

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας με τίτλο «Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία».



*«Αξιολόγηση της επίδρασης υποστρωμάτων από γεωργικά παραπροϊόντα στην παραγωγή εδώδιμων μανιταριών του είδους *Hericium erinaceus* και σε επιλεγμένα διατροφικά χαρακτηριστικά τους»*

Λάρου Α. Ευαγγελία

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΖΕΡΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας με τίτλο «Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία».

*«Αξιολόγηση της επίδρασης υποστρωμάτων από γεωργικά παραπροϊόντα στην παραγωγή εδώδιμων μανιταριών του είδους *Hericium erinaceus* και σε επιλεγμένα διατροφικά χαρακτηριστικά τους»*

Λάρου Α. Ευαγγελία

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΖΕΡΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Αξιολόγηση της επίδρασης υποστρωμάτων από γεωργικά παραπροϊόντα στην παράγωγή εδώδιμων μανιταριών του είδους *Hericium erinaceus* και σε επιλεγμένα διατροφικά χαρακτηριστικά τους»*

ΛΑΡΟΥ Α. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΖΕΡΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ – ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΕΛΗ: ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΙΔΗΣ ΙΟΡΔΑΝΗΣ - ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΟΥΝΤΖΟΥΡΗΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ - ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Περιεχόμενα

1	Περίληψη.....	8
2	Abstract.....	9
3	Θεωρητικό μέρος.....	10
3.1	Ελιά και ελαιόλαδο	10
3.1.1	Γενικά.....	10
3.1.2	Πρόελευση και εξάπλωση της ελιάς	12
3.1.3	Το ελαιόδεντρο.....	12
3.1.4	Παραγωγή ελαιολάδου	14
3.1.5	Απόβλητα ελαιοτριβείου.....	21
3.1.6	Περιβαλλοντικές επιπτώσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων.....	26
3.1.7	Τρόποι επεξεργασίας και διάθεσης των αποβλήτων ελαιοτριβείων	28
3.2	Μύκητες	34
3.2.1	Εισαγωγή	34
3.2.2	Γενικά χαρακτηριστικά των μυκήτων.....	34
3.2.3	Βασιδιομύκητες.....	36
3.2.4	Λιγνινολυτικό σύστημα μυκήτων λευκής σήψης.....	39
3.2.5	Διατροφική αξία μανιταριών	42
3.3	Σκοπός της εργασίας	44
4	Υλικά και μέθοδοι.....	46
4.1	Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα.....	46
4.1.1	Πρώτο πείραμα με καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα.....	46
4.1.2	Δεύτερο πείραμα με καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα	57
4.2	Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα.....	58
4.2.1	Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου σε διάφορα στερεά υποστρώματα εντός σωλήνων (‘race tubes’)	58
4.2.2	Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού για καλλιέργεια μανιταριών («σπόρος» – spawn)	61

4.2.3	Καλλιέργεια μανιταριών	62
4.2.4	Ανάλυση σύστασης καρποφοριών.....	64
4.3	Στατιστική ανάλυση.....	72
5	Αποτελέσματα	73
5.1	Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα.....	73
5.1.1	Αποτελέσματα πρώτου πειράματος	73
5.1.2	Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος καλλιέργειας σε υγρά υποστρώματα	80
5.2	Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα.....	87
5.2.1	Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα (‘race tubes’).....	87
5.2.2	Καλλιέργεια μανιταριών	89
5.2.3	Ανάλυση σύστασης καρποφοριών.....	90
6	Συζήτηση.....	93
6.1	Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα.....	93
6.2	Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα.....	97
6.2.1	Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα.	97
6.2.2	Καλλιέργεια μανιταριών	97
6.2.3	Ανάλυση της σύστασης των μανιταριών	98
7	Συμπεράσματα	99
8	Βιβλιογραφία.....	100

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το τέλος της μεταπτυχιακής μου διατριβής σηματοδοτείται το τέλος μιας πορείας δυο ετών όντας μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φθάνοντας στο τέλος της μεταπτυχιακής μου φοίτησης θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένα πρόσωπα που με τη βοήθεια τους συντέλεσαν στην περάτωση των σπουδών μου στην διερεύνηση των γνώσεων και των οριζόντων μου.

Αρχικά, η παρούσα μελέτη δε θα ολοκληρωνόταν χωρίς την αμέριστη και καθοριστική παρουσία του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιου, ο οποίος ήταν παρών όποτε και να το χρειάστηκα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης. Τον ευχαριστώ θερμά για την υπομονή του και την αντοχή του που με βοήθησαν να φτάσω σήμερα εδώ.

Έπονται των ευχαριστιών μου τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, οι Επίκουροι Καθηγητές κ. Μουντζούρης Κωνσταντίνος για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον του για την πρόοδο μου, και ο κ. Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης για τη συνεχή στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια τόσο των προπτυχιακών αλλά και των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, που με βοηθούσαν και με στήριζαν καθημερινά σε ότι και αν χρειάστηκα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κουτρώτσιο Γεώργιο για την αμέριστη συμπαράσταση του και την ουσιαστική βοήθεια του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους καθηγητές και το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων, για τη άριστη συνεργασία και βοήθεια την οποία μου παρείχαν σε ότι και αν χρειάστηκα, καθώς και τον εγκάρδιο τρόπο με τον οποίο με φιλοξένησαν στο εργαστήριό τους.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους μεγαλύτερους αρωγούς μου. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αναστάσιο και Μαριάνθη, καθώς και τον αδερφό μου Περικλή που πίστεψαν σε έμένα και με στήριξαν με κάθε μέσο που μπορούσαν να διαθέσουν ψυχολογικό, ηθικό και οικονομικό σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ.

1 Περίληψη

Η διαχείριση των παραπροϊόντων από την καλλιέργεια της ελιάς και την ελαιουργία είναι δύσκολη λόγω της ποικιλομορφίας τους και της σύστασης τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί πιθανή αξιοποίηση τους μέσω της καλλιέργειας μυκήτων λευκής σήψης των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Hericiium erinaceus*. Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε υγρά μέσα με τα προαναφερθέντα είδη και εκτιμήθηκαν οι μεταβολές στο pH, στην ένταση χρώματος, στα ολικά φαινολικά, στο δείκτη βλαστικότητας και στην αγωγιμότητα. Ακόμη, μετρήθηκε η βιομάζα και η ενεργότητα των ενζύμων που παρήχθησαν από στελέχη των συγκεκριμένων ειδών. Παράλληλα έγιναν και καλλιέργειες με παραπροϊόντα ελαιοκομίας με σκοπό την παραγωγή μανιταριών του είδους *Hericiium* από εναλλακτικά υποστρώματα, στα οποία έγιναν και επιλεγμένες χημικές αναλύσεις για θρεπτικά συστατικά στο τελικό προϊόν.

Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν πειραματικά μείωσαν κατά το ήμισυ περίπου την αρχική συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και την ένταση του χρώματος των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Επίσης, διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων διαπιστώθηκε σε όλα τα στελέχη, αφού παρατηρήθηκαν ανόμοιες ενεργότητες ανάμεσα στα ένζυμα, ενώ η επαγωγή της παραγωγής τους έγινε σε διαφορετικούς χρόνους. Τα στελέχη *Pleurotus ostreatus* και *Hericiium erinaceus* 4514 χρησιμοποίησαν κυρίως τη λακκάση για την αποτοξικοποίηση του αποβλήτου, ενώ το *H. erinaceus* 3001 τις υπεροξειδάσες (ανεξάρτητη και εξαρτημένη του μαγγανίου).

Η χρήση των κλαδεμάτων ελιάς σε μείγματα με πριονίδι οξιάς για την καλλιέργεια μανιταριών του είδους *Hericiium* δεν επηρέασε τη μυκηλιακή ανάπτυξη, αλλά μετέβαλλε το ύψος παραγωγής σε μανιτάρια και τη βιολογική αποδοτικότητα. Η μέγιστη βιολογική αποδοτικότητα εμφανίστηκε στο υπόστρωμα με 100% κλαδέματα ελιάς και υπερτερούσε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα (πριονίδι οξιάς). Επιπλέον, οι καρποφορίες δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση στα θρεπτικά συστατικά τους. Συμπερασματικά, η αντικατάσταση του υποστρώματος καλλιέργειας με κλαδέματα ελιάς προτείνεται όχι μόνο για την αξιοποίηση των υπολειμμάτων από την καλλιέργεια της ελιάς, αλλά και για την αύξηση της παραγωγής εδώδιμων μανιταριών.

2 Abstract

The by-products of olive cultivation and olive oil production are difficult to manage because of their diversity and their constitution. The purpose of this study was to investigate possible use of these by-products in cultivation of white rot fungi *Pleurotus ostreatus* 179 and *Hericiium erinaceus*. (3001 and 4514). Liquid cultures with olive mill wastes were performed with the aforementioned strains and measured the changes in pH, color intensity, total phenolics, GI values and conductivity. Further, biomass and activity of the enzymes generated by the strains were measured. Solid cultures were made on substrates with olive prunings to produce mushrooms of the genus *Hericiium*, which were analyzed for selected nutritional characteristics.

Through experimentation, it was observed that all the strains tested were able to reduce by about half the initial concentration of total phenolics and color intensity of mill waste. Furthermore, different behavior regarding the production of ligninolytic enzymes found in all strains, as measured disparate activities between the enzymes and the induction of the production was done at a different time.

The use of olive pruning mixed with sawdust for growing mushrooms of the genus *Hericiium* not affect the mycelial growth and biological efficacy, but changed its biological efficacy. The maximum efficiency occurred in biological substrate with 100% olive prunings. Moreover, the produced fruits showed no variation in nutritional characteristics. In conclusion, the replacement the substrate with olive pruning is proposed not only for the exploitation of residues from cultivation, but also to increase production.

3 Θεωρητικό μέρος

3.1 Ελιά και ελαιόλαδο

3.1.1 Γενικά

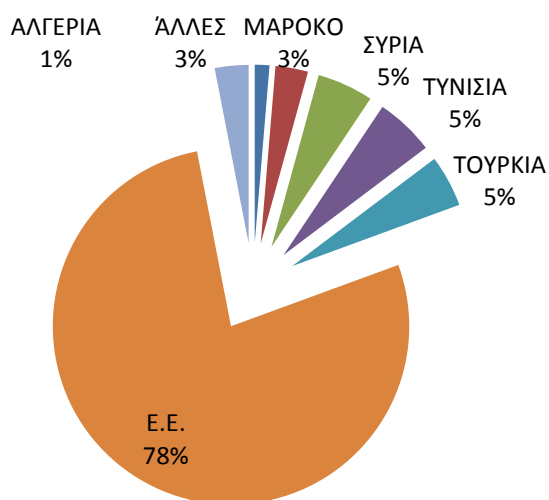
Η παραγωγή ελαιολάδου είναι ένας από τους σημαντικότερους πυλώνες στήριξης της αγροτικής παραγωγής στην Ελλάδα. Η επιτραπέζια ελιά και το ελαιόλαδο παράγεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης, όπου εντοπίζεται η 78% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (περίπου 2.290.000 τόνοι, κατά μέσο όρο 1990/1991-2011/2012) (www.internationaloliveoil.org). Οι χώρες της Μεσογείου έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό καλλιέργειας και παραγωγής ελαιολάδου την Ευρώπη, ενισχύοντας την αγροτική οικονομία, την τοπική κληρονομιά και το περιβάλλον (Niaounakis, et al., 2006).



