του φαινολικού φορτίου (93-95%) και τη μεγαλύτερη δράση υπεροξειδασών (έως 140 U l⁻¹). Σημαντική ήταν επίσης και η μείωση του χρώματος των ΥΑΕ (κατά 73-77%), του COD (κατά 26-51%) και η αύξηση του δείκτη βλαστικότητας (κατά 6-12%), που προκλήθηκε από τα στελέχη του γένους *Pleurotus* της παρούσης μελέτης.

ABSTRACT

In the present study, the ability of twenty white-rot fungi to bioremediate the olive mill wastewater (OMW) was evaluated. The twenty fungal strains were incubated for 5 weeks at 25 °C in 25% v/v OMW. Measurements of biomass, germination index, content of polyphenols, COD and decolonization were performed. The enzymatic activities of laccase, peroxidase (Mn dependent and independent), veratryl alcohol oxidase and lignin peroxidase were also determined. The application of *Trametes versicolor* in OMW resulted in the greater laccase activity (225 U l⁻¹) and decrease of COD by 58%. In addition, *Hericium erinacius* IK-3001 caused the greater increase in the germination index (from 0.41% for the control, to 13.2%). Moreover, effective growth was observed for the strains of the genus *Pleurotus* tested, resulting in the decrease in the phenolic content, COD and colour (A_{525 nm}) by 93-95%, 26-51% and 73-77% respectively. They also produced the greatest peroxidase activities (up to 140 U l⁻¹).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Πρόλογος</i>	1
<i>Περίληψη</i>	2
<i>Abstract</i>	3
<i>Περιεχόμενα</i>	4
<i>Περιεχόμενα Εικόνων</i>	6
<i>Περιεχόμενα Πινάκων</i>	6

Κεφάλαιο Πρώτο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τύποι ελαιοτριβείων.....	7
1.2. Ιδιότητες απόβλητων ελαιοτριβείων.....	9
1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	10
1.4. Φυτοτοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	11
1.5. Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	11
1.6. Διαχείριση αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	12
1.7. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη βοήθεια του ενζύμου Λακκάση.....	14
1.8. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη βοήθεια υπεροξειδασών.....	16
1.9. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Λακκάση.....	17
1.10. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Μπ-υπεροξειδάση.....	19

Κεφάλαιο Δεύτερο

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Στελέχη μικροοργανισμών-Σκοπός πειράματος.....	21
2.2. Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υποστρώματος με ΥΑΕ.....	22
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός – Εμβολιασμός στελεχών μυκήτων.....	23
2.4. Μέτρηση βιομάζας.....	24
2.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών (Μέθοδος Folin- Ciocalteu).....	24
2.6. Μέτρηση του δείκτη βλαστικότητας	25
2.7. Μέτρηση αποχρωματισμού.....	26
2.8. Μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD).....	27

2.9. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση	27
2.10. Μελέτη της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn).....	28
2.11. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn).....	29
2.12. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση.....	31
2.13. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.....	32
2.14. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση.....	33

Κεφάλαιο Τρίτο

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά.....	35
3.2. Μέτρηση βιομάζας.....	35
3.3. Προσδιορισμός αποχρωματισμού.....	35
3.4. Μέτρηση φαινολικού φορτίου.....	36
3.5. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας.....	36
3.6. Μέτρηση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD).....	37
3.7. Ενζυμική δράση των στελεχών μυκήτων.....	37
3.7.1. Λακκάση.....	37
3.7.2. Mn-υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενη του Mn).....	38
3.7.3. Mn-υπεροξειδάση.....	38

Κεφάλαιο Τέταρτο

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση-Συμπεράσματα	42
----------------------------------	----

<i>Βιβλιογραφία</i>	45
---------------------------	----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Φυγοκεντρικό σύστημα εξαγωγής ελαιολάδου.....	9
Εικόνα 1.2. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση.....	18
Εικόνα 1.3. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση.....	20
Εικόνα 3.1. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση που παράχθηκε από τα στελέχη μυκήτων της παρούσας μελέτης που αναπτύχθηκαν σε ΥΑΕ.....	40
Εικόνα 3.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Μn) και Μn-υπεροξειδάση που παράχθηκε από τα στελέχη μυκήτων της παρούσας μελέτης που αναπτύχθηκαν σε ΥΑΕ.....	41

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός βιομάζας, απορρόφησης, φαινολικού φορτίου, δείκτη βλαστικότητας και COD σε δείγματα ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη μυκήτων της παρούσης μελέτης.....	39
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1. Τύποι ελαιοτριβείων

Η παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου, 2.5 εκατομμύρια τόνους το χρόνο, παράγεται κυρίως στις χώρες της Μεσογείου. Ένα σημαντικό ποσοστό από την παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου, καταλαμβάνει η Ελλάδα, που ανέρχεται στους 900 χιλιάδες τόνους το χρόνο (Albuquerque *et al.*, 2003). Η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιοκάρπο, γίνεται μέσω μιας ασυνεχής (με πίεση) ή συνεχής (με φυγοκέντρηση) διαδικασία, από τα κλασσικά - παραδοσιακά ελαιοτριβεία ή τις σύγχρονες φυγοκεντρικές μονάδες επεξεργασίας δυο ή τριών φάσεων αντίστοιχα (Borja *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 2004).

Μερικά από τα στάδια κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου, παραμένουν ίδια και για τους δυο τύπους ελαιοτριβείων και διαφέρουν μόνο στον τρόπο διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη. Τα κοινά αυτά στάδια είναι: το στάδιο της αποφύλλωσης, όπου γίνεται απομάκρυνση των φύλλων από τον ελαιοκάρπο, το πλύσιμο του ελαιοκάρπου, η σύνθλιψη του ελαιοκάρπου και η μάλαξη του ελαιοκάρπου με τη βοήθεια θέρμανσης (Borja *et al.*, 1995).

Τα κλασσικά - παραδοσιακά τύπου ελαιοτριβεία χρησιμοποιούνταν, μέχρι τη δεκαετία του '80, σχεδόν αποκλειστικά για τη εξαγωγή του ελαιολάδου. Σ' αυτά τα τύπου ελαιοτριβεία, η ελαιοζύμη που παράγεται μετά τη μάλαξη, μεταφέρεται σε ειδικά υδραυλικά πεστήρια και με τη βοήθεια της πίεσης γίνεται ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τον ελαιοπυρήνα. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μαζί με το ελαιολάδο παραλαμβάνονται τα φυτικά υγρά του καρπού και το τυχόν νερό που μεταφέρεται στην ελαιοζύμη από τη γραμμή εξαγωγής (Hambi, 1992).

Με την εξέλιξη της βιομηχανίας εξαγωγής ελαιολάδου, βρέθηκε μια συνεχή διαδικασία φυγοκέντρησης, που βασίζεται στη διάφορα στο ειδικό βάρος που παρουσιάζουν τα φυτικά υγρά και το ελαιολάδο (Εικόνα 1.1). Αυτού του είδους ελαιοτριβεία είναι γνωστά ως φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία, που διακρίνονται σε τριών και δυο φάσεων. Συγκεκριμένα, στα ελαιοτριβεία τριών φάσεων, η ελαιοζύμη μεταφέρεται σ' έναν οριζόντιο φυγοκεντρητή, γνωστό ως decanter, και με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού υποβάλλεται σε γρήγορη φυγοκέντρηση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το

διαχωρισμό του ελαιολάδου από τα φυτικά υγρά του καρπού, το προστιθέμενο νερό και το στερεό υπόλειμμα της ελαιοζύμης (Albuquerque *et al.*, 2003: Borja *et al.*, 1995).

Τα φυτικά υγρά μαζί με το νερό που αποβάλλονται κατά τη διαδικασία αυτή, αποτελούν τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων (ΥΑΕ), ενώ το στερεό υπόλειμμα αποτελούν τον ελαιοπυρήνα (Dias *et al.*, 2004). Από τον ελαιοπυρήνα μέσω εκχύλισης με οργανικό διαλύτη, συνήθως εξάνιο, παραλαμβάνεται το πυρηνέλαιο και το πυρηνόξυλο στα πυρηνοελαιουργεία (Gonzalez *et al.*, 1990: Jones *et al.*, 2000).

Μειονεκτήματα των τριών φάσεων ελαιοτριβείων είναι οι μεγάλες ποσότητες ΥΑΕ που παράγονται σε σχέση με τα κλασικά - παραδοσιακά τύπου ελαιοτριβεία (1.25-1.75 φορές περισσότερο νερό) και το πρόβλημα διάθεσης και διαχείρισης των ΥΑΕ (Albuquerque *et al.*, 2003).

Κατά την προσπάθεια μείωσης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και του κόστους λειτουργίας αυτών αναπτύχθηκε ένας νέος φυγοκεντρικός διαχωριστήρας δυο φάσεων, ο οποίος χρησιμοποιείται σε αρκετές μεσογειακές ελαιοπαραγωγικές χώρες (Jones *et al.*, 2000). Στο διαχωριστήρα δυο φάσεων, η ελαιοζύμη χωρίζεται σε δυο φάσεις, μια υγρή και μια ημίρρευστη, σε αντίθεση με αυτό των τριών φάσεων. Την υγρή φάση αποτελεί το ελαιόλαδο και την ημίρρευστη φάση αποτελεί το ελαιοπυρηνόλυμα, δηλαδή τα φυτικά υγρά του καρπού μαζί με τον ελαιοπυρήνα. Η ημίρρευστη φάση είναι γνωστή με την Ισπανική ονομασία “alpeorujo”, αλλά ως δόκιμος, χρησιμοποιείται ο όρος της ημίρρευστης φάσης (Albuquerque *et al.*, 2003: Jones *et al.*, 2000: Ntougias *et al.*, 2005).

Μεγάλα πλεονεκτήματα των ελαιοτριβείων δυο φάσεων είναι η οικονομική τους λειτουργία και η μείωση της κατανάλωσης νερού, σε σχέση με αυτά των τριών φάσεων. Μειονέκτημα σε αυτού του είδους ελαιοτριβεία είναι το νέο παραπροϊόν (ελαιοπυρηνόλυμα) που παράγεται με την δυο φάσεων φυγοκέντρωση, όπου απαιτεί νέες πρακτικές διαχείρισης του.



Εικόνα 1.1. Φυγοκεντρικό σύστημα εξαγωγής ελαιολάδου.

1.2. Ιδιότητες απόβλητων ελαιοτριβείων

Στις Μεσογειακές χώρες, η παραγωγή των ΥΑΕ, που προέρχονται από τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων, κυμαίνεται περί τα 30 εκατομμύρια m^3 ετησίως. Ειδικότερα, στην Ελλάδα η παραγωγή σε ΥΑΕ φτάνει τα 1.5 εκατομμύρια m^3 το χρόνο, η διαχείριση των οποίων αποτελεί σοβαρό πρόβλημα, αφού προκαλούν σημαντική ρύπανση χερσαίων και υδάτινων περιβάλλοντων (Aggelis *et al.*, 2003; Fountoulakis *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002).