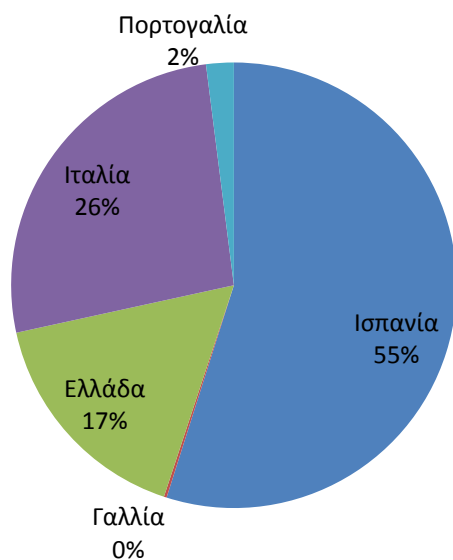
Εικόνα 1 Περιοχές που παράγουν ελαιόλαδο στην λεκάνη της Μεσογείου. Σκιασμένες περιοχές: υψηλή παραγωγικότητα, διάστικτες περιοχές: χαμηλή παραγωγικότητα (Niaounakis, et al., 2006).

Η Ελλάδα έχει σημαντική συμβολή στην παγκόσμια ελαιοπαραγωγή, έχοντας την τρίτη θέση παγκοσμίως (390.200 τόνοι κατά μέσο όρο ετησίως, που αντιστοιχεί στο 16.5% της ευρωπαϊκής παραγωγής, 1990/1991 – 2011/2012). Στις πρώτες θέσεις της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου βρίσκονται η Ισπανία (1.188.300 τόνοι κατά μέσο όρο, που

αντιστοιχεί στο 54,75% της ευρωπαϊκής παραγωγής, περιόδους 1990/1991 – 2011/2012) και η Ιταλία(571.700 τόνοι κατά μέσο όρο, που αντιστοιχεί στο 26,35% της ευρωπαϊκής παραγωγής, περιόδους 1990/1991 – 2011/2012) (www.internationaloliveoil.org).



Εικόνα 2: Μέση παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου για την περίοδο 1990/1991-2011/2012 (www.internationaloliveoil.org).



Εικόνα 3: Μέση ευρωπαϊκή παραγωγή ελαιόλαδου για την περίοδο 1990/1991-2011/2012 (www.internationaloliveoil.org).

3.1.2 Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς

Το ελαιόδεντρο καλλιεργείται σε περιορισμένη έκταση ανά την υφήλιο, και καταλαμβάνει μόνο τις περιοχές της εύκρατης ζώνης στο νότιο και βόρειο ημισφαίριο. Η καλλιέργεια της ελιάς απαιτεί ιδιαίτερες εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες, ώστε να αναπτυχθεί, να ανθοφορήσει οπότε και να καρποφορήσει αρκετά, δίνοντας μια αξιόλογη παραγωγή.

Το ελαιόδεντρο είναι στενά συνδεδεμένο με το χριστιανικό πολιτισμό και με την ιστορία και τις δοξασίες των μεσογειακών λαών. Η καταγωγή του χάνεται μέσα στους θρύλους και τις παραδόσεις των λαών της Μεσογείου (Θερίος, 2005; Μπαλατσούρας, 1999).

Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαίους χρόνους. Η εμφάνιση και η καλλιέργεια της φθάνουν στην προϊστορική εποχή. Μερικοί βοτανικοί θεωρούν ότι η ελιά κατάγεται από τις ανατολικές μεσογειακές περιοχές. Ο Fisher (1904) αναφέρει ότι η ελιά έχει έλθει στις ανατολικές μεσογειακές περιοχές από τη Β.Δ. Ινδία δια μέσου του Ιράν, όπου το γένος *Olea* εκπροσωπείται από έναν αριθμό διαφορετικών ειδών, Αργότερα, επεκτάθηκε προς τις δυτικές μεσογειακές περιοχές. Ο Chevalier (1948) έχει τις ίδιες απόψεις, αλλά δεν υπάρχουν μαρτυρίες για την ύπαρξη της ελιάς στις μεσογειακές περιοχές κατά την νεολιθική εποχή. Ο Π. Αναγνωστόπουλος σε ανακοίνωση του στην Ακαδημία Αθηνών το 1951 υποστηρίζει, βασιζόμενος σε ευρήματα που βρέθηκαν σε ανασκαφές, ότι η πατρίδα της ελιάς είναι η Κρήτη. Την υπόθεση αυτή ενισχύει το γεγονός ότι το όνομα της είναι ελληνικό. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες η καλλιέργεια της ελιάς άρχισε να επεκτείνεται στη Ν. Αφρική, Χιλή, Αργεντινή, Αυστραλία, Κίνα, Ιαπωνία και αλλού (Ποντίκης, 2000).



Εικόνα 4 Ελιά
(www.olivemuseumnouves.com)

3.1.3 Το ελαιόδεντρο

3.1.3.1 Βοτανική ταξινόμηση

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα *Olea*, *Syringa*, *Forsythia*, *Ligustrum*, *Fraxinus* και *Phillyrea*.

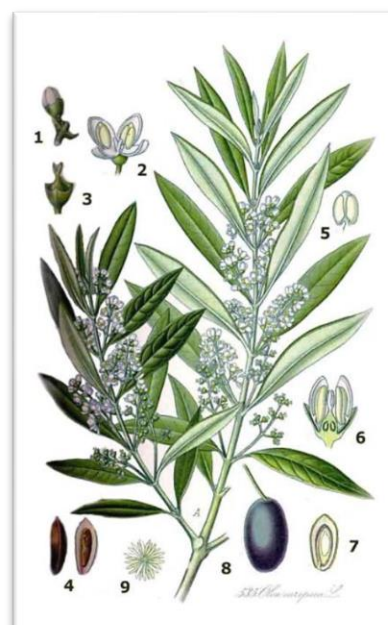
Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 διαφορετικά είδη, που είναι διασπαρμένα στις πέντε ηπείρους. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα εξής (Σαρλής, 1999):

1. *Olea europea*. L. subsp *euromediterranea*
2. *Olea cryhysophylla*
3. *Olea hochstetteri*
4. *Olea somaliensis*
5. *Olea subtrinervata*

3.1.3.2 Περιγραφή της ελιάς

Η βοτανική ονομασία της ελιάς είναι *Olea europea sativa*. Είναι δένδρο υπεραιώνιο και αιθαλές και το καλλιεργούμενο είδος κατάγεται από τη Μεσόγειο. Προσαρμόζεται άριστα σε ζεστά, ξηρά και μακράς διάρκειας καλοκαίρια. Ακόμη διαθέτει μεγάλη αντοχή και τις χαμηλές θερμοκρασίες έως και 0°C. Το ενήλικο δένδρο έχει μεσαίο μέγεθος και κατά περίπτωση μπορεί να φτάσει και τα 10 μέτρα ύψος. Υπάρχουν ακόμη και νάνες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως καλλωπιστικά (Θερίος, 2005).

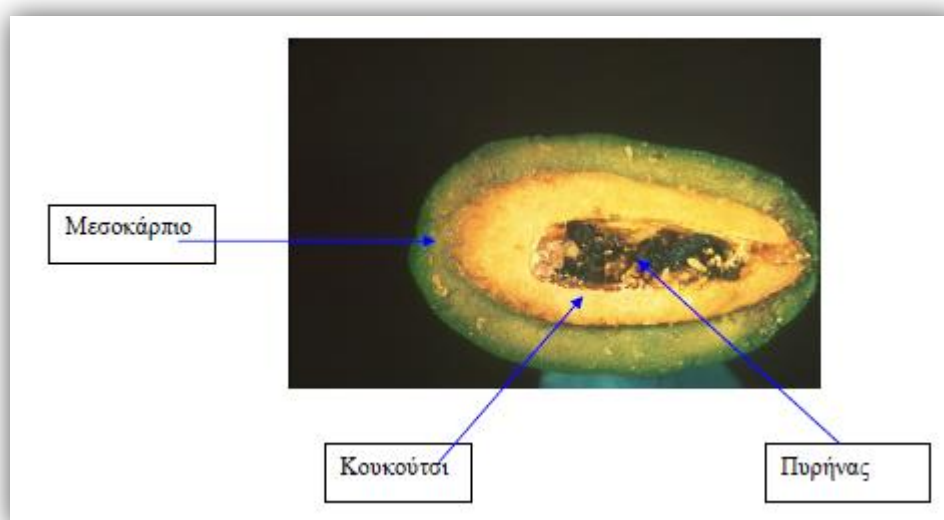
Το ελαιόδενδρο μέχρι να φτάσει σε πλήρη παραγωγή απαιτεί 8-10 έτη. Παρόλα αυτά υπάρχουν ποικιλίες που δίνουν ικανοποιητική παραγωγή σε 4-6 χρόνια. Η ανθοφορία της ελιάς είναι το Μάιο και τα άνθη της είναι μικρά σε μέγεθος, έχουν ημίλευκο χρώμα. Τα φύλλα της είναι μικρά με απαλό πράσινο χρώμα, στο πάνω μέρος πράσινο και ασημί στο κάτω. Η ωρίμανση του καρπού αρχίζει τον Οκτώβρη. Η συγκομιδή αν πρόκειται για την επιτραπέζια ελιά που προορίζεται για πράσινη ελιά τουρσί γίνεται τον Οκτώβρη. Αν πρόκειται να καταναλωθούν σαν αλατισμένες ή μαύρες ή για την παραγωγή του ελαιολάδου, η συλλογή γίνεται τον Δεκέμβρη που ο καρπός έχει αρχίσει να μαυρίζει. Συνοπτικά, στη Λεκάνη της Μεσογείου, η ανθοφορία της ελιάς εντοπίζεται από τον Απρίλιο-Μάιο, ενώ η συγκομιδή γίνεται από τα τέλη Νοεμβρίου μέχρι το Φεβρουάριο στις νότιες περιοχές. Τα μέρη του ελαιοκάρπου είναι το μεσοκάρπιο το κουκούτσι και ο πυρήνας. Το μεγαλύτερο μέρος του καρπού αποτελείται από νερό (50%), υδατάνθρακες (20%) και λιπίδια (30%) (Azbar, et al., 2004).



Εικόνα 5: Περιγραφή της ελιάς (kaufmann-mercantile.com)

Πίνακας 1: Σύσταση επιμέρους τμημάτων του καρπού (Azbar, et al., 2004)

Συστατικά	Μεσοκάρπιο (%)	Κουκούτσι (%)	Πυρήνας (%)
Νερό	50 - 60	9,3	30
Λιπίδια	15 - 30	0,7	27,3
Αζωτούχες ενώσεις	2 - 5	3,4	10,2
Σάκχαρα	3 - 7,5	41	26,6
Κυτταρίνη	3 - 6	38	1,9
Μέταλλα	1 - 2	4,1	1,5
Πολυφαινόλες	2 - 2,25	0,1	0,5 - 1
Άλλα	-	3,4	24



Εικόνα 6 Επιμέρους τμήματα ελαιοκάρπου

3.1.4 Παραγωγή ελαιολάδου

3.1.4.1 Ελαιοτριβείο-Γενική περιγραφή

Τα σύγχρονα ελαιοτριβεία είναι εξέλιξη των παραδοσιακών ελαιοτριβείων. Είναι μικρού μεγέθους αγρο-βιομηχανικές εγκαταστάσεις που λειτουργούν εποχιακά και στις οποίες γίνεται η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο. Σήμερα, λειτουργούν τόσο σύγχρονα ελαιοτριβεία όσο και κάποια παραδοσιακά ελαιοτριβεία σε περιορισμένο αριθμό.