Η σύσταση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων διαφοροποιείται ανάλογα με το έδαφος της καλλιέργειας, την εποχή της συγκομιδής, το βαθμό ωρίμανσης, τις κλιματολογικές συνθήκες και τον τύπο του ελαιοτριβείου εξαγωγής του ελαιολάδου (D' Annibale *et al.*, 2004a; Perez *et al.*, 1998). Για το λόγο αυτό, τα ΥΑΕ περιέχουν 83 – 92% νερό, 4 – 16% οργανική ουσία και 1 – 2% ανόργανα συστατικά. Το 10% του ποσοστού της οργανικής ουσίας καταλαμβάνουν οι φαινολικές ενώσεις, ενώ το υπόλοιπο αυτής

αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, οργανικά οξέα και τανίνες (Attanasio *et al.*, 2005; Jaouani *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 1998).

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα ΥΑΕ περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις μονομερών και πολυμερών φαινολικών και άλλων αρωματικών ενώσεων, παρουσιάζοντας τιμές pH, που κυμαίνονται από 4.5-6. Ακόμη, υψηλές τιμές παρατηρούνται κατά τη μέτρηση του COD και BOD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο και βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο αντίστοιχα) που ανέρχονται στα 40 – 195 g l⁻¹ και 35 – 100 g l⁻¹ αντίστοιχα. Τα κύρια φαινολικά συστατικά των ΥΑΕ είναι το καφεϊκό οξύ, η κατεχόλη, η 4-μέθυλοκατεχόλη, η τυροσόλη και η 2-υδροξυ-τυροσόλη (Casa *et al.*, 2003; D' Annibale *et al.*, 2004a; Dias *et al.*, 2004; Jaouani *et al.*, 2003; Martirani *et al.*, 1996; Yesilada *et al.*, 1998).

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν, ότι οι μονομερείς φαινόλες θεωρούνται υπεύθυνες για το φυτοτοξικό και αντιμικροβιακό χαρακτήρα των ΥΑΕ, ενώ οι πολυμερείς φαινόλες κυρίως για το σκούρο και έντονο χρώμα τους, καθώς και για το χαρακτηριστικό και αποκρουστικό άρωμα των αποβλήτων αυτών.

Τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιοτριβείων δυο φάσεων διαφέρουν εν μέρει από εκείνα των τριών φάσεων. Ο λόγος είναι ότι το ελαιοπυρηνόλυμα αποτελείται από τα φυτικά υγρά του καρπού, τα υγρά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου και τον ελαιοπυρήνα (Alburquerque *et al.*, 2003).

Η μαζική συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων ελαιοτριβείων, που παρουσιάζουν υψηλή τοξική και αντιμικροβιακή δράση, καθιστά αναγκαία τη διαχείριση των ρυπογόνων αυτών αποβλήτων.

1.3. Αντιμικροβιακή δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Η αντιμικροβιακή δράση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων συνδέεται συχνά με το φαινολικό τους φορτίο, που κυμαίνεται μεταξύ 0.5 έως 24 g l⁻¹ (Botja *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1990). Το ποσοστό αυτό εξαρτάται τόσο από το σύστημα εξαγωγής του ελαιολάδου όσο και το στάδιο συγκομιδής και το είδος του ελαιοκάρπου. Η εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων ΥΑΕ σε χωματερές και ποτάμια που βρίσκονταν κοντά σε ελαιοτριβεία, αντί για την ολοκληρωτική τους διαχείριση, προκαλεί οικολογική διαταραχή και μόλυνση (Fountoulakis *et al.*, 2002; Kachouri *et al.*, 2004).

Έχει αναφερθεί, ότι η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους λιπαρών οξέων, αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ.

Συγκεκριμένα, σε δόκιμες με στελέχη του βακτηρίου *Bacillus megaterium*, πάνω σε υποστρώματα φαινολικών και λιπαρών οξέων (εναλλάξ ή και τα δύο ταυτοχρόνως), παρατηρήθηκε ανάσχεση της ανάπτυξης του παραπάνω μικροοργανισμού (Gonzalez-Lopez *et al.*, 1994; Martirani *et al.*, 1996).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Carraso *et al.* (1995), τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων παρουσίασαν, εξαιτίας της αντιμικροβιακής τους δράσης, ανάσχεση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών όπως π.χ. περιορισμός της δράσεως του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

1.4. Φυτοτοξική δράση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ΥΑΕ προκαλούν αναστολή στην εκβλάστηση σπόρων και στην ανάπτυξη νεαρών φυτών, διάφορων ειδών οπωροκηπευτικών. Η φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ οφείλεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά και σε μερικά οργανικά οξέα (οξικό και μυρμηκικό οξύ), που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους (Aggelis *et al.*, 2003; Casa *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2004a; Tsioulpas *et al.*, 2002), καθώς και στην υψηλή αλατότητα και στο υψηλό οργανικό τους φορτίο (Ntougias *et al.*, 2005).

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

1.5. Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων ελαιοτριβείων

Πολλές είναι οι μέθοδοι επεξεργασίας των ΥΑΕ που έχουν προταθεί για την αποδόμησή τους. Η χρήση φυσικοχημικών μεθόδων, όπως της διήθησης, της αντίθετης ώσμωσης και της εξάτμισης, προσπάθησαν να δώσουν λύσεις για τη διαχείριση των ρυπογόνων αυτών αποβλήτων.

Για την αντιμετώπιση του στέρεου υπολείμματος των ΥΑΕ, έχει προταθεί η μέθοδος της διήθησης, αποσκοπώντας στην απομάκρυνση αυτού. Μελέτες αναφέρουν, ότι

παρά τη μεγάλη συγκέντρωση των ΥΑΕ σε στέρεα και κολλοειδή συστατικά, μηχανήματα διήθησης με πίεση χρησιμοποιούνται περιστασιακά από μικρής έκτασης ελαιοτριβεία. Εντούτοις, η μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ΥΑΕ, κατά την εφαρμογή της μεθόδου, αποδεικνύει ότι τα ταξικά του συστατικά παραμένουν στα ίδια επίπεδα, πράγμα που αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα για την εφαρμογή της μεθόδου διήθησης σε βιομηχανική κλίμακα (Attanasio *et al.*, 2005; Mitrakas *et al.*, 1996; Velioglu *et al.*, 1987).

Μια άλλη φυσικοχημική μέθοδο αποδόμησης των ΥΑΕ είναι αυτή της αντίθετης ώσμωσης. Η θεωρία πάνω στην οποία βασίζεται η μέθοδος αυτή, είναι ότι γίνεται ο διαχωρισμός μοριακών στοιχείων, που βρίσκονται στην ίδια φάση, μέσω ενός συστήματος μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός ενός μεγάλου μέρους του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ και την απόκτηση ποσότητας νερού, που δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί στη διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου. Ο διαχωρισμός αυτός, εξαρτάται από τη μεμβράνη που χρησιμοποιείται. Τα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το αυξημένο κόστος των μεμβρανών και της εγκατάστασης αυτών, καθώς και η δυσκολία στο καθαρισμό των μεμβρανών για την επαναχρησιμοποίησή τους (Jaouani *et al.*, 2003; Jemmett *et al.*, 1983; Rampichini, 1987).

Επίσης, έχουν γίνει αναφορές στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο της εξάτμισης. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή, πραγματοποιείται σε μεγάλες τεχνητές δεξαμενές, όπου με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας επιτυγχάνεται η εξάτμιση και αποξήρανση των ΥΑΕ. Η εξάτμιση των ΥΑΕ σε δεξαμενές είναι χρονοβόρα και απαιτεί διάστημα 7-8 μηνών. Ο μεγάλος όγκος των δεξαμενών που απαιτείται για την εξάτμιση των ΥΑΕ και το μεγάλο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για την ικανοποιητική απόδοση, καθιστούν την μέθοδο αυτή πρακτικά αδύνατη για την ολοκληρωμένη διαχείριση των ρυπογόνων ΥΑΕ (Cabrera *et al.*, 1984; Cabrera *et al.*, 1996; Fountoulakis *et al.*, 2002).

1.6. Διαχείριση αποβλήτων ελαιοτριβείων

Ένας μεγάλος αριθμός πιθανών χρήσεων των υγρών και στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων έχει προταθεί. Ο μεγάλος όγκος των πειραματικών μελετών που υπάρχει, αποσκοπεί κυρίως στην εύρεση νέων μεθόδων διαχείρισης και αποδόμησης των αποβλήτων ελαιοτριβείων.

Μελέτες αναφέρουν, ότι το στερεό απόβλητο (ελαιοπυρηνόλυμα) των ελαιοτριβείων δύο φάσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμη ύλη για την παραγωγή ενέργειας, αφού πρώτα υποβληθεί σε ξήρανση για την μείωση της υγρασίας του. Εντούτοις, η ενέργεια που παράγεται κατά την καύση του, συχνά είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που απαιτείται για την ξήρανση του (Albuquerque *et al.*, 2003; Aragon *et al.*, 1997).

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες για την χρήση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων ως λίπασμα σε καλλιέργειες. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι ποσότητες ΥΑΕ μικρής συγκεντρώσεως, μπορούν να εφαρμοστούν σε αγροτεμάχια για την λίπανση τους, λόγω του υψηλού οργανικού τους φορτίου και των αυξημένων ποσοτήτων σε κάλιο, φώσφορο και μαγνήσιο (Nunes *et al.*, 2001). Επιπλέον, μπορούν, κάτω από προϋποθέσεις, να χρησιμοποιηθούν στη βελτίωση των χαρακτηριστικών του εδάφους (Riffaldi *et al.*, 1993; Saviozzi *et al.*, 1991). Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ, που παρουσιάζεται κατά την εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων στο έδαφος (Tsioulpas *et al.*, 2002).

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, εξαιτίας της περιεκτικότητας τους σε σάκχαρα και ανόργανα συστατικά, καθίστανται ιδανικά υποστρώματα για την ανάπτυξη διάφορων ζυμών, όπως της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, αποσκοπώντας στην παραγωγή μονοκυτταρικών πρωτεϊνών (Amat *et al.*, 1986; Hamdi, 1993). Η παραγωγή των πρωτεϊνών μπορεί, υπό προϋποθέσεις, να χρησιμοποιηθεί ως τροφή σε κτηνοτροφικές και ιχθυοπαραγωγικές μονάδες (Ζοϊορούλος, 1983). Εντούτοις, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει οικονομικά και τεχνολογικά προβλήματα στην εφαρμογή της.

Επιπρόσθετα, η βιολογική αποδόμηση των ΥΑΕ, μέσω αναερόβιων ζυμώσεων, έχει μελετηθεί για την παραγωγή βιοαερίων, κυρίως μεθανίου. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια ιδανική λύση διαχείρισης των αποβλήτων αυτών, παράγοντας εναλλακτικές μορφές ενέργειας. Μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι η διαδικασία της αναερόβιας ζύμωσης είναι αρκετά αργή και απαιτεί μεγάλες οικονομικές επενδύσεις σε εγκαταστάσεις και σε εξειδικευμένο εργατικό προσωπικό (Bořja *et al.*, 1993; Georgacakis και Dalis, 1993; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995; Rozzi *et al.*, 1989).

Η χρησιμοποίηση των ΥΑΕ σε υποστρώματα καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών, συνοδεύεται συνήθως από σημαντική μείωση των φαινολικών τους συστατικών. Απαλλαγμένο από τοξικά συστατικά, το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα και βελτιωτικό εδάφους. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η αδυναμία διαχείρισης μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων (Zervakis *et al.*, 1996).

1.7. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη βοήθεια του ενζύμου Λακκάση

Πολλές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποδόμηση των αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μικροοργανισμών, παραδείγματα των οποίων δίνονται στις επόμενες παραγράφους.

Η διάσπαση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψεως, έχει γίνει αντικείμενο έρευνας από πολλούς επιστήμονες ανά τον κόσμο. Ο αποχρωματισμός, η φυτοτοξικότητα και το φαινολικό φορτίο είναι μερικά από τα στοιχεία που μελετούνται κατά τη βιοαποδόμηση των ΥΑΕ. Έχει παρατηρηθεί ότι το στέλεχος *Phanerochaete chrysosporium* που επώαστηκε επί 12 ημέρες σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 20% v/v, προκάλεσε τον αποχρωματισμό των αποβλήτων αυτών κατά 40%, ενώ μείωσε το ποσοστό των φαινολικών συστατικών κατά 60% παράγοντας λακκάση (1 U ml^{-1}) και ίχνη υπεροξειδάσης (εξαρτώμενης των ιόντων μαγγανίου) (Dias *et al.*, 2004).

Μια ακόμη μελέτη, ερεύνησε την επίδραση του ενζύμου λακκάση σε μίγμα τεσσάρων φαινολικών ενώσεων (κατεχόλη, μέθυλο-κεταχόλη, *m*-τυροσόλη και ύδροξυ-τυροσόλη) που είναι διαδεδομένα στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Σ' αυτό το μίγμα, έγινε προσθήκη ενζύμου λακκάση που απομονώθηκε από το στέλεχος *Rhus vernificera*, με αποτέλεσμα την αποδόμηση κατά 100% της μέθυλο-κεταχόλης, 70% της κατεχόλης και της ύδροξυ-τυροσόλης και μόλις 35% της *m*-τυροσόλης (Gianfreda *et al.*, 2003).

Επιπροσθέτως, έχουν γίνει μελέτες για την σύγκριση της επίδρασης του ενζύμου λακκάση (που απομονώθηκε από το στέλεχος *Trametes versicolor*) και της προσθήκης (κατεργασμένου με το στέλεχος αυτό) υπερκειμένου ΥΑΕ (20% v/v) (αντί ενζύμου), σε διάλυμα κατεχόλης (0.5 g l^{-1}) και υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Στο διάλυμα της κατεχόλης παρατηρήθηκε μείωση αυτής κατά 80% κατά την προσθήκη τόσο του ενζύμου λακκάση όσο και του επεξεργασμένου υπερκειμένου ΥΑΕ. Αντίθετα, στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, η αποδόμηση των φαινολικών συστατικών, που αποτελούνταν κυρίως από ύδροξυ-τυροσόλη, ήταν της τάξεως του 50% και του 80% κατά την προσθήκη του ενζύμου λακκάση και του υπερκειμένου αντίστοιχα. Η χρήση του ενζύμου λακκάση, που συνήθως απομονώνεται από μύκητες λευκής σήψεως, προβάλλει ως αντιοικονομική, αφού για την απόκτηση ικανοποιητικών αποτελεσμάτων απαιτείται η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων ενζύμου υψηλής δραστηριότητας, συνήθως της τάξεως των 10^5 U ανά κυβικό μέτρο υγρών αποβλήτων (Greco *et al.*, 1999).

Έχει αναφέρει, ότι κατά την προσθήκη 2.8 U ml^{-1} ενζύμου λακκάση, που απομονώθηκε από το στέλεχος *Lentinula edodes*, σε διάλυμα υγρών αποβλήτων

ελαιοτριβείων συγκεντρώσεως 5% v/v, παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών συστατικών κατά 88%, αποχρωματισμό του αρχικού διαλύματος κατά 70% και τέλος μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κατά 67% (D'Annibale *et al.*, 2004a).

Επιπλέον, κατά τη μελέτη της αποδόμησης των ΥΑΕ με τη χρήση των μυκήτων λευκής σήψεως, *Coriolus versicolor* και *Funalia trogii*, διαπιστώθηκε ότι μύκητας *C. versicolor* μείωσε το φαινολικό φορτίο κατά 90%, το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) κατά 63% και το χρώμα κατά 65%. Ο μικροοργανισμός *F. trogii*, μείωσε το φαινολικό φορτίο και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) κατά το ίδιο περίπου ποσοστό, ενώ προκάλεσε τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ κατά 81%. Κατά τη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση, η μεγαλύτερη ενζυμική δράση παρατηρήθηκε στο μύκητα *F. trogii* (7.1 U ml^{-1}). Αντιθέτως, η ενζυμική δραστηριότητα του *C. versicolor* ήταν στο μισό (3.4 U ml^{-1}) (Yesilada *et al.*, 1998).

Η μελέτη των Fountoulakis *et al.* (2002) αναφέρεται στην αποδόμηση των φαινολικών συστατικών με τη χρήση του μύκητα *Pleurotus ostreatus* LGAM P69, σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή του στελέχους αυτού σε αποστειρωμένο διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50%, σε θερμικά επεξεργασμένο ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50% και σε θερμικά επεξεργασμένο ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 100%, παρουσιάζοντας μείωση του φαινολικού φορτίου κατά 78.3, 66.6 και 64.7% αντίστοιχα. Ακόμη, η μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, στις τρεις εφαρμογές, κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο ποσοστό (10%).

Επίσης, σε μια εκτεταμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες λευκής σήψεως *Bjerkandera adusta*, *Coriolopsis polyzona*, *Daedalea quercina*, *Irpex lacteus*, *Lentinus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia ludoviciana*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus coccineus*, *Laetiporus sulphureus*, *Merulius tremellosus*, *Lenzites betulina*, *Bjerkandera* sp., *Pleurotus sajor-caju*, *Polyporus ciliatus*, *Trametes cingulata* και *Phlebia radiata*, για την αποδόμηση πολυμερών συστατικών λιγνίνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη ανάπτυξη βιομάζας πραγματοποιήθηκε από τους μύκητες *P. chrysosporium* (9.56 g l^{-1}) και *L. betulina* (8.58 g l^{-1}), ενώ προκάλεσαν τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύματος τα στελέχη *D. quercina*, *L. tigrinus*, *P. ludoviciana* και *L. sulphureus*. Κατά την μέτρηση της δραστηριότητας των ένζυμων λακκάση, Μn-υπεροξειδάση και λιγνίνη υπεροξειδάση, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη δράση του ενζύμου λακκάση σημειώθηκε από τα στελέχη *L. tigrinus* και *P. coccineus* (49 U l^{-1}), ενώ οι μικροοργανισμοί *B. adusta* και *M. tremellosus* παρουσίασαν την μεγαλύτερη δράση του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση, παράγοντας 85 και 80 U l^{-1} ενζύμου αντίστοιχα. Ακόμη, κατά

τη μέτρησή της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση διαπιστώθηκε η ύπαρξη της μόνο στα στελέχη *C. polyzona* (30 U l⁻¹) και *P. chrysosporium* (50 U l⁻¹) (Jaouani *et al.*, 2003).

Έχει αναφερθεί ότι κατά την προσθήκη 130 U l⁻¹ ενζύμου λακκάση, που απομονώθηκε από το μύκητα *Rychnopororus coccineus*, σε διάλυμα φαινολικών και μη φαινολικών συστατικών, όμοιων με εκείνων που βρίσκονται στα ΥΑΕ, διαπιστώθηκε μείωση του φαινολικού φορτίου τουλάχιστον κατά 50% (Jaouani *et al.*, 2005).

Επίσης, κατά τη μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση, που απομονώθηκε από το μύκητα λευκής σήψεως *Lentinula edodes*, στην αποδόμηση των ΥΑΕ, διαπιστώθηκε η μείωση του ολικού φαινολικού τους φορτίου κατά 67% (D'Annibale *et al.*, 1999).

1.8. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη βοήθεια υπεροξειδασών

Κατά την ανάπτυξη του στελέχους *Phanerochaete flavido-alba* σε υποστρώματα διαφόρων φαινολικών συστατικών, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο Μπ-υπεροξειδάση παρουσίασε τη μεγαλύτερη του δραστηριότητα σε υποστρώματα μέθυλο-υδροκυνόνης (30 U ml⁻¹) και 4-μέθοξυ-φαινόλης (28.3 U ml⁻¹) (de la Rubia *et al.*, 2002).

Κατά τη μελέτη της αποδόμησης, με τη χρήση του μύκητα λευκής σήψεως *Phanerochaete flavido-alba*, μονομερών φαινολικών συστατικών και πολυμερών αρωματικών ουσιών, περιλαμβανομένων αυτών των ΥΑΕ, διαπιστώθηκε η έκφραση των ενζύμων λακκάση και Μπ-υπεροξειδάση, και του ενζύμου λακκάση μόνο, στην περίπτωση πολυμερών και μονομερών υποστρωμάτων, αντίστοιχα. Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος *Phanerochaete flavido-alba*, δίνοντας τιμές λακκάσης και Μπ-υπεροξειδάσης ίσες με 0.02 και 0.2 U ml⁻¹ αντίστοιχα (Ruiz *et al.*, 2002).

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η χρήση του μύκητα λευκής σήψεως *Panus tigrinus* CBS 577.79, προκαλεί σημαντική μείωση των τοξικών συστατικών των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση φαινολικών κατά 89%, παράγοντας 3.5 U ml⁻¹ λακκάση (D'Annibale *et al.*, 2004b). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Fenice *et al.* (2003) κατά τη μελέτη των ΥΑΕ με τη χρήση του ίδιου μύκητα λευκής σήψεως (*Panus tigrinus*), δηλαδή μείωση φαινολικών συστατικών κατά 74% και δραστηριότητα λακκάσης ίση με 4.6 U ml⁻¹.

Στην μελέτη των Vinciguerra *et al.* (1995) αναφέρεται ότι παρουσιάστηκε μείωση των φαινολικών συστατικών και του χρώματος ΥΑΕ κατά 66% και 45% αντίστοιχα, εξαιτίας της δράσεως του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση (2.5 U ml^{-1}).

1.9. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Λακκάση

Η λακκάση ανήκει στην κατηγορία των οξειδασών. Περιέχει πολλά ενεργά κέντρα ιόντων χαλκού και η δράση της συνοδεύεται από αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Η δομή του ενζύμου περιλαμβάνει 4 ενεργά κέντρα χαλκού (T1, T2, T3, T4), με τη βοήθεια των οποίων ανάγουν το οξυγόνο. Στο ενεργό κέντρο χαλκού T1 προκαλείται η οξείδωση του υποστρώματος, με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων στα T2 και T3 άτομα χαλκού (Crestini *et al.*, 2003).