Από τα αρχαία χρόνια ακόμη υπήρχαν ελαιοτριβεία για την παραγωγή ελαιολάδου. Η σύνθλιψη του καρπού της ελιάς γινόταν με δύο οριζόντιες σε στρογγυλό σχήμα πλάκες. Ο ελαιόκαρπος έμπαινε ανάμεσα τους, έπειτα εργάτες μετακινούσαν μέσω ενός κεντρικού

άξονα την υπερκείμενη πλάκα περιστροφικά. Μετέπειτα, η υπερκείμενη οριζόντια πλάκα αντικαταστάθηκε με μια ή περισσότερες μυλόπετρες, οποίες ήταν τοποθετημένες σε ένα μεγάλο και πλατύ δοχείο. Ο ελαιόκαρπος μεταφερόταν σε αυτό το μεγάλο δοχείο και γινόταν πολτός. Η κίνηση του κεντρικού άξονα τους γινόταν είτε με εργάτες είτε με άλογο ή και με μηχανικό κινητήρα. Στη συνέχεια ο ελαιοπολτός έμπαινε σε ειδικά σακιά και μεταφερόταν για επεξεργασία στα ελαιοπιεστήρια. Το λάδι καθαριζόταν σε δεξαμενές ή ακόμα και σε ειδικά δοχεία. Μέχρι σήμερα, τα παραδοσιακά ελαιοτριβεία έχουν αντικατασταθεί σχεδόν αποκλειστικά από σύγχρονες εγκαταστάσεις επεξεργασίας ελαιοκάρπου. Κάθε σύγχρονο ελαιοτριβείο διαθέτει τα ειδικά μηχανήματα κάποιου συστήματος παραγωγής ελαιολάδου (διφασικό – τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα) καθώς και βοηθητικούς και αποθηκευτικούς χώρους (Φακλάρης, 2003).

Η ιδιαιτερότητα του ελαιοκάρπου εμφανίζεται μετά την άλεση του, αφού ο διαχωρισμός της υγρής φάσης από τη στερεή είναι παρουσιάζει δυσκολίες. Ο ελαιόκαρπος όταν αλεσθεί ολόκληρος δίνει τη λεγόμενη πάστα ή ελαιοζύμη που έχει δύο χαρακτηριστικά κριτικής σημασίας για το διαχωρισμό του λαδιού:

- Μεγάλη ελαστικότητα, που οφείλεται στα τεμαχίδια της επιδερμίδας του καρπού.
- Τάση να σχηματίζει εύκολα γαλακτώματα φυτικών υγρών-λαδιού με την παρέμβαση ορισμένων συστατικών του καρπού που δρουν ως γαλακτωματοποιητές (Μπαλατσούρας, 1999).

3.1.4.2 Παραγωγική διαδικασία

Ακόμα και σήμερα υπάρχουν κάποια παραδοσιακά ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν το υδραυλικό πιεστήριο. Η παραγωγή ελαιολάδου στα σύγχρονα ελαιοτριβεία βασίζεται στην φυγόκεντρο δύναμη και γίνεται κυρίως με 2 διαφορετικές διαδικασίες. Τα φυγοκεντρικά συστήματα επεξεργασίας χωρίζονται στα διφασικά και τα τριφασικά αναλόγως με τα τελικά προϊόντα τους. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα τους κυρίως στην ποσότητα των υγρών αποβλήτων και των υπόλοιπων παραπροϊόντων που παράγουν (Sierra, et al., 2001).

Τα στάδια επεξεργασίας του ελαιόκαρπου σε ένα ελαιοτριβείο είναι τα παρακάτω:

- Παραλαβή ελαιόκαρπου

Η μεταφορά του ελαιοκάρπου από τους ελαιώνες στο ελαιοτριβείο γίνεται σε πλαστικά τελάρια με σπές αερισμού ή σε πλαστικούς σάκους με φορτηγό αυτοκίνητο, όπου ζυγίζονται

και αρχίζει η επεξεργασία τους. Η αποθήκευση του καρπού δε συνίσταται αλλά αν είναι απαραίτητη θα πρέπει να είναι για μικρό χρονικό διάστημα και σε χώρο με καλό αερισμό.

- Τροφοδοσία-Αποφύλλωση καρπού

Τα φύλλα της ελιάς όταν συνθλίβονται προσδίδουν πικρή γεύση στο λάδι και δίνει προϊόν κατώτερης ποιότητας, καθώς εμπλουτίζεται με χλωροφύλλη. Έτσι η αποφύλλωση είναι απαραίτητη και γίνεται μαζί με την απομάκρυνση φερτών υλικών που μπορεί να υπάρχουν μαζί με τους καρπούς της ελιάς όπως πέτρες κ.α.

- Πλύσιμο

Η ποιότητα του ελαιολάδου υποβαθμίζεται από την παρουσία ξένων σωμάτων στην ελαιόμαζα (χώμα, πέτρες, κ.α.) επειδή επηρεάζεται αρνητικά το άρωμα, η γεύση και η οξύτητα του λαδιού. Όταν στον καρπό υπάρχει αργιλική σκόνη της οποίας είναι δύσκολη η απομάκρυνση, τότε το ελαιόλαδο επηρεάζεται κατά την αποθήκευση και ταγγίζει γρήγορα. Κατά συνέπεια το πλύσιμο που ελαιοκάρπου είναι απαραίτητο για την παραγωγή ενός αξιόλογου προϊόντος. Το νερό μπορεί να ανακυκλωθεί μετά από κατακρήμνιση ή διήθηση των στερεών συστατικών του. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία απαιτούνται περίπου 100-120 L νερό για 1000 kg ελαιοκάρπου.

- Πολτοποίηση ελαιοκάρπου

Η διαδικασία της πολτοποίησης του ελαιοκάρπου είναι ίσως το σημαντικότερο στάδιο παραγωγής ελαιολάδου για την απόδοση και για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Υπάρχει ιδιαίτερη δυσκολία καθώς ο καρπός αποτελείται από:

- Στερεές ουσίες (πυρήνας, σάρκα και ενδοσπέρμιο)
- Υγρές ουσίες (λάδι και φυτικά υγρά)
- Πολύ ελαστικές ουσίες (φλοιός)

Στα σύγχρονα ελαιουργεία για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιούνται μεταλλικοί μύλοι, σφυρόμυλοι και σπαστήρες με οδοντωτούς δίσκους. Στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η άλεση του καρπού γινόταν με κυλινδρικές μολόπετρες.

- Μάλαξη ελαιοζύμης

Η μάλαξη γίνεται σε ειδικά συγκροτήματα τους θερμομαλακτήρες με τη προσθήκη ζεστού νερού και την ανάμειξη του με την ελαιοζύμη. Η ελαιοζύμη έχει θερμανθεί στους 28-30°C για την διευκόλυνση της διαδικασίας. Στο στάδιο αυτό, τα σταγονίδια μικρής διαμέτρου του

ελαίου συνενώνονται σε μεγαλύτερες σταγόνες που απομακρύνονται εύκολα από τον ελαιοπολτό κατά τη διαδικασία της συμπίεσης.

- Εξαγωγή ελαιολάδου

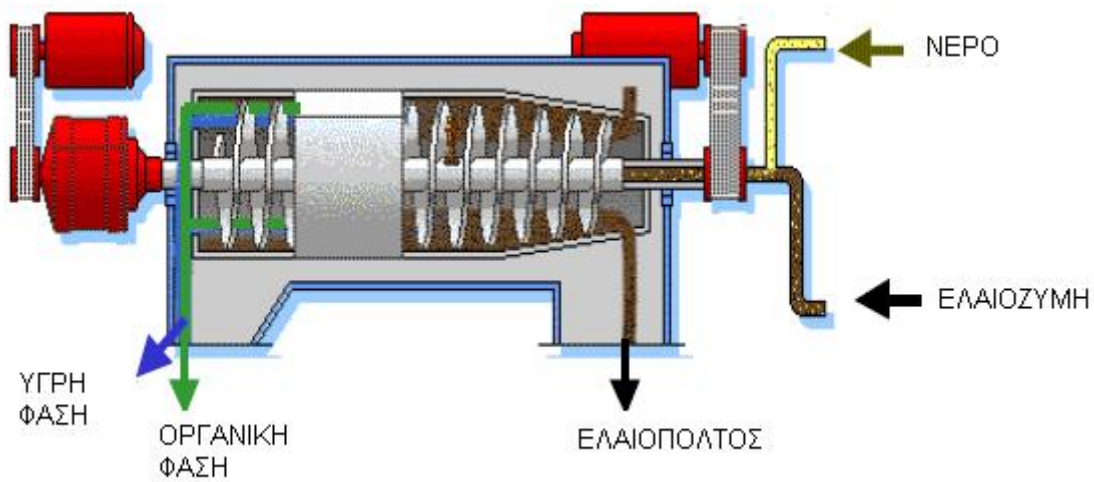
Η εξαγωγή ελαιολάδου από τον ελαιοπολτό μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους: την παραδοσιακή (με πίεση) και τα φυγοκεντρικά συστήματα. Η διάκριση των φυγοκεντρικών συστημάτων γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των φάσεων στις οποίες διαχωρίζεται ο ελαιοπολτός (2 φάσεων-3 φάσεων).

Παραδοσιακή μέθοδος

Η διαδικασία αυτή γινόταν με πίεση και για αρκετές δεκαετίες ήταν η μοναδική μέθοδος παραλαβής ελαιολάδου. Με την εφαρμογή πίεσης διαχωριζόταν η υγρή φάση (μίγμα λαδιού/νερού) από τη στερεή. Στη συνέχεια γινόταν διαχωρισμός του λαδιού από την υγρή φάση. Η παραγωγή αποβλήτων ήταν 350 kg ελαιοπυρήνα και 450 kg υγρών αποβλήτων για 1000 kg ελαιοκάρπου. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι μια ασυνεχής παραγωγική διαδικασία, αν και σε σχέση με τις φυγοκεντρικές μεθόδους η ποσότητα των αποβλήτων είναι μειωμένη σημαντικά.

Φυγοκεντρικό σύστημα 3 φάσεων

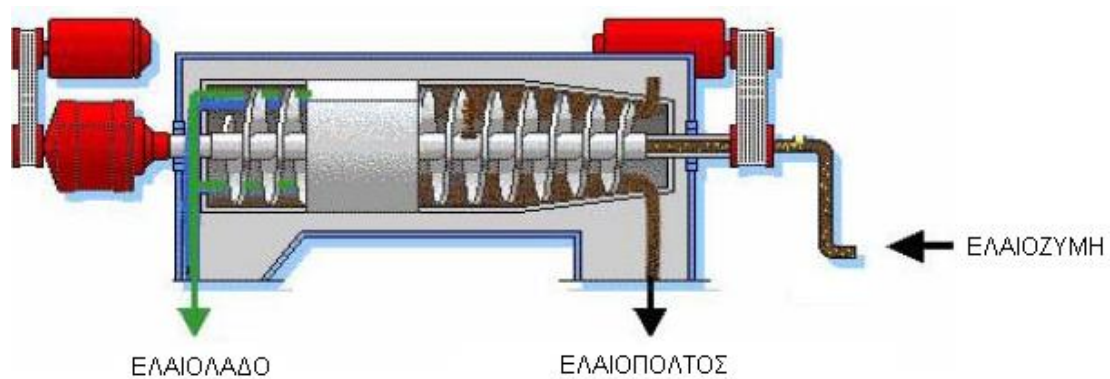
Τη δεκαετία του '70 στόχος της ελαιουργίας ήταν να αυξηθεί η ποσότητα που ήταν ικανό ένα ελαιοτριβείο να επεξεργασθεί, να αυξηθεί η απόδοση της εξαγωγής ελαιολάδου και κυρίως να μειωθεί η χειρωνακτική εργασία. Κάπως έτσι φτάσαμε στη δημιουργία των ελαιοτριβείων τριών φάσεων. Η εξαγωγή του ελαιολάδου γίνεται με την επίδραση της φυγόκεντρου δύναμης μέσω ενός φυγοκεντρικού διαχωριστήρα (decanter). Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται ο ελαιοπυρήνας, το ελαιόλαδο και τα λιόζουμα (3 φάσεις). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αυξημένη κατανάλωση νερού και τα συνέπεια οι μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων που παράγονται. Ειδικότερα, παράγονται 500 kg ελαιοπυρήνα και 1200 kg υγρά απόβλητα από την επεξεργασία 1000 kg ελαιοκάρπου (1,25-1,7 φορές περισσότερο νερό απ' ό τι στην εξαγωγή με πίεση).



Εικόνα 7 Τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα ελαιτριβείου

Φυγοκεντρικό σύστημα 2 φάσεων

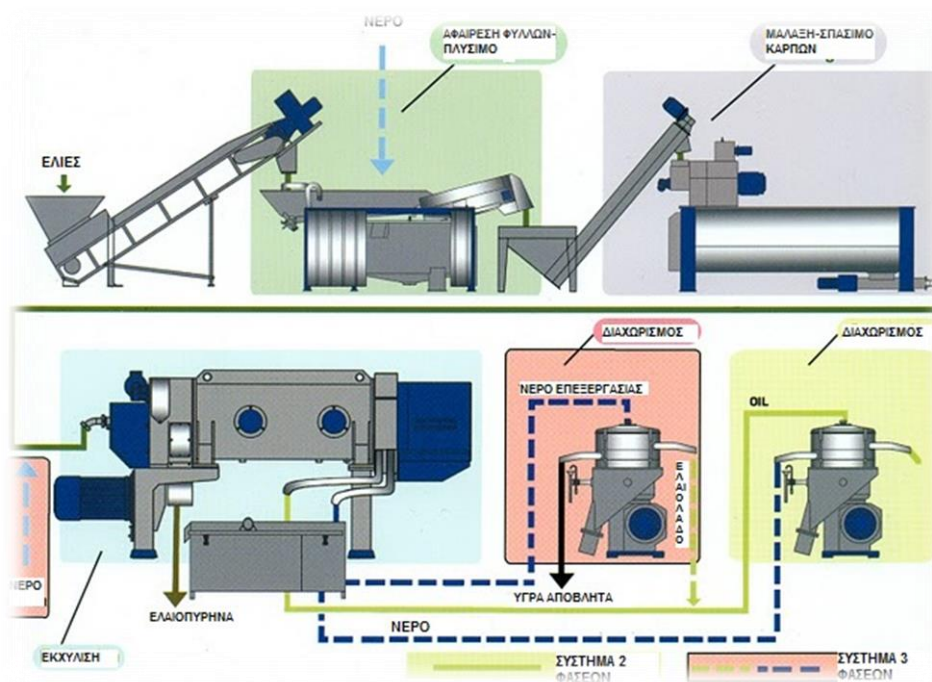
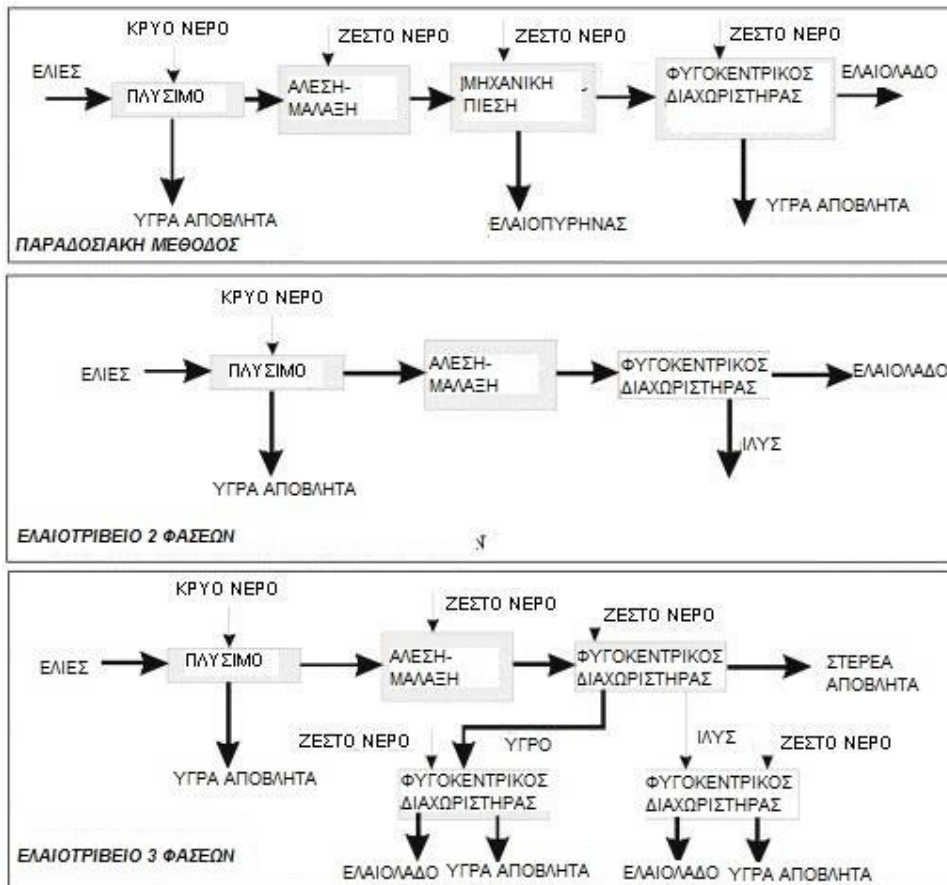
Τα μειονεκτήματα του τριφασικού συστήματος διαχωρισμού οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός φυγοκεντρικού συστήματος δύο φάσεων. Κατά τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιείται μόνο το νερό πλυσίματος χωρίς την προσθήκη άλλης ποσότητας νερού. Το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται στην υγρή φάση και η ελαιοπυρήνα ως μια ημιστερεή φάση στην οποία ενσωματώνονται και τα λιόζυμα. Κατά την επεξεργασία 1000 kg είναι 800 kg. Η μείωση της κατανάλωσης νερού και η απουσία υγρών αποβλήτων είναι το πλεονέκτημα του διφασικού συστήματος. Σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η ελαιοπυρήνα που παράγεται έχει αυξημένη υγρασία και υψηλό ρυπαντικό φορτίο. Κατά συνέπεια είναι δύσκολη στο χειρισμό, στη μεταφορά και στην επεξεργασία.



Εικόνα 8 Διφασικό φυγοκεντρικό σύστημα ελαιτριβείου

- Τελικός διαχωρισμός-Καθαρισμός ελαιολάδου

Στο τελευταίο στάδιο επεξεργασίας γίνεται διαχωρισμός του ελαιολάδου με φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες από τα φυτικά υγρά και τα νερά της έκπλυσης. Ο τελικός διαχωρισμός εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το ιξώδες και το ειδικό βάρος της υγρής φάσης, καθώς και από το σχήμα και τις διαστάσεις των ελαιοσταγονιδίων. Κάποιες φορές το ελαιόλαδο διηθείται και σε ειδικά φίλτρα κυτταρίνης, αφού μετά τον διαχωρισμό είναι θολό. Αυτό συμβαίνει επειδή, στο ελαιόλαδο υπάρχουν φυσαλίδες αέρα ή γαλακτώματα ελαίου και φυτικών υγρών που σχηματίζονται με την παρεμβολή γαλακτωματοποιητών (διάφορα μεγαλομοριακά συστατικά της ελαιομάζας). Τέλος, μέσω παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων (κόσκινα απολάσπωσης), αφαιρούνται τα στερεά συστατικά (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού και πυρηνόξυλου) που μπορεί να περιέχονται. Το περιεχόμενο σε στερεά σωματίδια είναι 0,5-1% του συνολικού βάρους της υγρής φάσης (Κυριτσάκης, 2009; McNamara, et al., 2008; Μπαλατσούρας, 1999; Kapellakis, et al., 2008; Roig, et al., 2006).



Εικόνα 9 Στάδια παραγωγής ελαιολάδου (www.oliveoiltimes.com)

3.1.5 Απόβλητα ελαιοτριβείου

Κατά την επεξεργασία του ελαιόλαδου, εκτός από το κύριο προϊόν δηλαδή το ελαιόλαδο, παράγονται και παραπροϊόντα όπως τα φύλλα και τα κλαδιά των ελαιόδεντρων και ο ελαιοπυρήνας. Ακόμη, παράγονται και μεγάλες ποσότητες αποβλήτων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο. Η διαχείριση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων των ελαιοτριβείων έχει ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία, καθώς βιομηχανική μονάδα πρέπει να κάνει περιβαλλοντική διαχείριση των παραπροϊόντων και των αποβλήτων της σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

3.1.5.1 Στερεά απόβλητα

Ο όρος στερεά απόβλητα αναφέρεται στο μίγμα στερεών συστατικών όπως ο ελαιοπυρήνας και τα φύλλα των ελαιόδεντρων. Η επεξεργασία του ελαιοπυρήνα γίνεται σε ειδικές εγκαταστάσεις, τα πυρηνελοουργεία. Από τη διαδικασία προκύπτουν ετησίως 17000 τόνοι πυρηνέλαιου και 160000 τόνοι πυρηνόξυλο. Ειδικότερα, ο ελαιοπυρήνας ξεραίνεται στους 60 °C και επεξεργάζεται με διάλυμα εξανίου (Genedebien, et al., 2001).