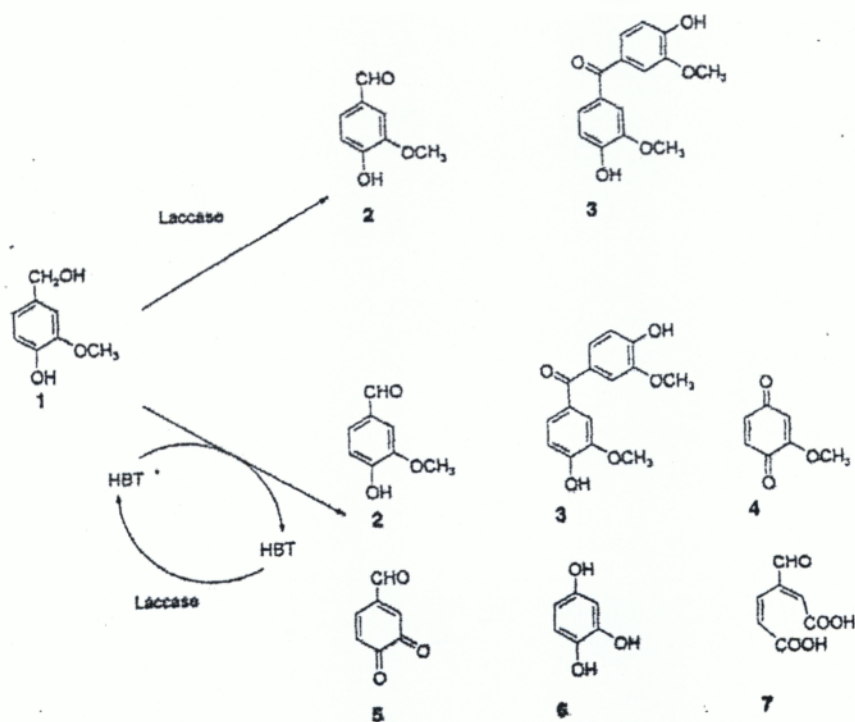
Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου λακκάση. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών, πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά την οποία, με τη αφαίρεση ενός πρωτονίου σχηματίζεται μια φαίνοξυ ρίζα (Εικόνα 1.2). Η λακκάση, ως ένζυμο, έχει υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους $60 \text{ }^\circ\text{C}$), με ικανότητα να δρα σε μεγάλο εύρος ουσιών (σχετικά μικρή εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα), οξειδώνοντας έτσι ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών αρωματικών ενώσεων (Crestini *et al.*, 2003).

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

Εντούτοις, η λακκάση έχει φτωχή λιγνιτολυτική δράση, όμως η χρησιμοποίηση ενεργοποιητών (π.χ. διαφόρων ριζών), όπως η προσθήκη της 1-ύδροξυ-βενζο-τριαζόλη (HBT), συμβάλλει σημαντικά στην βελτίωση της δράσης της. Έχει γίνει παγκοσμίως ενδιαφέροντος ο επαναπροσδιορισμός του τρόπου δράσης της λακκάσης με την προσθήκη ενεργοποιητών και την κατανόηση του μηχανισμού αυτού. Το μεγάλο ποσοστό της απολιγνιτοποίησης που παρατηρείται κατά την χρήση των ενεργοποιητών, οφείλεται κυρίως στη ικανότητα τους να προκαλούν την οξείδωση των παράπλευρων, ως προς τον αρωματικό δακτύλιο, υποομάδων (Crestini *et al.*, 2003).

Έχει αποδειχτεί, ότι η λακκάση παρουσία του HBT ενεργοποιεί την όξυ-βένζο-τριαζολική ρίζα, μια σταθερή ρίζα που μπορεί και οξειδώνει τόσο φαινολικές όσο και μη-φαινολικές ενώσεις. Κατά τη χρήση του ενζύμου λακκάση με HBT, προκαλείται αφαίρεση ατόμων υδρογόνου, σε αντίθεση με τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων που πραγματοποιείται απουσία του ενεργοποιητή (Crestini *et al.*, 2003).

Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των ενεργοποιητών στην αποδόμηση φαινολικών και μη συστατικών με τη βοήθεια του ενζύμου λακκάση, έχουν σχεδιαστεί ένα σύνολο εξειδικευμένων πειραμάτων. Συγκεκριμένα, για τη κατανόηση της οξειδωτικής δράσης της λακκάσης χρησιμοποιήθηκε κυρίως βανιλική αλκοόλη (ως υπόστρωμα) παρουσία ή όχι του HBT. Ο ρόλος των φαίνυλο, ύδροξυ και των κάρβοξυ ομάδων στην αποδόμηση της λιγνίνης, αποκαλύφθηκε μετά από τροποποίηση αυτών π.χ. με μεθυλοποίηση, και προσθήκη λακκάσης ή λακκάσης-HBT (Crestini *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.2. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου λακκάση.

1.10. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Η Mn-υπεροξειδάση ανήκει στην κατηγορία των αιμο-υπεροξειδασών, η δράση της οποίας είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του μαγγανίου, προκαλώντας την αποδόμηση φαινολικών συστατικών και άλλων αρωματικών ενώσεων. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψεως, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, με τη βοήθεια της Mn-υπεροξειδάσης που παράγουν, παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν πλήθος ενώσεων με ρυπογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών συστατικών (Serguei *et al.*, 1998).

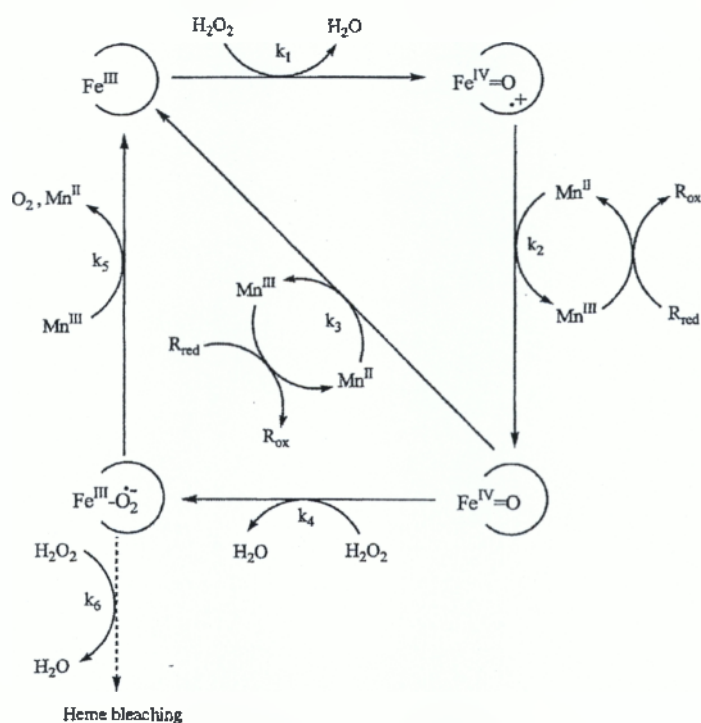
Η δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση, είναι παρόμοια με αυτή των άλλων υπεροξειδασών (Εικόνα 1.3). Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της δράσης του ενζύμου αυτού, η σιδηρούχος Mn-υπεροξειδάση οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ένα σιδηρούχο-π-πορφυρικό κατιόν, γνωστό ως συστατικό I. Η Mn-υπεροξειδάση θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (II), καθώς παρουσία Mn (II) είναι εφικτή η πραγμάτωση δυο διαδοχικών αναγωγών, πρώτα του συστατικού I σε ένα συστατικό, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συστατικό II, και έπειτα πάλι σε ένζυμο σιδήρου (Serguei *et al.*, 1998).

Επιπλέον, η προσθήκη ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα, όπως τα οξαλικά και τα γαλακτικά ιόντα, διευκολύνουν την οξείδωση του Mn (II). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, κάτω από προϋποθέσεις, μπορεί να αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπεροξικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου γνωστό και ως συστατικό III. Επιπλέον οξείδωση του συστατικού III από το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης. Αντιθέτως, ακολουθώντας άλλη πορεία, το συστατικό III (που κυρίως αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο) μπορεί να επανασχηματίσει το αρχικό ένζυμο σιδήρου, είτε με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων ή με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου (Serguei *et al.*, 1998).

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η ενζυμική δραστηριότητα (απόλυτα εξαρτώμενη από το δισθενές μαγγάνιο) της Mn-υπεροξειδάσης, είναι παρόμοια με αυτή της καταλάσης, όταν η παρουσία ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα, είναι οριακή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προστατεύει το ένζυμο από την αδρανοποίηση του από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ενώσεων που συμπλέκονται (όπως τα προαναφερθείσα οξαλικά και γαλακτικά ιόντα) απαντώνται συνήθως στο φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης των μυκήτων λευκής σήψεως (κυρίως ξυλώδη

επιφάνειες), όπου εκλύονται μεγάλες ποσότητες μαγγανίου κατά την διαδικασία αποσύνθεσης αυτών (Serguei *et al.*, 1998).

Έχουν προσδιοριστεί δυο διαφορετικοί μηχανισμοί, που προκαλούν την προστασία της Mn-υπεροξειδάσης από την αδρανοποίηση της από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Βάσει του πρώτου μηχανισμού, το συστατικό III επανεργοποιείται από την συσσώρευση σημαντικών ποσοτήτων Mn (II). Στην περίπτωση του δεύτερου μηχανισμού, ο οποίος λαμβάνει χώρα όταν η ποσότητα του μαγγάνιο (II) είναι ανεπαρκής, ο καταβολισμός της Mn-υπεροξειδάσης μειώνεται, με αποτέλεσμα το Mn (III) να οξειδώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου εμφανίζοντας δράση παρόμοια με αυτή της αντίδρασης του ενζύμου καταλάση (Serguei *et al.*, 1998).



Εικόνα 1.3. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Στελέχη μικροοργανισμών-Σκοπός πειράματος

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικά στελέχη μυκήτων λευκής σήψης καθώς και ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, που παραλήφθηκαν από ελαιοτριβείο τριών φάσεων στην περιοχή Αντικαλάμου του νομού Μεσσηνίας. Οι ποσότητες των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων τοποθετήθηκαν αρχικά στους 5 °C, ενώ προ της χρησιμοποίησής τους αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη χρήση μυκήτων. Κατά την μελέτη της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας, του δείκτη βλαστικότητας, των ολικών φαινολικών συστατικών, του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) και του αποχρωματισμού τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση των παραγόμενων από τους μύκητες λευκής σήψεως ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση, Μn – υπεροξειδάση, λιγνίνης υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.

Όλα τα στελέχη μυκήτων διατηρούνταν στη συλλογή μικροοργανισμών του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας και προέρχονταν είτε από τις συλλογές μικροοργανισμών του Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών (LGAM), του Université de Bordeaux (LGMACC) και του Τσέχικου Ινστιτούτου ASCR (CCBAS αντιστοίχως) είτε ήταν απομονωμένα, από το προσωπικό του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας, στελέχη μυκήτων. Τα στελέχη μυκήτων παραθέτονται στην παρακάτω λίστα:

Στελέχη μυκήτων λευκής σήψης

- *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22
- *Pleurotus ostreatus* LGAM P69
- *Pleurotus ostreatus* LGAM P15
- *Pleurotus ostreatus* CCBAS-443
- *Pleurotus* sp 'Acacia' IK-1246

- *Ganoderma australe* IK-1600
- *Ganoderma pfeifferi* LGAM
- *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA
- *Trametes versicolor* CCBAS-614
- *Stereum hirsutum* CCBAS 608-180
- *Hericium erinacius* IK-3001
- *Hericium flagellum* CCBAS-654
- *Lentinus tigrinus* CCBAS-391
- *Phanerochaete chrysosporium* LGAM
- *Hypholome subleteritium* (VK)
- *Panus penvoides*
- *Macrolepiota excoriata*
- *Phellinus punctatus* CCBAS-262
- *Pleurotus sajor-caju* CCBAS-666
- *Tyromyces lacteus* CCBAS-616

2.2. Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υποστρώματος με ΥΑΕ

Υλικά και όργανα

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

Πειραματική πορεία

Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες ΥΑΕ, στις οποίες πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στη τιμή 6 με προσθήκη διαλύματος οξειδίου του ασβεστίου (CaO). Μετά από διήθηση, ένας όγκος του παραπάνω υλικού, αναμίχθηκε με τρεις όγκους απιονισμένου νερού για τη δημιουργία υγρού θρεπτικού υποστρώματος ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού αυτού υποστρώματος στους 121 °C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min.