Πίνακας 2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαιοπυρήνα (Niaounakis and Halvadakis 2006)

Παράμετροι	Διεργασία με πίεση	Ελαιοουργείο III φάσεων	Ελαιοουργείο II φάσεων
Υγρασία, %	27,21 ± 1,048	50,23 ± 1,935	56,80 ± 2,188
Λίπη και έλαια, %	8,72 ± 3,254	3,89 ± 1,449	4,65 ± 1,736
Πρωτεΐνες, %	4,77 ± 0,024	3,43 ± 0,017	2,87 ± 0,014
Ολικά σάκχαρα, %	1,38 ± 0,016	0,99 ± 0,012	0,83 ± 0,010
Κυτταρίνη, %	24,14 ± 0,283	17,37 ± 0,203	14,54 ± 0,170
Ημικυτταρίνη, %	11,00 ± 0,608	7,92 ± 0,438	6,63 ± 0,366
Τέφρα, %	2,36 ± 0,145	1,70 ± 0,105	1,42 ± 0,088
Λιγνίνη, %	14,18 ± 0,291	10,21 ± 0,209	8,54 ± 0,175
Ολικό άζωτο (κατά Kjeldahl), %	0,71 ± 0,010	0,51 ± 0,007	0,43 ± 0,006
Φώσφορος ως P ₂ O ₅ , %	0,07 ± 0,005	0,05 ± 0,004	0,04 ± 0,003
Φαινολικές ενώσεις, %	1,146 ± 0,06	0,326 ± 0,035	2,43 ± 0,15
Κάλιο ως K ₂ O, %	0,54 ± 0,045	0,39 ± 0,033	0,32 ± 0,027
Ασβέστιο ως CaO, %	0,61 ± 0,059	0,44 ± 0,043	0,37 ± 0,036
Ολικός άνθρακας, %	42,90 ± 3,424	29,03 ± 2,317	25,37 ± 2,025
Λόγος C/N	60,79 ± 5,352	57,17 ± 5,033	59,68 ± 5,254
Λόγος C/P	588,0 ± 51,25	552,9 ± 48,20	577,2 ± 50,31

3.1.5.2 Υγρά απόβλητα

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Olive Mill Wastewater – OMW) ονομάζονται λιόζουμα ή κασίγαρος. Η επεξεργασία τους είναι απαραίτητη καθώς παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία, από την αραίωση της ελαιοζύμης με νερό, την προσθήκη νερού κατά τη πλύση του καρπού, τη μάλαξη και τον διαχωρισμό του ελαιολάδου και από τα φυτικά υγρά του ελαιοκάρπου. Τα υγρά απόβλητα δημιουργούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα όταν απορριφθούν χωρίς επεξεργασία, λόγω της υψηλής ρυπογόνου δύναμης που έχουν. Χαρακτηρίζονται από:

- Σκούρο καφέ χρώμα έως μαύρο
- Χαρακτηριστική οσμή
- Υψηλό οργανικό φορτίο
- Όξινο pH
- Υψηλή αγωγιμότητα
- Υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινολών
- Υψηλή περιεκτικότητα σε στερεό υλικό

Το κύριο συστατικό των υγρών αποβλήτων είναι το νερό. Όσον αφορά το οργανικό κλάσμα, αποτελείται κυρίως από σάκχαρα όπως η φρουκτόζη, γλυκόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη (Arienzo, et al., 2003). Οι οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα απόβλητα ελαιοτριβείου μπορούν να ταξινομηθούν σε

- α) Ενώσεις εύκολης και άμεσης αφομοίωσης από μικροοργανισμούς
- β) πολυμερή ή βιοαποικοδομήσιμα, όπως πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες, πηκτίνες
- γ) δύσκολα αποικοδομήσιμα συστατικά όπως φαινόλες, τανίνες, μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες.

Συνεπώς, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων είναι ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Ακόμη, η περιεκτικότητά τους σε άζωτο είναι χαμηλή. Περιέχεται κυρίως αμμωνιακό, νιτρικό και οργανικό άζωτο (μικρό ποσοστό πρωτεϊνικής φύσεως). Επίσης, υπάρχουν οργανικά οξέα όπως οξικό, οξαλικό, φουμαρικό, γλυκερικό, μαλικό, τρυγικό και κιτρικό. Ένα ακόμα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των υγρών αποβλήτων είναι η ισχυρή φυτοτοξικότητα. Είναι επιβλαβή για φυτά με επιφανειακό ριζικό σύστημα και για φυτά που είναι στο βλαστικό στάδιο χωρίς να παρουσιάζει εξειδίκευση (Carasso, et al., 1992; Ouzounidou, et al., 2010). Η υψηλή τοξικότητα προέρχεται από τη συγκέντρωση πολυφαινολών (Mulinacci, et al., 2001). Επίσης, περιέχει πολυαλκοόλες, όπως η γλυκερίνη και η μανιτόλη, λιπαρές ουσίες και ίχνη γλυκοζιδίων (Azbar, et al., 2004).

Τελικά, όσον αφορά τα ανόργανα άλατα, στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων περιέχονται κυρίως άλατα του καλίου, φωσφόρου και ασβεστίου. Επιπλέον, μικρά ποσοστά αλάτων νατρίου και μαγνησίου, θειικά άλατα και ίχνη βαρέων μετάλλων. Ειδικά, τα στοιχεία που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για λίπασμα έχουν ιδιαίτερη σημασία όπως το κάλιο, το μαγνήσιο και ο φώσφορος (Roig, et al., 2006; Mekki , et al., 2006).

Η σύνθεση των αποβλήτων δε είναι σταθερή και εξαρτάται από (Niaounakis, et al., 2006):

- Την ποικιλία προέλευσης της ελιάς, το στάδιο ωριμότητας, την περιεκτικότητα σε νερό και το χρόνο αποθήκευσης του καρπού πριν την ελαιοποίηση.
- Τη μέθοδο παραλαβής του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη, με την κλασσική μέθοδο του υδραυλικού πιεστηρίου, με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης τριών ή δύο φάσεων. Κάθε τύπος ελαιοτριβείου έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε επιπλέον νερό κατά τη διεργασία. Σαν αποτέλεσμα αυτού, τα φυτικά υγρά παράγονται από τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων, όπου και χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες νερού, να υφίστανται κάποια αραιώση.
- Την ποσότητα του νερού που είναι διαθέσιμη για την επεξεργασία του ελαιοκάρπου.
- Τον χρόνο αποθήκευσης. Η αποθήκευση μπορεί να αλλάξει τα βιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου, καθώς παρατηρείται έντονη βιολογική δραστηριότητα (αύξηση της οξύτητας), καθώς επίσης και φυσικοχημικές μεταβολές όπως η καθίζηση στερεών.

Πίνακας 3: Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων (Sierra, et al., 2001)

Παράμετρος	Όρια τιμών
pH	4,5-6
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD ₅ g/l)	35-100
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ g/l)	40-195
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC g/l)	22-64
Ανόργανα στοιχεία (g/l)	5-14
Πολυφαινόλες (g/l)	3-24
N (g/l)	5-15
P (g/l)	0,3-1,1
K(g/l)	2,7-7,2
Ca (g/l)	0,12-0,75
Mg (g/l)	0,10-0,40
Στερεά %	5,5-17,6

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά αποβλήτων κλασικών και τριφασικών ελαιοτριβείων (Kapellakis, et al., 2008)

Παράμετρος	Κλασικό	Φυγοκεντρικό τριών φάσεων
ρΗ	4,5-5,5	4,7-5,2
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ g/l)	120-130	60-180
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD ₅ g/l)	90-100	20-55
Αιωρούμενα στερεά (%)	0,1	0,9
Ολικά στερεά (%)	12	6
Ολικά σάκχαρα	2-8	0,5-2,6
Οργανικές ουσίες (%)		
Αζωτούχες ενώσεις	0,5-2	0,1-2,6
Οργανικά οξέα	0,1-1,5	0,2-0,4
Πολυαλκοόλες	1-1,5	0,3-0,5
Πηκτίνες, ταννίνες	1-1,5	0,2-0,5
Πολυφαινόλες	2-2,4	0,3-0,8
Λίπη	0,03-1	0,5-2,3
Ανόργανα στοιχεία (%)		
P	0,11	0,03
K	0,72	0,27
Ca	0,07	0,02
Mg	0,04	0,01
Na	0,09	0,03
Cl	0,03	0,01

3.1.5.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αποβλήτου διφασικού ελαιοτριβείου

Πίνακας 5: 5Χαρακτηριστικά διφασικού αποβλήτου (Cargueta, et al., 2006)

Παράμετρος	Διφασικό απόβλητο
Οργανικές ενώσεις (%)	94,3
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC %)	55,1
Ολικό άζωτο (TN g/kg)	11,3
Φώσφορο (g/kg)	0,9
Κάλιο (g/kg)	2,4
Λιγνίνη (%)	47,5
Κυτταρίνη (%)	16,5
Ημικυτταρίνες (%)	38,7
Σάκχαρα (g/kg)	96
Λίπη(g/kg)	202
Φαινόλες (g/kg)	12,2
pH	5,2
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (EC dS/m)	5,2

Το διφασικό σύστημα, συγκριτικά με τους άλλους δύο τύπους ελαιοτριβείων παράγει μεγαλύτερες ποσότητες στερεού αποβλήτου. Πλεονεκτεί όμως διότι παράγει μικρότερη ποσότητα υγρών αποβλήτων. Η επιπλέον προσθήκη νερού στο τριφασικό σύστημα μειώνει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε σχέση με τα απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου.

Στον ελλαδικό χώρο, η πλειοψηφία των ελαιοτριβείων λειτουργούν με το τριφασικό σύστημα επεξεργασίας. Υπάρχουν, ωστόσο, και κάποια παραδοσιακά αλλά σε πολύ μικρό αριθμό. Σε αντίθεση, με την Ισπανία που η συντριπτική πλειονότητα των εγκαταστάσεων των ελαιοτριβείων είναι διφασικά πλέον (www.prodosal.gr). Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι στην Ελλάδα τα περισσότερα πυρηνελουργεία που υπάρχουν δεν μπορούν να επεξεργαστούν τον υγρό ελαιοπυρήνα που παράγεται από τα διφασικά ελαιοτριβεία.

3.1.6 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων

Τα απόβλητα ελαιοτριβείου λόγω του υψηλού ρυπαντικού τους φορτιού, κατατάσσονται ανάμεσα στα πιο επιβλαβή απόβλητα για το περιβάλλον. Το περιβαλλοντικό πρόβλημα εντείνεται ακόμη περισσότερο όταν διοχετεύονται σε φυσικούς αποδέκτες όπως ποτάμια, θάλασσες, λίμνες και ρεματιές.

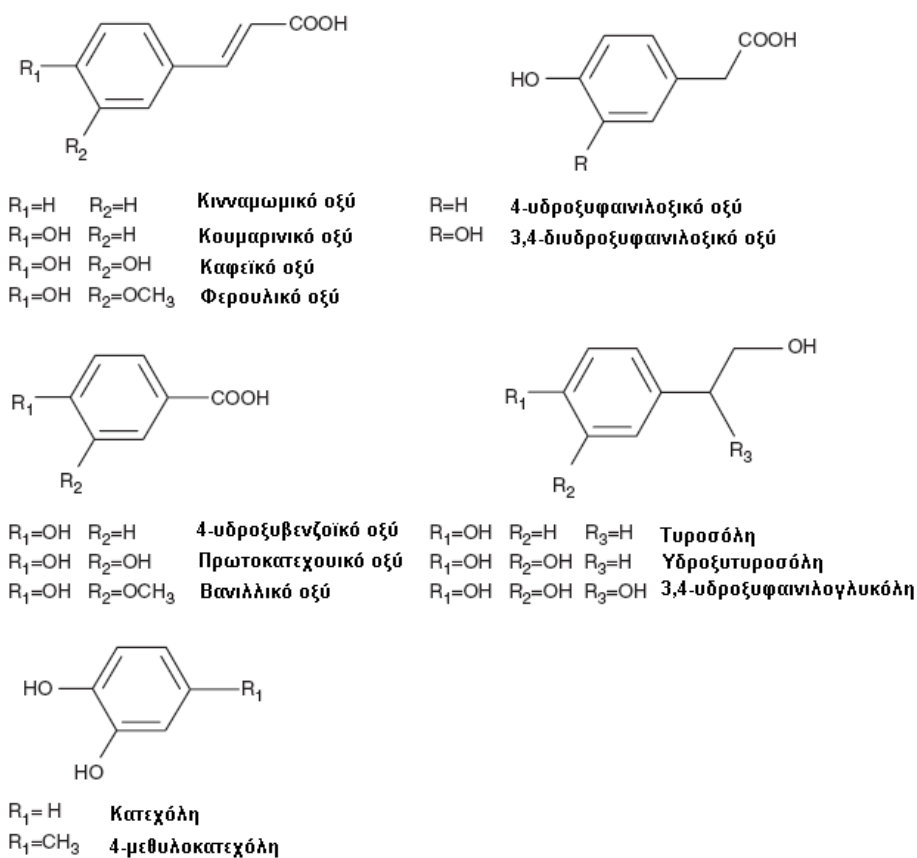
Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, όταν απορρίπτονται ανεξέλεγκτα στους κοντινούς υδάτινους αποδέκτες δημιουργούν προβλήματα σε όλο το υδάτινο οικοσύστημα. Η πρώτη και πιο εμφανής συνέπεια είναι η αλλαγή του χρώματος των υδάτων που συμβαίνει λόγω του πολυμερισμού και της οξειδωσης των ταννινών που περιέχονται στα απόβλητα. Επίσης, παρατηρείται ενίσχυση του φαινομένου του ευτροφισμού. Αυτό συμβαίνει διότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών (συμπερ. και των φυκών) αυξάνεται αρκετά, βοηθούμενος από τη αυξημένη συγκέντρωση φωσφόρου και οργανικών ενώσεων. Παράλληλα, η μεγάλη συγκέντρωση φαινολών, φωσφόρου και πολυσακχαριτών είναι τοξική για κάποια είδη μικροοργανισμών (Fiorentino, et al., 2003), ενώ άλλα είδη μικροοργανισμών ευνοούνται από την υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αναπτύσσονται ταχύτερα και σε βάρος των υπολοίπων. Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι υπάρχουν υδρόβιοι οργανισμοί που ακόμα και μικρές ποσότητες αποβλήτου μπορεί να είναι τοξικές για αυτούς (Fiorentino, et al., 2004).

Τέλος, το έδαφος λόγω της μεγάλης δυνατότητας βιοαποικοδόμησης που έχει, για πολλά χρόνια είχε γίνει αποδέκτης των αποβλήτων ελαιοτριβείων. Αυτό όμως μπορεί να συνεπάγεται και σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα του εδάφους, ειδικά εάν εφαρμοστούν μεγάλες ποσότητες σε μικρό χρονικό διάστημα.

- Αλλαγές στο πορώδες του εδάφους (Niaounakis, et al., 2006)
- Μικροβιοστατική και μικροβιοκτόνο δράση
- Φυτοτοξική δράση λόγω:
 - Ύπαρξη πολυφαινολών
 - Αύξηση αλάτων
 - Παρουσία οργανικών οξέων (Ouzounidou, et al., 2010).

3.1.6.1 Φαινολικές ενώσεις

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων είναι ο βασικός παράγοντας που έχει συνδεθεί με την τοξικότητα και την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων ελαιολιτριβείου (Mekki, et al., 2006). Διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε απλές φαινόλες (ταννίνες μικρού μοριακού βάρους και φλαβονοειδή) και στις πολυφαινόλες (σκούρου χρώματος πολυμερή από τον πολυμερισμό και την οξείδωση απλών φαινολικών ενώσεων). Η συγκέντρωση των φαινολικών στο ελαιόλαδο εξαρτάται από την ωριμότητα του καρπού, τον τρόπο και το χρόνο της αποθήκευσης, τον τύπο του ελαιολιτριβείου καθώς και από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής. Φαινολικά συστατικά υπάρχουν στο ελαιόδενδρο στον καρπό αλλά και στα φύλλα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ανάλογα με τον τύπο του φυτικού ιστού (Ποντίκης, 2000). Αποτελεί ένα αμυντικό μηχανισμό του φυτού ενάντια σε προσβολές από μικροοργανισμούς και έντομα. Από χημικής άποψης, είναι ενώσεις που αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο που περιέχει μια ή και περισσότερες υδροξυλομάδες. Λόγω του ότι είναι υδατοδιαλύτες ενώσεις, μεταφέρονται κατά την παραγωγή ελαιολάδου στην υδάτινη φάση (Vermerris, et al., 2006).



Εικόνα 10 Κυριότερες φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στα απόβλητα ελαιολιτριβείων (Knurr, et al., 1996)

3.1.7 Τρόποι επεξεργασίας και διάθεσης των αποβλήτων ελαιοτριβείων

Η μέθοδος διαχείρισης των αποβλήτων αποτέλεσε για αρκετά χρόνια ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα καθώς παράγονται και σε μεγάλες ποσότητες. Στην πορεία των ετών αναπτύχθηκαν αρκετές μέθοδοι επεξεργασίας. Άλλωστε δε είναι μόνο ένα περιβαλλοντικό πρόβλημα αλλά και μια πηγή για την παραλαβή χρήσιμων προϊόντων.

Η δυσκολία στη διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείων οφείλεται τόσο στην ιδιαιτερότητα του υλικού όσο και σε οικονομικούς παράγοντες. Πρώτα, είναι το υψηλό οργανικό τους φορτίο και η τοξικότητα που παρουσιάζουν για κάποια είδη φυτών και ζώων. Ύστερα, τα μικρά και μεμονωμένα ελαιοτριβεία δεν μπορούν να αντέξουν το οικονομικό βάρος της επένδυσης για τη διαχείριση των αποβλήτων τους. Παράλληλα, πρέπει να ληφθεί υπόψη ή εποχικότητα της λειτουργίας των ελαιοτριβείων και η διασπορά τους μέσα στις καλλιεργούμενες με ελαιόδεντρα εκτάσεις.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την επεξεργασία των αποβλήτων και την αποτοξικοποίηση τους. Εφαρμόζονται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό και φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματικές. Ακόμη, τα απόβλητα ελαιοτριβείου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή άλλων ωφέλιμων τελικών προϊόντων όπως λίπασμα (με ή χωρίς κομποστοποίηση), την παραγωγή αντιοξειδωτικών ή και για την παραγωγή καυσίμου και βιοαερίου μετά από επεξεργασία.

Οι μεθοδολογίες επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιοτριβείου χωρίζονται σε μηχανικές, βιολογικές και φυσικοχημικές.

A) Μηχανική επεξεργασία

1. Διήθηση

Η πιο παλιά μέθοδος είναι η διήθηση για την απομάκρυνση των στερεών που περιέχονται στα απόβλητα ελαιοτριβείου και μπορεί να είναι άργιλος, ιλύς και οργανική ουσία. Η διήθηση μπορεί να εφαρμοστεί και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους. Η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιείται με την βοήθεια πορώδους υλικού (φίλτρο) που συγκρατεί τα στερεά ενώ η υγρή φάση κινείται ελεύθερα. Το φίλτρο αποτελείται από στρώματα άμμου, αμμοχάλικου ή ενεργού άνθρακα (Israilides, et al., 1997). Εφαρμόζεται με τη δύναμη της βαρύτητας (φυσική ροή), με πίεση στην πλευρά εισόδου (εξαναγκασμένη ροή) και εφαρμογή κενού στην έξοδο των αποβλήτων.

2. Επίπλευση

Η μέθοδος της επίπλευσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των αιωρούμενων σωματιδίων από τα υγρά απόβλητα. Ο διαχωρισμός διευκολύνεται όταν στο υγρό διοχετεύεται υπό πίεση ένα αέριο, αυτό μπορεί να είναι αέρας ή άζωτο και δημιουργούνται φυσαλίδες. Έτσι προσροφάται στην επιφάνεια των στερεών και μειώνεται το ειδικό τους βάρος ώστε να γίνεται πιο εύκολος ο διαχωρισμός. Οι διάφοροι τύποι επίπλευσης διακρίνονται κυρίων από τον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες (wikipedia.org).

3. Καθίζηση

Η μέθοδος της καθίζησης στοχεύει στην απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Η αρχή της μεθόδου είναι τα στερεά έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό και κατά συνέπεια καθιζάνουν. Μπορεί να γίνει είτε με φυσική ροή είτε με εξαναγκασμένη. Τα υγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης μετά την αφαίρεση των μεγάλου μεγέθους στερεών. Στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης η ροή μειώνεται και τα σωματίδια βυθίζονται στον πυθμένα.

B) Φυσικοχημική επεξεργασία

Οι φυσικοχημικές μέθοδοι (συσσωμάτωση, φιλτράρισμα κτλ) επεξεργασίας συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη περαιτέρω βιολογική επεξεργασία.

1. Διαχωρισμός με μεμβράνες

Με τον διαχωρισμό με μεμβράνες επιτυγχάνεται η απομάκρυνση διαλυμένων ουσιών, κολλοειδών και αιωρούμενων σωματιδίων. Η μεμβράνη είναι ημιπερατή ή πορώδης και επιτρέπει στα σωματίδια των υγρών αποβλήτων, ανάλογα με το μέγεθος τους, να τη διαπερνούν ή όχι (Rozzi, et al., 1996). Παρόλα αυτά ο διαχωρισμός με μεμβράνες δεν είναι κατάλληλος για απόβλητα ελαιοτριβείου με υψηλό ρυπαντικό φορτίο λόγω του ότι φράζουν τους πόρους των μεμβρανών και δημιουργούνται συσσωματώματα. Κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα γλοιώδες στρώμα στην επιφάνεια των μεμβρανών (Wui, et al., 2008). Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο διαχωρισμός με μεμβράνες είναι αποτελεσματικός στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων όταν έχει ήδη αφαιρεθεί ένα μέρος του ρυπαντικού τους φορτίου. Τέλος υπάρχουν αρκετές έρευνες που υποστηρίζουν ότι από το διαχωρισμό με μεμβράνες μπορεί να γίνει παραλαβή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Paraskeva, et al., 2007; Cassano, et al., 2013). Μειονέκτημα της μεθόδου είναι το αρκετά υψηλό κόστος της.

2. Αποτέφρωση

Η αποτέφρωση είναι μια λύση με χαμηλό κόστος για την διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείου και στηρίζεται στο υψηλό οργανικό τους φορτίο. Στα απόβλητα διοχετεύεται αέρας σε υψηλή θερμοκρασία, κι έτσι εξατμίζεται πλήρως το νερό από τα απόβλητα και καταστρέφονται οι οργανικές τους ενώσεις (www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/incinerator.html).