Η παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με προσθήκη, προ της αποστείρωσεως, 1,7% w/v άγαρ, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων συγκεντρώσεως 25% v/v.

2.3. Πειραματικός σχεδιασμός – Εμβολιασμός στελεχών μυκήτων

Υλικά και όργανα

- Κωνικές φιάλες με αποστειρωμένο δείγμα ΥΑΕ 25% v/v
- Στελέχη των μικροοργανισμών
- Φελοτρυπητήρας
- Λεπίδα
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Επωαστικός θάλαμος

Πειραματική πορεία

Για τη μελέτη της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, 4 φιάλες (50 ml η καθεμία) υγρού θρεπτικού υποστρώματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων συγκεντρώσεως 25% v/v, εμβολιάστηκαν με κάθε στέλεχος μύκητα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 4 φιάλες μη εμβολιασμένου υγρού θρεπτικού υποστρώματος 25% v/v σε ΥΑΕ (50 ml η καθεμία), ως μάρτυρας.

Ο εμβολιασμός των στελεχών πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής (προς αποφυγή τυχόν μολύνσεων) με μεταφορά 2 εμβολίων από το τρυβλίο σε κάθε

κωνική (με τη βοήθεια του φελοτρυπητήρα). Η επώαση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε μη περιστρεφόμενο θάλαμο στους 25 °C για 5 εβδομάδες. Οι καλλιέργειες αναδεύονταν 2 φορές ημερησίως.

2.4. Μέτρηση βιομάζας

Υλικά και όργανα

- Διηθητικό χαρτί (Whatman 40)
- Δείγματα ΥΑΕ
- Αλουμινόχαρτο
- Σπάτουλα
- Ξηραντήριο
- Ζυγός ακριβείας

Πειραματική πορεία

Η μέτρηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της επώασης. Το εμβολιασμένο υγρό απόβλητο διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί για τη συγκράτηση της βιομάζας του. Κατόπιν, το διηθητικό χαρτί με το μυκήλιο τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 70 °C για 48 h. Τέλος, μετρήθηκε στο ζυγό ακριβείας η ποσότητα του ξηρού βάρους του μυκηλίου, μετά από αφαίρεση του βάρους του διηθητικού χαρτιού.

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

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Κατεργασμένα δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (MERCK)
- 20% w/v Na₂CO₃

- Συριγγικό οξύ
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- Σιφόνιο των 20 ml
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)

Πειραματική πορεία

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.*, 1994). Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 1% v/v δείγματος (το μετά τη διήθηση υπερκείμενο, αραιωμένο με αποιονισμένο νερό, 1:1 v/v), 5% v/v διάλυμα Folin-Ciocalteu και 15% v/v διαλύματος Na₂CO₃ αρχικής συγκέντρωσεως 20% w/v, συμπληρώνοντας με αποιονισμένο νερό μέχρι χαραγής και αναδεύοντας το περιεχόμενο αυτής εντός 8 min. Το αναδευόμενο δείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 760 nm.

Πραγματοποιήθηκε επίσης, παρασκευή πρότυπης καμπύλης συριγγικού οξέως, (χρησιμοποιώντας 0, 200, 400, 800 και 1600 µg συριγγικού οξέως ανά ml), για τον προσδιορισμό της ποσότητας φαινολικών στα δείγματα.

2.6. Μέτρηση του δείκτη βλαστικότητας

Υλικά και όργανα

- Αποιονισμένο νερό
- Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Σπόροι καρδάμου (*Lepidium sativum* L)
- Πόσιμο νερό
- Τρυβλία Petri
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml

- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Πλαστική σακούλα

Πειραματική πορεία

Η μέτρηση της βλαστικότητας των σπόρων καρδάμου (*Lepidium sativum* L) βασίστηκε στη μέθοδο του Zucconi *et al.* (1981). Μετά την τοποθέτηση τριών διηθητικών χαρτιών σε κάθε τρυβλίο Petri, στην επιφάνεια του τελευταίου προστέθηκαν 25 σπόροι καρδάμου, οι οποίοι διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος ΥΑΕ, αραιώσης 1:1 v/v με νερό. Ακολούθησε κλείσιμο του κάθε τρυβλίου και τοποθέτηση αυτών σε διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί έτσι ώστε να διατηρηθεί η υγρασία τους. Κατόπιν, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε πλαστική σακούλα και οι σπόροι αφέθηκαν να βλαστήσουν στους 25 °C επί τρεις ημέρες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε ταυτοχρόνως και για τον μάρτυρα, με τη διαφοροποίηση ότι η διαβροχή των σπόρων έγινε με αντίστοιχη ποσότητα πόσιμου νερού. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα. Με την πάροδο των τριών ημερών, μετρήθηκε ο αριθμός των εκβλαστημένων σπορίων καθώς επίσης και το μήκος της ρίζας τους.

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

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

2.7. Μέτρηση αποχρωματισμού

Υλικά και όργανα

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

Πειραματική πορεία

Για τη μέτρηση του αποχρωματισμού, έγινε προσθήκη ποσότητας επεξεργασμένων (δείγματα) ή μη (μάρτυρα) υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (έπειτα από 1:1 v/v αρραίωση με απιονισμένο νερό) σε κυψελίδα και τοποθέτηση αυτής στο φασματοφωτόμετρο. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 525 nm, κατόπιν ρυθμίσεως του οργάνου.

2.8. Μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)

Για την μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD), ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από συνεργαζόμενο, με το Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών, εργαστήριο.

2.9. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση.

Υλικά και όργανα

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

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της λακκάσης προστέθηκαν σε κυψελίδα 1.2 ml τρυγικό νάτριο συγκέντρωσης 0.1 M (του οποίου το pH ρυθμίστηκε στη τιμή 4.5 με προσθήκη διαλύματος NaOH) και 0.8 ml δείγματος ΥΑΕ (κατόπιν διηθήσεως). Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκε 0.4 ml ABTS συγκεντρώσεως 1.5 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 425 nm κάθε 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

2.10. Μελέτη της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)

- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 4.5
- Αντιδραστήριο 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Αντιδραστήριο 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση, προστέθηκαν σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκέντρωσης 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB συγκεντρώσεως 25 mM και 0.1 ml διαλύματος MBTH συγκεντρώσεως 1 mM. Για την εκκίνηση της μη-ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ που αναμίχθηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

Η παρεμβολή του υποστρώματος υπολογίζεται ως ακολούθως:

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

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

2.11. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών

- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 4.5
- Αντιδραστήριο 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Αντιδραστήριο 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)
- 10 mM H₂O₂

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn) προστέθηκαν σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκέντρωσης 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH συγκεντρώσεως 1 mM και 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

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

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

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

Η υπεροξειδάση (μη εξαρτημένη του Mn) υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity), δηλαδή:

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

2.12. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instraments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 4.5
- Αντιδραστήριο 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- Αντιδραστήριο 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)
- 20 mM MnSO₄
- 10 mM H₂O₂

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση προστέθηκαν σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4.5) συγκέντρωσης 0.1 M, 0.2 ml διαλύματος DMAB συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH συγκεντρώσεως 1 mM, 0.66 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και 0.01 ml διαλύματος MnSO₄ συγκέντρωσης 20 mM. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης.

Η δραστηριότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται ως ακολούθως:

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

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

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

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

2.13. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Αντιδραστήριο Veratrylalcohol (20 mM)
- Τρυγικό νάτριο (pH 3)

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης προστέθηκαν σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (pH 3)

συγκέντρωσης 0.1 M και 0.8 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης.

2.14. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα διηθημένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instraments Inc., USA)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο (Scott Gerate TR156)
- Αντιδραστήριο Veratrylalcohol (20 mM)
- 0.1 M Τρυγικό νατριο (pH 3)
- 54 mM H₂O₂

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της λιγνίνης υπεροξειδάσης προστέθηκαν σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (pH 3) συγκέντρωσης 0.1 M, 0.8 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.03 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 54 mM, που

αναδεύτηκαν με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης.

Σε περίπτωση προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση αφαιρείται από την τελική τιμή η ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση είκοσι στελεχών μυκήτων βάση της ικανότητας τους να αποδομούν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Η αξιολόγηση των στελεχών αυτών στηρίχθηκε στη ικανότητα τους να μειώνουν το φαινολικό φορτίο, την φυτοτοξικότητα, το χρώμα και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο των ΥΑΕ. Επίσης, μελετήθηκε η παραγωγή των ενζύμων λακκάση και υπεροξειδάση (εξαρτώμενης και μη του Μπ) και η συσχέτιση αυτών με την αποδομηση των απόβλητων ελαιοτριβείων. Επιπροσθέτως εξετάστηκε και η παραγωγή βιομαζάς σε κάθε μικροοργανισμό.

3.2. Μέτρηση βιομάζας

Κατά τη μέτρηση της βιομάζας των στελεχών μυκήτων που εμβολιάστηκαν σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v, τη μεγαλύτερη μυκηλιακή μάζα παρουσίασε το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* LGMACC-22 (0.156 g), ακολουθούμενο από το μύκητα *Tyromyces lacteus* CCBAS-616 (0.131 g). Ικανοποιητική ήταν η ανάπτυξη των υπολοίπων στελεχών, με εξαίρεση εκείνη των *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA, *Hericium flagellum* CCBAS-654 και *Panus penvoides* που η βιομάζα τους ήταν μικρότερη των 0.053 g (Πίνακας 3.1). Σημειώνεται ότι δεν ήταν εφικτή η μέτρηση μυκηλιακής μάζας στην περίπτωση του μύκητα *Macrolepiota excoriata*.

3.3. Προσδιορισμός αποχρωματισμού

Κατά τον προσδιορισμό του αποχρωματισμού του διαλύματος των ΥΑΕ, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη μείωση του χρώματος προήλθε από τα στελέχη του γένους *Pleurotus* (73 με 77% σε σχέση με την τιμή της απορρόφησης του μάρτυρα), με καλύτερο το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* LGAM P69, ακολουθούμενα από τα στελέχη *Trametes versicolor* CCBAS-614 και *Hericium erinacius* IK-3001 που μείωσαν το χρώμα

κατά 66% το καθένα. Εντούτοις, τα στελέχη *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, *Panus pennooides*, *Macrolepiota excoriata* και *Hericiium flagellum* CCBAS-654 παρουσίασαν αύξηση, έως και 36%, του χρώματος των ΥΑΕ, σε σχέση με το μάρτυρα. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αποχρωματισμού.

3.4. Μέτρηση φαινολικού φορτίου

Κατά τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα ΥΑΕ, αρχικά μετρήθηκε το φαινολικό φορτίο του μάρτυρα (μη εμβολιασμένο αποστειρωμένο διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρωσεως 25% v/v) το οποίο υπολογίστηκε σε 3.4 mg ml⁻¹. Με το πέρας της επώασης των στελεχών, τη μεγαλύτερη αποδόμηση φαινολικών συστατικών προκάλεσαν τα στελέχη του γένους *Pleurotus* που μείωσαν το φαινολικό φορτίο στο 93 με 95% του μάρτυρα, ακολουθούμενα από το μύκητα *Tyromyces lacteus* CCBAS-616 (88%). Εν αντιθέσει, η μικρότερη μείωση των φαινολικών συστατικών παρατηρήθηκε στους μικροοργανισμούς *Macrolepiota excoriata*, *Panus pennooidies* και *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, που μείωσαν το αρχικό φαινολικό φορτίο των ΥΑΕ κατά 24, 32 και 35%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ολικού φαινολικού φορτίου των είκοσι στελεχών μυκήτων συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

3.5. Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας

Κατά την μελέτη της βλαστικότητας, των εμβολιασμένων με τα είκοσι στελέχη μυκήτων ΥΑΕ, διαπιστώθηκε ότι την μεγαλύτερη ικανότητα εκβλάστησης παρουσίασε το στέλεχος *Hericiium erinacius* IK-3001, μόλις με 13.2%, ακολουθούμενο από το *Pleurotus sajor-caju* CCBAS-666 με ποσοστό 12.2%. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι οι μύκητες *Ganoderma pfeifferi* LGAM, *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA, *Stereum hirsutum* CCBAS 608-180, *Hericiium flagellum* CCBAS-654 και *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, μαζί με το μάρτυρα, εμφάνισαν σχεδόν μηδενική βλαστικότητα (0.41% σε σχέση με δείγμα πόσιμου νερού) (Πίνακας 3.1).

3.6. Μέτρηση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)

Όλα τα στελέχη της παρούσης μελέτης μείωσαν ικανοποιητικά το COD των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, από 23 έως 58%, ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος μύκητα. Τη μεγαλύτερη μείωση του COD προκάλεσε ο μύκητας *Trametes versicolor* CCBAS-614 (58% - 7.9 g O₂ l⁻¹), ακολουθούμενος από το στέλεχος *Ganoderma pfeifferi* LGAM (55% - 8.4 g O₂ l⁻¹). Σε αντιδιαστολή, τη μικρότερη μεταβολή, κατά 23%, την εμφάνισε ο μύκητας *Macrolepiota excoriata* (Πίνακας 3.1).

3.7. Ενζυμική δράση των στελεχών μυκήτων

Κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των λιγνολιτικών ενζύμων, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή μόνο των ενζύμων λακκάση, Μπ-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενη από το Μπ), ενώ δεν ανιχνεύτηκε, σε κανένα στέλεχος λιγνίνη υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατριλικής αλκοόλης.

37.1. Λακκάση

Κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση, το στέλεχος *Trametes versicolor*-CCBAS-614 προκάλεσε την μεγαλύτερη δράση (225 μmol l⁻¹ min⁻¹), ακολουθούμενο από τα στελέχη του γένους *Pleurotus* και το είδος *Lentinus tigrinus*. Οι τιμές του ενζύμου λακκάση κυμαίνονταν μεταξύ 50 με 110 U l⁻¹, ενώ η τιμή της ενζυμικής δραστηριότητας στην περίπτωση του μύκητα *Lentinus tigrinus* ήταν της τάξεως των 100 U l⁻¹. Αντιθετα, τα στελέχη μυκήτων *Ganoderma australe* IK-1600, *Stereum hirsutum* CCBAS 608-180, *Hericiium erinacius* IK-3001, *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, *Panus penvoides*, *Macrolepiota excoriata* και *Tyromyces lacteus* CCBAS-616, ως αναφορά τη λακκάση, δεν παρουσίασαν καμία ενζυμική δραστηριότητα (Εικόνα 3.1).

3.7.2. Μn-υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενη του Mn)

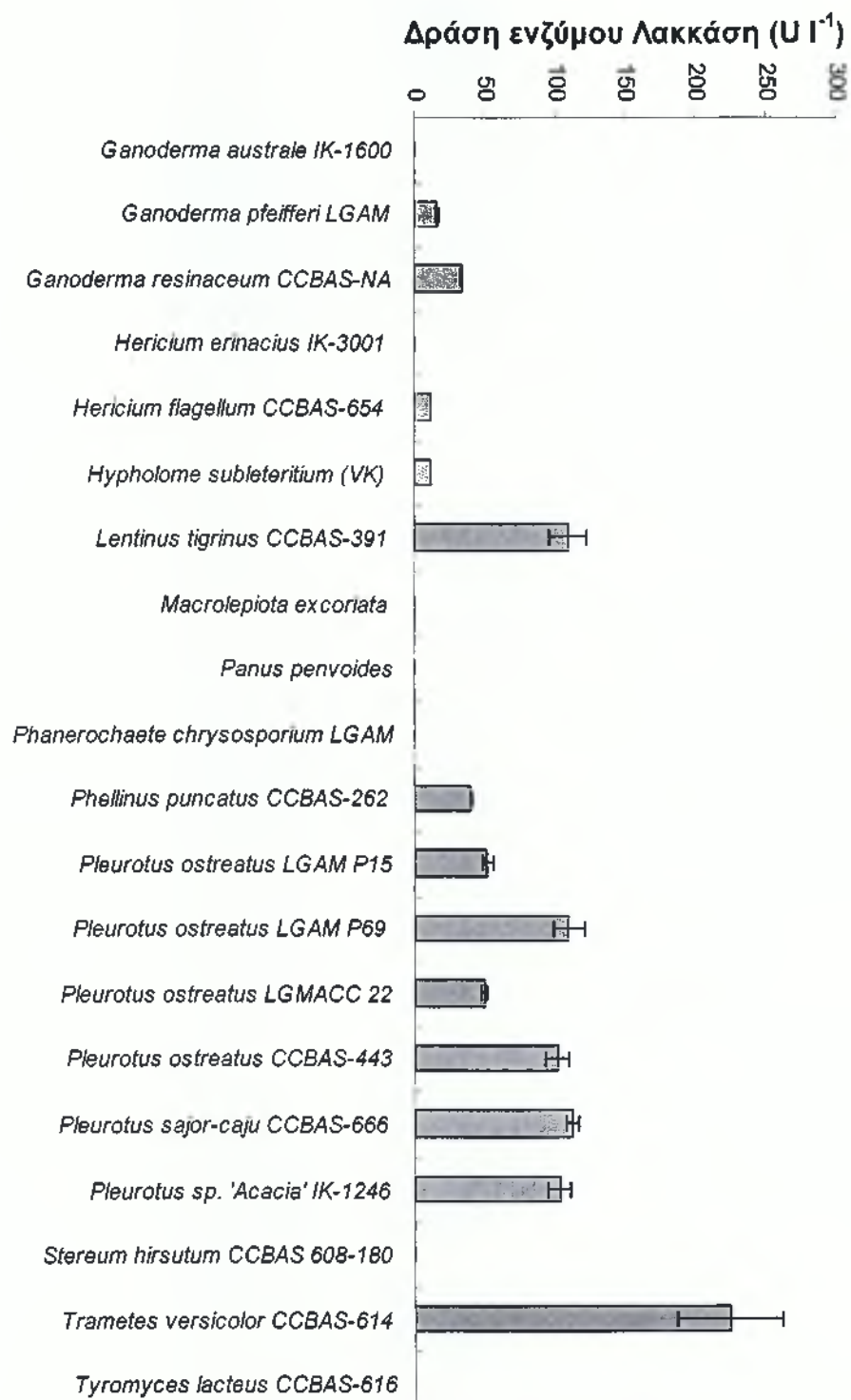
Κατά τον προσδιορισμό της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn), παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* LGAM P69, *Pleurotus* sp. 'Acacia' IK-1246 και *P. ostreatus* LGAM P15 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη παραγωγή του ενζύμου αυτού, ίση περίπου με 140, 120 και 105 U l⁻¹ αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα στελέχη, με εξαίρεση τα *Ganoderma australe* IK-1600, *Macrolepiota excoriata*, *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA, *Hericium flagellum* CCBAS-654, *Panus penvoides*, *Ganoderma pfeifferi* LGAM, *Phanerochaete chrysosporium* LGAM και *Tyromyces lacteus* CCBAS-616 που παρουσίασαν καμία ή σχεδόν καμία δραστηριότητα, εμφάνισαν ενζυμική δραστηριότητα που κυμαίνονταν μεταξύ 20 με 70 U l⁻¹ (Εικόνα 3.2).

3.7.3. Μn-υπεροξειδάση

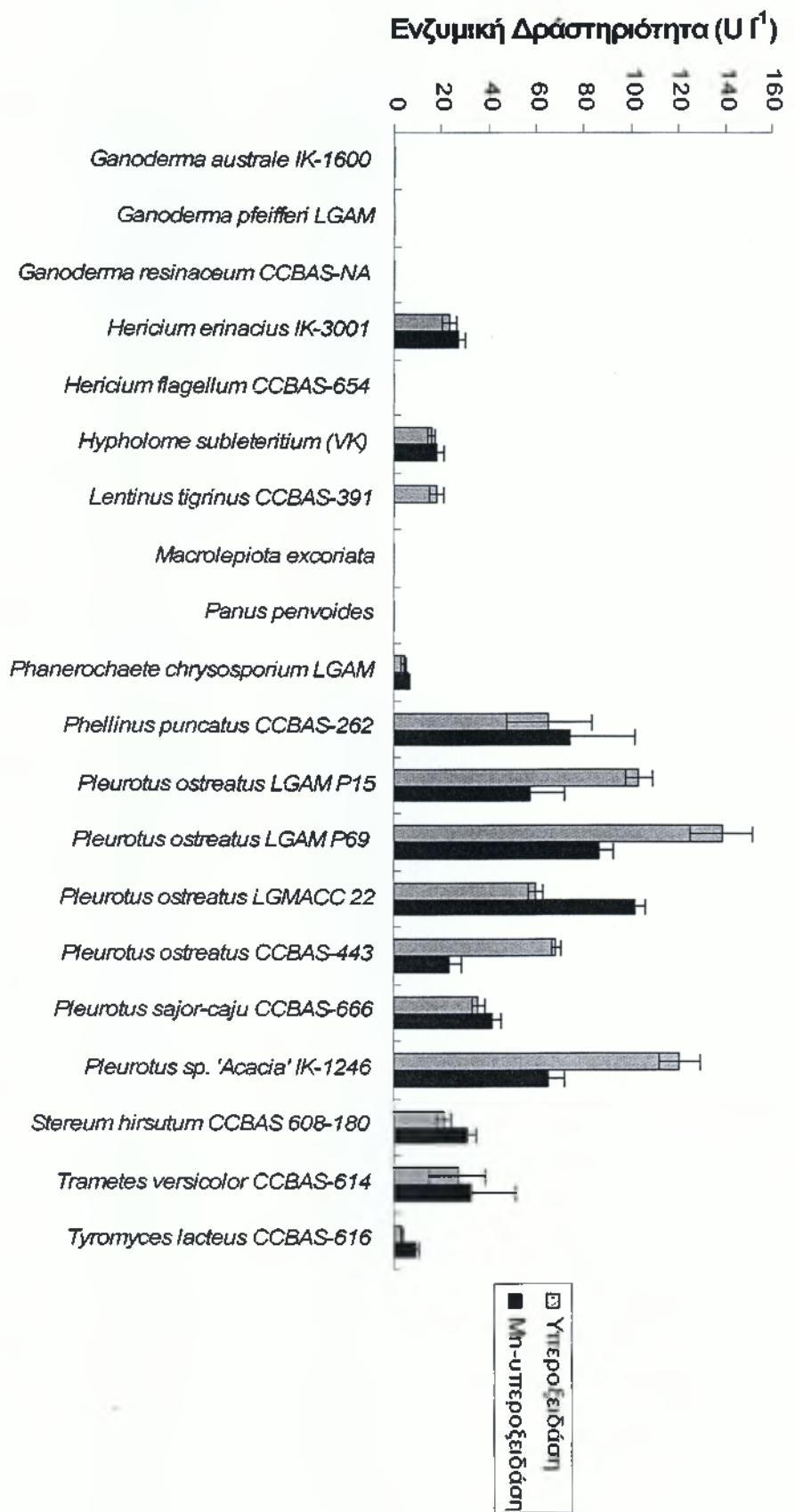
Κατά τη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση, διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* LGMACC 22 (100 U l⁻¹) και *P. ostreatus* LGAM P69 (80 U l⁻¹) παρουσίασαν τη μεγαλύτερη παραγωγή του ενζύμου αυτού. Ικανοποιητική παραγωγή Μn-υπεροξειδάση παρατηρήθηκε επίσης στο είδος *Phellinus punicatus* CCBAS-262 και σε όλα τα στελέχη του γένους *Pleurotus* (45-100 U l⁻¹), με την εξαίρεση του *P. ostreatus* CCBAS-443 που εμφάνισε μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Σε αντιδιαστολή, οι μύκητες *Ganoderma australe* IK-1600, *Macrolepiota excoriata*, *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA, *Hericium flagellum* CCBAS-654, *Lentinus tigrinus* CCBAS-391, *Panus penvoides* και *Ganoderma pfeifferi* LGAM, δεν παράγαγαν ποσότητες του παραπάνω ενζύμου (Εικόνα 3.2).