3. Εξάτμιση και απόσταξη

Με τη χρήση αυτής της επεξεργασίας, συμπυκνώνεται το οργανικό και ανόργανο περιεχόμενο των αποβλήτων ελαιοτριβείων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω εφαρμογές όπως σε σιτηρέσια ζώων (αν και εφαρμόζεται σε περιορισμένη έκταση λόγω της πικρής γεύσης), για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και ως λίπασμα. Η ενέργεια για την εξάτμιση προέρχεται ή από θερμότητα καύσης είτε από φυσική πηγή (ήλιος) (Rozzi, et al., 1996).

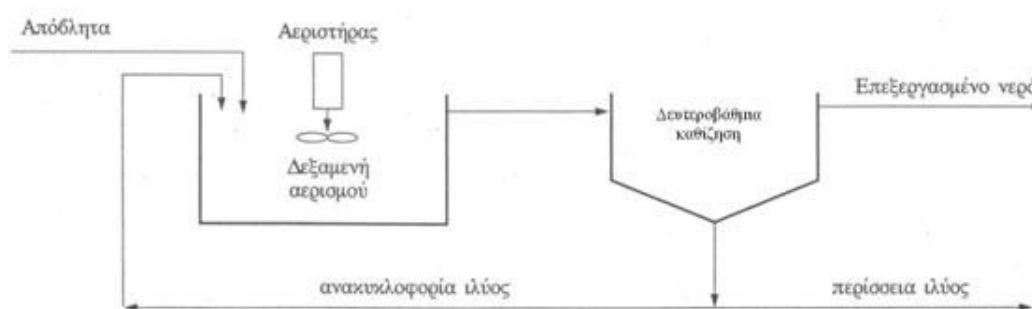
4. Λίμνες εξάτμισης

Οι βιολογικές μέθοδοι βασίζονται στην αποικοδόμηση των πολύπλοκων οργανικών ενώσεων από τους μικροοργανισμούς σε απλούστερες και ενεργειακά σταθερότερες ενώσεις. Οι λίμνες εξάτμισης είναι μια μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας για υγρά απόβλητα με χαμηλό ρυπαντικό φορτίο. Είναι τεχνητές κοιλότητες στο έδαφος στις οποίες καταλήγουν τα απόβλητα ελαιοτριβείων χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Στις λίμνες εξάτμισης συμβαίνουν διάφορες διαδικασίες όπως η εξάτμιση του νερού, η εξάτμιση των πτητικών συστατικών η αποικοδόμηση και υδρόλυση του οργανικού υλικού μέσω μικροοργανισμών. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται από κυρίως από τις κλιματολογικές συνθήκες. Σήμερα οι λίμνες εξάτμισης χρησιμοποιούνται για αποθήκευση του αποβλήτου, έτσι γίνεται και εξάτμιση του νερού των αποβλήτων αλλά και καθίζηση των στερεών που περιέχονται. Μετά την εξάτμιση τα στερεά που μένουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα (RozziandMalpei 1996). Το πλεονέκτημα τις μεθόδου είναι ότι είναι μια απλή εφαρμογή χαμηλού κόστους, εάν όμως δε γίνει σωστή μόνωση στα τοιχώματα της λίμνης μπορεί να υπάρξει μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η διάρκεια της επεξεργασίας που είναι περισσότερο από 60 ημέρες, και οι μεγάλες επιφάνειες που πρέπει να καλύψουν. Ακόμη, από τις λίμνες εξάτμισης αναδύεται μια δυσάρεστη οσμή που γίνεται αντιληπτή ακόμα και σε μεγάλη απόσταση (Carbera, et al., 1996; Rozzi, et al., 1996).

Γ) Βιολογική επεξεργασία

1. Μέθοδος ενεργού ιλύος

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι η ενεργός ιλύς. Έχει χαμηλή λειτουργική δαπάνη και υψηλή αποδοτικότητα σε σύγκριση με τη χημική επεξεργασία (Drysdale, et al., 1999). Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο λόγω του ότι μπορεί να επεξεργαστεί απόβλητα με BOD < 3000 (Brenes, et al., 1993). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι βακτήρια, πρωτόζωα, και φύκη και αποτελούν την βιομάζα για την αποικοδόμηση (Lacko, et al., 1999). Από τη διαδικασία αποικοδόμησης παράγονται υψηλές ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα και νιτρικά ιόντα και ιλύς. Η ιλύς ανακυκλώνεται στη δεξαμενή αερισμού ενώ το υπόλοιπο μέρος πρέπει να επεξεργαστεί ξεχωριστά για περαιτέρω χρήση. Η μέθοδος χρησιμοποιεί συνδυασμό δεξαμενών τόσο σε αερόβιες αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα απόβλητα σαν θρεπτικό υπόστρωμα και το οξειδώνουν προς CO₂ και σύγχρονος δημιουργείται νέα βιομάζα. Έτσι επιτυγχάνεται αποτοξικοποίηση των ρύπων (Brenes, et al., 1993).



Εικόνα 11 Μέθοδος ενεργού ιλύος

2. Αναερόβια επεξεργασία

Η αναερόβια επεξεργασία είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αποτοξικοποίηση αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο. Εφαρμόζεται όλο και περισσότερο επειδή παράγεται κατά τη διαδικασία σημαντική ποσότητα μεθανίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ως πηγή ενέργειας (Bitton 2005). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι αναερόβιοι, δηλαδή αναπτύσσονται μόνο απουσία οξυγόνου χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα υγρά

απόβλητα ελαιοτριβείου. Συγκριτικά με την αερόβια μέθοδο επεξεργασίας, η αναερόβια γίνεται σε μειωμένο ρυθμό λόγω της χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας των αναερόβιων μικροοργανισμών. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι μικρότερες ποσότητες ίλυος που παράγονται (Rozzi, et al., 1996).

3. Κομποστοποίηση

Μία ακόμη μέθοδος αποτοξικοποίησης των αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι η κομποστοποίηση. Είναι μια διαδικασία αποικοδόμησης που γίνεται με την βοήθεια μικροοργανισμών και έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή ενός τελικού προϊόντος που ονομάζεται χούμος. Το τελικό προϊόν χρησιμοποιείται ως εδαφοβελτιωτικό. Κατά τη διαδικασία της αποικοδόμησης το οργανικό περιεχόμενο των αποβλήτων ανοργανοποιείται προς CO₂, ακόμη παράγονται νερό και ανόργανα άλατα. Σημαντική είναι επίσης και η μείωση του όγκου, που είναι της τάξεως του 40-50%. Τα απόβλητα τοποθετούνται σε σειράδια στα οποία και γίνονται εξώθερμες αντιδράσεις που ανεβάζουν τη θερμοκρασία τους στους 60 - 70°C. Παράλληλα για να γίνει σωστά η κομποστοποίηση είναι απαραίτητος ο σωστός αερισμός των σειραδίων. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων η κομποστοποίηση τους γίνεται σε συνδυασμό με άλλα στερεά γεωργικά παραπροϊόντα όπως πριονίδι, πυρηνόξυλο ή και υπολείμματα από εκκοκκιστήρια βάμβακος. Η μέθοδος αυτή ορίζεται σαν συγκομποστοποίηση (Paredes, et al., 2002; Zenjari, et al., 2006). Μελέτες αναφέρουν ότι δε υπάρχουν σημαντικές διαφορές του κόμποστ που προέρχεται από απόβλητα ελαιοτριβείων και των κόμποστ από άλλα αγροτικά παραπροϊόντα (Paredes, et al., 2001; Cegarra, et al., 1996; Zervakis, et al., 2011)

4. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείου με χρήση μυκήτων

Αρκετές έρευνες έχουν γίνει με στόχο τη μείωση του φαινολικού φορτίου και την αποτοξικοποίηση των αποβλήτων ελαιοτριβείων με την ανάπτυξη μυκήτων σε διάφορες συγκεντρώσεις αποβλήτου. Διάφορα είδη μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό με αρκετά καλά αποτελέσματα στην ανάπτυξη τους σε απόβλητα ελαιοτριβείου μειώνοντας το φαινολικό τους φορτίο και αποτοξικοποιώντας τα απόβλητα. Η κύρια κατηγορία μικροοργανισμών που αποδομούν την λιγνίνη είναι οι μύκητες και ειδικότερα οι βασιδιομύκητες (Hammel, 1997). Συνεπώς οι μύκητες άρχισαν να χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των αποβλήτων ελαιοτριβείων για την αποτοξικοποίησή τους. Στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί ανήκουν στα είδη *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi and Radhouane, 1992), *Lentinula edodes* (D' Annibale, et al., 1998), *Pleurotus ostreatus* (Kissi, et al., 2001; Fountoulakis, et al., 2002; Martirani, et al., 1996) *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma australe* και *G. carnosum* (Ntougias, et al., 2012) μειώνοντας το φαινολικό φορτίο και

αποχρωματίζοντας τα απόβλητα ελαιοτριβείων. Παράλληλα είδη του γένους *Pleurotus* έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για την τοξικότητα του αποβλήτου (Ntougias, et al., 2013). Ακόμη έχουν γίνει μελέτες για την παραγωγή εδώδιμων μανιταριών από υποστρώματα που περιέχουν απόβλητα ελαιοτριβείου (Zervakis, et al., 1996; Ruiz - Rodriguez , et al., 2010; Zervakis, et al., 2013).

3.2 Μύκητες

3.2.1 Εισαγωγή

Το βασίλειο των μυκήτων ("Fungus", πλ. "fungi", προέρχεται από την ελληνική λέξη σπόγγος, σφόγγος) είναι η δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα οργανισμών στην βιόσφαιρα μετά τα έντομα. Αρχικά κατατάσσονταν στο βασίλειο των φυτών. Αργότερα αυτό άλλαξε από τον Whittaker (Whittaker 1969) ταξινομήθηκαν σε ξεχωριστό βασίλειο. Υπολογίζεται ότι ο πληθυσμός των ειδών τους ανέρχεται σε 1,5 εκατομμύριο, παρόλα αυτά έχουν καταγραφεί μόνο 95.000 περίπου. Αν και ο ρόλος τους στην φύση είναι μεγάλος, μόνο το 5% έχει καταγραφεί σε σχέση με το συνολικό τους αριθμό και η πλειοψηφία τους παραμένει άγνωστη (Ζερβάκης, 2011).

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, ετερότροφοι (μη φωτοσυνθέτοντες) και η πλειοψηφία τους δε διαθέτουν μηχανισμούς αυτόνομης κίνησης (με εξαίρεση κάποιες αμοιβαδοειδής μορφές) (Μπαλής, 1993). Είναι μικροσκοπικοί, σποριογόνοι και νηματοειδείς μικροοργανισμοί. Αναπαράγονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες τα σπόρια που παράγονται από εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα. Τα κύτταρα τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό τη χιτίνη (Δήμου, 1992; Agrios, 2005).

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τις καταγραφές που έχουν γίνει για την Ελλάδα. Σήμερα έχουν καταγραφεί περί τα 4.000 διαφορετικά είδη μυκήτων, από τα οποία 2.600 είναι μακρομύκητες (Ζερβάκης και Πολέμης, αδημοσίευτα στοιχεία). Ο σχετικά μικρός αριθμός των καταγραφών οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό των μυκητολογικών ομάδων που δραστηριοποιούνται στη μελέτη της βιοποικιλότητας των μυκήτων της Ελλάδας. Σε άλλες χώρες που δεν έχουν το ανάγλυφο, τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες και την ιδιαίτερη γεωγραφική θέση της Ελλάδας αλλά έχει γίνει συστηματική καταγραφή των μυκήτων, εμφανίζεται μεγάλος αριθμός ειδών μυκήτων (Ζερβάκης, 2011).