Πίνακας 3.1. Προσδιορισμός βιομάζας, απορρόφησης, φαινολικού φορτίου, δείκτη βλαστικότητας και COD σε δείγματα ΥΑΕ εμβολιασμένα με τα στελέχη μυκήτων της παρούσης μελέτης.

Στελέχη μυκήτων - Μάρτυρας	Βιομάζα (g)	Απορρόφηση ($A_{525\text{ nm}}$)	Φαινολικά (mg/ml)	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	COD ($\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}$)
<i>Ganoderma australe</i> IK-1600	0.125 ± 0.003	1.54 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.74 ± 0.24	9.5 ± 0.4
<i>Ganoderma pfeifferi</i> LGAM	0.112 ± 0.004	1.34 ± 0.02	0.83 ± 0.03	0.04 ± 0.01	8.4 ± 1.5
<i>Ganoderma resinaceum</i> CCBAS-NA	0.053 ± 0.013	2.10 ± 0.20	0.92 ± 0.05	0.06 ± 0.03	11.1 ± 1.6
<i>Hericium erinacius</i> IK-3001	0.093 ± 0.002	0.92 ± 0.08	0.42 ± 0.03	13.24 ± 2.24	9.5 ± 0.7
<i>Hericium flagellum</i> CCBAS-654	0.028 ± 0.001	3.29 ± 0.08	1.35 ± 0.04	0.05 ± 0.02	13.1 ± 0.6
<i>Hypholome subletheritium</i> (VK)	0.068 ± 0.001	1.36 ± 0.02	0.46 ± 0.01	1.10 ± 0.64	11.6 ± 0.2
<i>Lentinus tigrinus</i> CCBAS-391	0.110 ± 0.002	1.27 ± 0.02	0.55 ± 0.04	1.45 ± 0.16	8.5 ± 0.4
<i>Macrolepiota excoriata</i>	0.000 ± 0.000	2.97 ± 0.06	2.66 ± 0.06	1.84 ± 0.72	14.4 ± 0.2
<i>Panus penvoides</i>	0.035 ± 0.001	3.89 ± 0.06	2.22 ± 0.04	1.01 ± 0.28	12.8 ± 0.9
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> LGAM	0.113 ± 0.013	2.93 ± 0.03	2.11 ± 0.13	0.01 ± 0.00	11.1 ± 0.4
<i>Phellinus punctatus</i> CCBAS-262	0.073 ± 0.008	1.46 ± 0.08	0.52 ± 0.04	3.71 ± 0.70	13.7 ± 1.9
<i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P15	0.091 ± 0.002	0.75 ± 0.03	0.20 ± 0.00	9.24 ± 1.70	9.9 ± 0.4
<i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69	0.095 ± 0.003	0.67 ± 0.03	0.17 ± 0.02	7.71 ± 1.46	10.7 ± 0.3
<i>Pleurotus ostreatus</i> LGMACC 22	0.156 ± 0.010	0.68 ± 0.01	0.18 ± 0.02	11.12 ± 1.78	9.6 ± 0.3
<i>Pleurotus ostreatus</i> CCBAS-443	0.108 ± 0.001	0.75 ± 0.01	0.24 ± 0.02	6.05 ± 1.78	13.9 ± 1.1
<i>Pleurotus sajor-caju</i> CCBAS-666	0.119 ± 0.006	0.72 ± 0.03	0.22 ± 0.01	12.23 ± 1.19	9.3 ± 0.2
<i>Pleurotus</i> sp. 'Acacia' IK-1246	0.085 ± 0.001	0.78 ± 0.02	0.21 ± 0.01	10.62 ± 1.78	10.6 ± 0.3
<i>Stereum hirsutum</i> CCBAS 608-180	0.122 ± 0.024	1.80 ± 0.06	0.71 ± 0.04	0.20 ± 0.04	9.0 ± 0.3
<i>Trametes versicolor</i> CCBAS-614	0.127 ± 0.009	0.92 ± 0.13	0.43 ± 0.03	6.60 ± 1.33	7.9 ± 0.4
<i>Tyromyces lacteus</i> CCBAS-616	0.131 ± 0.010	1.44 ± 0.06	0.40 ± 0.02	8.32 ± 2.27	8.7 ± 0.5
Μάρτυρας (25% v/v ΥΑΕ)	-	2.86 ± 0.02	3.34 ± 0.09	0.41 ± 0.06	18.7 ± 1.3



Εικόνα 3.1. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση που παράχθηκε από τα στελέχη μυκήτων της παρούσας μελέτης που αναπύχθηκαν σε ΥΑΕ.



Εικόνα 3.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση που παράχθηκε από τα στελέχη μυκήτων της παρούσας μελέτης που αναπτύχθηκαν σε ΥΑΕ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Κατά την πραγμάτωση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση είκοσι στελεχών μυκήτων λευκής σήψεως, αποσκοπώντας στην επιλογή μικροοργανισμών για την αποτελεσματικότερη διαχείριση και αποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Η αξιολόγηση στηρίχθηκε κυρίως στην μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) και της φυτοτοξικότητας των ΥΑΕ, καθώς επίσης και στη μείωση του φαινολικού τους φορτίου και στον αποχρωματισμού αυτών. Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση των παραγόμενων από τους μύκητες λευκής σήψεως ένζυμων λακκάση, υπεροξειδάση, Μπ-υπεροξειδάση, λιγνίνη υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατριλικής αλκοόλης, στην αποδόμηση των ΥΑΕ.

Βάσει των αποτελεσμάτων, το στέλεχος *Trametes versicolor* CCBAS-614 ήταν αποτελεσματικότερο, σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς της παρούσης μελέτης, στην αποδόμηση των ΥΑΕ, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) (κατά 58%) και την υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση (225 U l^{-1}), έχοντας ικανοποιητική βελτίωση των υπόλοιπων δεικτών αξιολόγησης π.χ. αποχρωματισμό (κατά 70%), μείωση του φαινολικού φορτίου (κατά 87%) και αύξηση της βλαστικότητας (από 0.41% που παρουσίασε ο μάρτυρας, σε 6.6%). Επίσης, σύμφωνα με τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας, που είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την αξιολόγηση των μυκήτων στη αποδόμηση των ΥΑΕ, το στέλεχος *Hericiium erinacius* IK-3001 παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση του δείκτη από 0.41 σε 13.2% (με ταυτόχρονη μείωση φαινολικών, χρώματος και COD κατά 88, 68 και 50% αντίστοιχα) και αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματικό στην αποδόμηση των ΥΑΕ. Επίσης, τα στελέχη του γένους *Pleurotus* παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη χρησιμοποίησή τους για την καλύτερη διαχείριση των ΥΑΕ, παρουσιάζοντας ικανοποιητικές τιμές στους δείκτες αξιολόγησης, ακόμη και τις καλύτερες για συγκεκριμένους δείκτες, όπως στην περίπτωση του στελέχους *Pleurotus ostreatus* LGAM P69 που παρουσίασε την υψηλότερη δραστηριότητα υπεροξειδασών (Εικόνα 3.2).

Κατά τον προσδιορισμό του δείκτη βλαστικότητας, τα στελέχη *Ganoderma pfeifferi* LGAM, *Ganoderma resinaceum* CCBAS-NA, *Stereum hirsutum* CCBAS 608-

180, *Hericium flagellum* CCBAS-654 και *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, παρουσίασαν μεγάλη φυτοτοξικότητα (ακόμη μεγαλύτερη και από το μάρτυρα). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πιο τοξικών σε σχέση με τα συστατικά του αρχικού υποστρώματος (μη εμβολιασμένα ΥΑΕ). Επιπλέον, κατά τη μέτρηση του αποχρωματισμού των ΥΑΕ, παρατηρήθηκε αύξηση του χρώματος τους, σε σχέση με το μάρτυρα, από τους μύκητες *Phanerochaete chrysosporium* LGAM, *Panus penvoides*, *Macrolepiota excoriata* και *Hericium flagellum* CCBAS-654. Η αύξηση αυτή του χρώματος μπορεί να αποδοθεί σε παραγωγή, κατά την ανάπτυξη των στελεχών αυτών, ενώσεων που προκαλούν αύξηση της απορρόφησης στα 525 nm.

Βάσει αναφορών, ο μύκητας *Trametes versicolor* προκαλεί ικανοποιητική αποδόμηση των ΥΑΕ, παρουσιάζοντας αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση. Αυτό διαπιστώνεται από το γεγονός ότι ο μύκητας *Trametes versicolor* χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή λακκάσης σε πειράματα αποδόμησης των ΥΑΕ (Greco *et al.*, 1999).

Ο μύκητας λευκής σήψεως *Phanerochaete chrysosporium* έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες που αποσκοπούσαν στην αποδόμηση των ΥΑΕ (Dias *et al.*, 2004: Garcia-Garcia *et al.*, 2000: Sayadi και Ellouz, 1995). Στην περίπτωση του στελέχους *P. chrysosporium* ATCC 24725, σε διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 20% με προσθήκη PDA, παρατηρήθηκε αποχρωματισμός και μείωση των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ κατά 40 και 60%, αντίστοιχα, καθώς και σημαντική δράση του ενζύμου λακκάση (1 U ml^{-1}) (Dias *et al.*, 2004). Οι Sayadi και Ellouz (1995) χρησιμοποίησαν ΥΑΕ, στα οποία προστέθηκαν υψηλών συγκέντρωσεων γλυκερόλης και αζώτου, και υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης και χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου θρεπτικά υποστρώματα, για την παραγωγή λιγνίνη υπεροξειδάση και Mn-υπεροξειδάση αντίστοιχα από το στέλεχος *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. Παρατηρήθηκε ότι ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ ήταν μεγαλύτερος στην περίπτωση της παραγωγής του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση (70%) σε σχέση με την περίπτωση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (25%). Επιπροσθέτως, οι Garcia-Garcia *et al.* (2000) μελέτησαν την ανάπτυξη του *P. chrysosporium* σε ΥΑΕ, που τους είχαν προσθέσει άζωτο, με τη βοήθεια συστήματος συνεχής λειτουργίας, παρατηρώντας σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου των ΥΑΕ (έως 90%). Αντιθέτως, στην παρούσα πειραματική διαδικασία παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος *P. chrysosporium* LGAM που εμβολιάστηκε σε διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25%, προκάλεσε μικρή μείωση, συγκριτικά με τα παραπάνω παραδείγματα, φαινολικών συστατικών (κατά 35%), και καθόλου αποχρωματισμό και ενζυμική δραστηριότητα. Η απόκλιση των αποτελεσμάτων

της παρούσης μελέτης και των άλλων ερευνητικών εργασιών μπορεί να αποδοθεί: α) στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης όπως η χρήση ΥΑΕ μικρότερης συγκέντρωσης (Dias *et al.*, 2004), η προσθήκη εμπορικού θρεπτικού υποστρώματος (Dias *et al.*, 2004) και η συνεχής ανάδευση (καλύτερος αερισμός) (García-García *et al.*, 2000) ή β) στην γενετική διαφοροποίηση που παρατηρείται από στέλεχος σε στέλεχος του ίδιου είδους ή γ) στη διαφορετική σύσταση των ΥΑΕ από δείγμα σε δείγμα (D' Annibale *et al.*, 2004a; Perez *et al.*, 1998).

Όλα τα στελέχη του γένους *Pleurotus* παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την χρήση τους στην αποδόμηση των ΥΑΕ (Πίνακας 3.1: Εικόνες 3.1 και 3.2). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν εξαχθεί και από άλλες μελέτες (Aggelis *et al.*, 2003; Fountoulakis *et al.*, 2002), π.χ. οι Aggelis *et al.* (2003) χρησιμοποίησαν δύο στελέχη *Pleurotus ostreatus*, τα LGAM P113 και P115, που προκάλεσαν μείωση των φαινολικών συστατικών στο μισό κατά την ανάπτυξη τους σε 50% v/v ΥΑΕ υπό συνεχή ανάδευση. Τονίζεται ότι οι Fountoulakis *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν στην έρευνα τους ένα από τα στελέχη *Pleurotus* της παρούσας μελέτης, τον μύκητα λευκής σήψεως *Pleurotus ostreatus* LGAM P69, που τον εμβολίασαν σε αποστειρωμένο διάλυμα ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50%, προκαλώντας μείωση των φαινολικών συστατικών και του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κατά 78.3 και 10% αντιστοίχως. Η σχετικά καλύτερη δράση του στελέχους αυτού που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη (μείωση του φαινολικού φορτίου και του COD κατά 95 και 43% αντίστοιχα), σε σχέση με αυτές των Fountoulakis *et al.* (2002), αποδίδεται στη χρησιμοποίηση ΥΑΕ μικρότερης συγκεντρώσεως (25% έναντι 50%) και/ή στο μικρότερο όγκο του υποστρώματος που εμβολιάστηκε (50 ml έναντι 100 ml), πιθανόν λόγω καλύτερου αερισμού του υποστρώματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, M., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S., (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the progress *Water Research* **37**, 3897-3904.
2. 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.
3. Amat, A. M., Di San Filippo, P., Rinaldi, A., Sanjust, E., Satt, G. and Viola, A., (1986). Acque di vegetazione dell' industria olearia: Materia prima o rifiuto inquinante? «Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or polluting waste?». *Riv. Merceol.* **25**, 183-199.
4. Aragon, J. M., Palancar, M. C., Torrecilla, J. S. and Serrano, M., (1997). Drying alpeorujo in Fluidized-moving bed. *Proceedings in International Symposium on the olive wastes*, Kalamata, Greece, 5-8 Nov., 1997.
5. Attanasio, A., Diano, N., Grano, V., Sicuranza, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Di Martino, S., Canciglia, P. and Mita, D. G., (2005). Nonisothermal Bioreactors in the Treatment of Vegetation Waters from Olive Oil: Laccase versus Syringic Acid as Bioremediation Model. *Biotechnology Progress* **21**, 806-815.
6. Borja-Padilla, R., Alba-Mendoza, J. and Banks, C. J., (1995). Activated sludge treatment of wash waters derived from the purification of virgin olive oil in a new manufacturing process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **64**, 25-30.
7. Borja-Padilla, R., Martin M. A., Fiestas Ros de Ursinos J. A. and Maestro-Duran, R., (1990). Efecto de inhibicion en el proceso de biometanization del alpechin en biorreactores con microorganismos inmovilizados en diversos tipos de soportes.

- «Effect of the inhibition of olive mill waste-waters biomethanation in bioreactors with microorganisms immobilized on various types of support». *Grasas y Aceites* **41**, 397-403.
8. 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.
 9. Cabrera, F., (1996). The problem of the olive oil wastes in Spain: Treatment or recycling? *Proc. 7th Mediterranean Conf. on Organic Waste Recycling in Soils*, Vieste, Italy, **1**, 1117-1125, Ordine Nazionale dei Biologi (Eds.: Landi, E. and Dumonet, S.).
 10. Cabrera, F., Toca, C. G., Diaz-Barrientos, E. and Arambarri, P., (1984). Acid minewater and agricultural pollution in a river skirting the Donna National Park Guadiamar river, South West Spain. *Water Resource* **18**, 1469-1482.
 11. Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A. and Scognamiglio, F., (1992). Isolation spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetables waste waters. *Phytochemistry* **31**, 4125-4128.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.

15. D' Annibale, A., Casa, R., Pieraccetti, F., Ricci, M. and Marabottini, R., (2004a). *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* **54**, 887–894.
16. D' Annibale, A., Ricci, M., Quarantino D., et al., (2004). *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology* **155**, 596-603.
17. D' Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., Sermanni, G.G., (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula-edodes* and its use in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* **77**, 1151-1158.
18. De la Rubia, T., Linares, A., Perez, J., Munoz-Dorado, J., Romera, J., Martinez, J., (2002). Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the lignolytic fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Research in Microbiology* **153**, 547-554.
19. 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.
20. Fenice, M., Sermanni, G. G., Federici, F. and D' Annibale, A., (2003). Submerged and solid – state production of laccase and Mn – peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewaters – based media. *Journal of Biotechnology* **100**, 77–85.
21. Fountoulakis, M. S., Dokianakis, S. N., Kornaros, M. E., Aggelis, S. E., Lyberatos, G., (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewater using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Resource* **36**, 4735-4744.
22. Garcia Garsia, I., Pena, P. R. J., Venceslada J. L. B., Martin, M. M. A., Santos, M. E. and Ramos-Gomez, E., (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* **35**, 751-758.

23. Georgacakis, D. and Dalis, D., (1993). Controlled anaerobic digestion of settled olive oil wastewaters. *Bioresource Technology* **46**, 221–226.
24. Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M. A. and Bollag, J. M., (2003). Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Resource* **37**, 3205–3215.
25. 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.
26. Gonzalez – Lopez, J., Bellido, E. and Benitez, C., (1994). Reduction of total polyphenols in olive mill wastewaters by physico – chemical purification. *Journal of Environmental Science Health Part A* **29**, 851–865.
27. Greco, G. Jr., Toscano, G., Cioffi, M., Gianfreda, L. and Sannino, F., (1999). Dephenolisation of olive mill wastewaters by olive husk. *Water Resource* **33**, 3046–3050.
28. Hamdi, M., (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill waste waters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **37**, 155-163.
29. Hamdi, M., (1993). Future prospects and constraints of olive oil mill wastewaters use and treatment: a review. *Bioprocess Engineering* **8**, 209-214.
30. Jaouani, A., Guillen, F., Renninckx, M. J., Martinez, A. T. and Martinez, M. J., (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* **36**, 478–486.
31. Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M. and Renninckx, M. J., (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 802–809.

32. Jemmett, M. T., Carrieri, C., Leo, de P. and Kaspiotis, G. D., (1983). Esperienze di osmosi inversa ed ultrafiltrazione di acque di vegetazione delle olive con moduli a membrane piane. «Experiences with reverse osmosis and ultrafiltration of olive processing wastewaters using a flat membrane module». *Riv Soc Ital Sci Aliment* **12**, 37–46.
33. 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.
34. Kachouri, F. and Hamdi, M., (2004). Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* **39**, 841–845.
35. Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L. and Sannia, G., (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **30**, 1914-1918.
36. Mitrakas, M., Papageorgiou, G., Docoslis, A. and Sakellaropoulos, G., (1996). Evaluation of various pre-treatment methods for olive oil mill wastewaters. *European Water Pollution Control* **6**, 10–16.
37. Moreno, E., Quevedo – Sarmiento, J. and Ramos – Cormenzana, A., (1990). Antibacterial activity of washwater from olive mills. *Encyclopaedie of Environmental Control Technology* **3**, 731–736.
38. Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N. and Papadopoulou, K. K. (2005). Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology (In Press)*.
39. Nunes, J. M., Pereira, S., Albardeiro, A., Silva, C., Lopez – Pineiro, A. and Pintado, C., (2001). Potentialities of olive mill waste utilisation as organic fertilizer for Mediterranean regions soils. *Revista de Ciencias Agrarias* **24**, 166-175.

40. Perez, J., de la Rubia, T., Hamman, O. Ben and Martinez, J., (1998). *Phanerochaete flavido - alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2726–2729.
41. Ramos – Cormenzana, A., Monteoliva – Sanchez, M. and Lopez, M. J., (1996). bioremediation of alpechin. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation* **35**, 249–268.
42. Rampichini, M., (1987). New applications of ultrafiltration: Effluents from synthetic fibers and olive oil production. *Chimica Oggi* **4**, 21.
43. Riffaldi, R., Levi – Minzi, R., Saviozzi, A., Vanni, G. and Scagnozzi, A., (1993). Effects of the disposal of sludge from olive processing on some oil characteristics: Laboratory experiments. *Water, Air and Soil Pollutions* **69**, 257–264.
44. Rozzi, A., Passimo, R. and Limoni, N., (1989). Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactor. *Processing Biochemistry* **24**, 68–74.
45. Ruiz, J. C., de la Rubia, T., Perez, J. and Martinez – Lopez, J., (2002). Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavido - alba*. *FEMS Microbiology Letters* **212**, 41–45.
46. 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.
47. Sayadi, S. and Ellouz, R. (1995). Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1098-1103.
48. Serguei, L., Timofeevski, N., Reading, S. and Aust, S. D., (1998). Mechanisms for Protection against Inactivation of Manganese Peroxidase by Hydrogen Peroxide 1. *Biochemistry and Biophysics* **356**, 287–295.

49. 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 (laccase) activity. *Bioresource Technology* **84**, 251-257.
50. Velioglu, S. G., Curi, K. and Cammilar, S. R., (1987). Laboratory experiments on the physical treatment of olive oil wastewaters. *International Journal in Developing Technology* **5**, 49–57.
51. 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.
52. 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, Winsconsin, USA.
53. 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.
54. Zervakis, G., Yatras, P. and Balis, C., (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *International Bioreterioration and Biodegradation* **38**, 237-243.
55. Zoiopoulos, P. E., (1983). Study on the use of olive by – products in animal feeding in Greece. *Animal Production and Health Divisions*, FAO, Rome, 1983.
56. Zucconi F., Pera A., Forte M. and De Bertoldi M., (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* **22**, 54-57.