3.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά των μυκήτων

Το σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός. Αποτελείται από λεπτές σωληνόμορφες - νηματοειδής κατασκευές που λέγονται υφές με ποικίλο πάχος, που κυμαίνεται αναλόγως του είδους του μύκητα από 2-10μm. Το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο. Οι υφές

ομοιάζουν με σωλήνες που περιέχουν πρωτόπλασμα, οργανίδια και τυπικούς πυρήνες (Steven 2008). Το πρωτόπλασμα των μυκήτων έχει γενικώς ίδια κατασκευή με το πρωτόπλασμα άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο πυρήνας περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη που διαθέτει δυο στρώσεις και χαρακτηριστικούς πόρους (Madigan, et al., 2005). Η ανάπτυξη των μυκήτων που σχηματίζουν υφές είναι ακτινοειδής. Η ακτινοειδής ανάπτυξη απορρέει από τη μετακίνηση του πρωτοπλασματικού ρεύματος και των οργανιδίων προς την αναπτυσσόμενη κορυφή. Η ακτινοειδής διάταξη των μυκήτων είναι εμφανής σε καλλιέργειες επάνω σε στερεά ή υγρά θρεπτικά υποστρώματα χωρίς ανακίνηση (Χριστιάς, 1999). Το πολυκύτταρο μυκήλιο διαφοροποιείται από το κοινοκύτταρο λόγω της παρουσίας εγκάρσιων χωρισμάτων (διαφραγμάτων) που ονομάζονται *septa*.

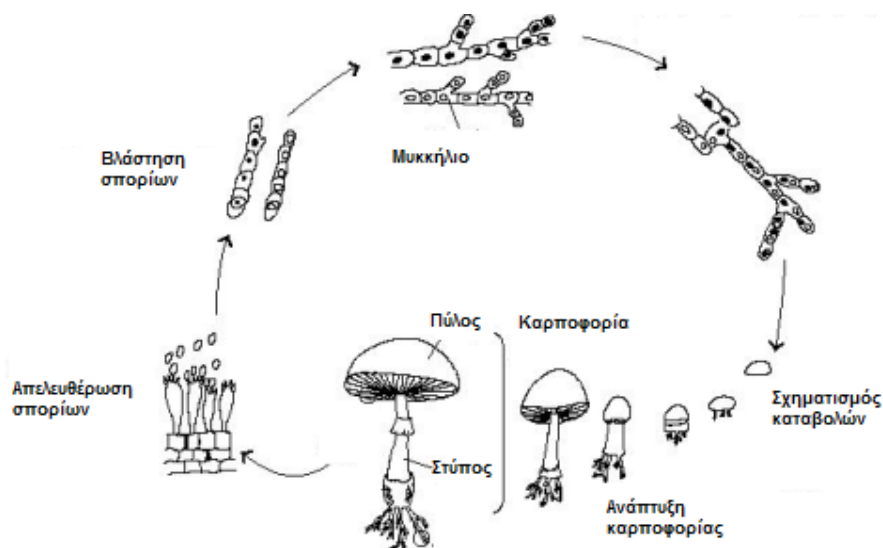
Η ανάπτυξη των μυκήτων αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης τους εξαρτάται από φυσικούς και χημικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το φως, η σχετική υγρασία, το pH, τα θρεπτικά συστατικά που έχει στη διάθεση του, η συγκέντρωση οξυγόνου και η παρουσία κάποιου τοξικού παράγοντα. Η θερμοκρασία βέλτιστης ανάπτυξης της πλειοψηφίας των μυκήτων κυμαίνεται από 25-30° C. Οι περισσότεροι μύκητες προτιμούν pH4-7, δηλαδή ελαφρά όξινο. Όσον αφορά την παρουσία οξυγόνου, ο μύκητες είναι αερόβιοι οργανισμοί, αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις (προαιρετικά αερόβιοι). Τέλος το φως είναι παράγοντας που επηρεάζει κυρίως το σχηματισμό αγενών και εγγενών αναπαραγωγικών οργάνων και την απελευθέρωση των σπορίων και όχι τη βλαστική ανάπτυξη (Χριστιάς, 1999).

Οι μύκητες όντας ετερότροφοι οργανισμοί είναι υποχρεωμένοι να προσλαμβάνουν από το περιβάλλον τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση τους. Οι τροφικές απαιτήσεις και προσαρμογές των μυκήτων οδήγησε στην δημιουργία 3 τύπων ανάπτυξης (Ζερβάκης, 2011).

Τα υποχρεωτικά παράσιτα, δηλαδή εκείνα που μπορούν να αναπτυχθούν μόνο στα κύτταρα ενός ζωντανού ξενιστή, και στα δυνητικά – προαιρετικά παράσιτα, που αναπτύσσονται σαπροτροφικά αλλά κάτω από ορισμένες συνθήκες ζουν και παρασιτικά. Δεύτερον, υπάρχουν μύκητες που χαρακτηρίζονται ως σαπρότροφα, αναπτύσσονται μόνο σε νεκρή οργανική ύλη. Διακρίνονται σε υποχρεωτικά σαπρότροφα (αναπτύσσονται μόνο σε νεκρά οργανικά υλικά) και σε δυνητικά σαπρότροφα (είναι παρασιτικοί αλλά υπό ορισμένες συνθήκες ζουν σαπροτροφικά. Στα υποχρεωτικά σαπρότροφα ανήκει και η πλειοψηφία των μυκήτων που μαζί με τα βακτήρια βοηθούν στην ανακύκλωση της ύλης. Τέλος, μπορεί να είναι και συμβιωτικά π.χ. μυκόρριζες, λειχήνες. Με αυτό τον τρόπο και οι δύο οργανισμοί που συμμετέχουν στην συμβίωση έχουν όφελος, ο μύκητας προσλαμβάνει οργανικές ενώσεις και θρεπτικά συστατικά που δε μπορεί να συνθέσει από μόνος του αλλά και ο

οργανισμός-ξενιστής διευκολύνεται στην πρόσληψη συστατικών (κυρίως ανόργανα στοιχεία) μέσω του μυκητιακού συμβιωτή.

3.2.3 Βασιδιομύκητες



Εικόνα 12 Βιολογικός κύκλος βασιδιομυκήτων (openi.nlm.nih.gov)

Οι μύκητες αναπαράγονται με αγενή ή εγγενή σπόρια που ανάλογα με το είδος τους είναι μονοκύτταρα, δικύτταρα ή πολυκύτταρα. Οι περισσότεροι μύκητες αναπαράγονται και με τους δύο τρόπους. Η αγενής αναπαραγωγή δεν πραγματοποιείται με ένωση πυρήνων αλλά με αγενή σπόρια προερχόμενα από το μυκήλιο. Τα όργανα εκείνα των μυκήτων, πάνω ή μέσα στα οποία σχηματίζονται τα σπόρια, ονομάζονται καρποφορίες. Τα σπόρια των μυκήτων διακρίνονται σε 2 τύπους, τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής και τα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής. Όσον αφορά τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής, πυρήνες αντίθετου φύλου ενώνονται σχηματίζοντας ζυγωτό με συνέπεια τη δημιουργία νέων μυκηλίων με νέο γονότυπο. Τέτοια σπόρια μπορεί να είναι αναλόγως της μορφής τους ζυγοσπόρια, ασκοσπόρια και βασιδιοσπόρια που παράγονται από τις αντίστοιχες καρποφορίες. Το είδος της καρποφορίας και των σπορίων που δημιουργεί κάθε είδος μύκητα αποτελεί χαρακτηριστικό – διαγνωστικό γνώρισμα. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικές είναι οι καρποφορίες των ασκομυκήτων και των βασιδιομυκήτων, στις κατηγορίες αυτές ανήκουν και οι μύκητες που σχηματίζουν καρποφορίες με τη μορφή μανιταριών (Alexopoulos, et al., 1996).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν στελέχη μυκήτων των ειδών *Hericium erinaceus* και *Pleurotus ostreatus*.

3.2.3.1 *Είδος Hericium erinaceus* (Bull) Pers.

Το γένος *Hericium* ανήκει στην οικογένεια *Hericiaceae* και περιλαμβάνει είδη που παράγουν μανιτάρια. Καταγράφηκε ως διακριτό είδος και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Persoon (1794). Η ταξινομική του θέση είναι η ακόλουθη:

Φυλογενετική ταξινόμηση

Βασίλειο: Fungi

Φύλο: Basidiomycota

Υποφύλο: Agaricomycotina

Κλάση: Agaricomycetes

Τάξη: Russulales

Οικογένεια: *Hericiaceae*

Γένος: *Hericium*



Εικόνα13 *Hericium erinaceus* (mycology.wikia.com)

Είδος: *H.erinaceus*

Οικολογία: Το είδος έχει διάφορες κοινές ονομασίες όπως: αρνί, αρνάκι, αρνίτσα, χτενάκι. Εμφανίζεται το φθινόπωρο σε ζωντανούς ή φρεσκοκομμένους κορμούς πλατύφυλλων (δρυός, οξιά, ακακίας Κωνσταντινουπόλεως, καρυδιάς, σφενταμιού). Αναφέρεται ότι αναπτύσσονται πάνω σε ιστάμενους κορμούς και σε ύψος 10 μ από το έδαφος.

Μορφολογία: Έχει βασιδίσκιο με διάμετρο 6-18 cm και ύψος 6-18 cm. Το σχήμα του είναι ακανόνιστο σφαιρικό. Η όψη του είναι όμοια με σώμα αρνιού ή κεφαλή λιονταριού. Ακουμπά απευθείας στο υπόστρωμα ή εμφανίζει στενόμακρο στίβο όταν φύεται σε κουφάλες δέντρων. Η επιφάνεια του είναι φέρει υμενοφόρο με πυκνές, αρχικά μαλακές, και λευκωπές κρεμ και αργότερα φιλντισένιες, ξανθοκίτρινες ή ωχρωπές, σκληρές και εύθραυστες στην ωριμότητα, μακριές (2-6 cm μήκος) αγκαθόμορφες προεξοχές. Η σάρκα του είναι λευκή και μαλακή αρχικά, συμπαγής και συνεκτική με αρωματική μυρωδιά και ήπια γεύση στα φρέσκα βασιδίσκια. Όταν ωριμάσει είναι σκληρή και υπόξινη. Τα σπόρια του στο μικροσκόπιο έχουν διαστάσεις 4,5-6,5 x 4-5,5 μm και είναι στικτά. Οι υφές του έχουν σύστημα μονομυκτικό και είναι αμυλώδεις (Harrison, 1973).

3.2.3.2 *Είδος Pleurotus ostreatus*

Τα είδη του γένους *Pleurotus* ανήκουν και αυτοί στους Βασιδιομύκητες. Το είδος *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Kummer (1871). Η ταξινομική τους θέση είναι η εξής:

Βασίλειο: Fungi

Φύλο: Basidiomycota

Υποφύλο: Agaricomycotina

Κλάση: Agaricomycetes

Τάξη: Agaricales

Οικογένεια: Pleurotaceae

Γένος: *Pleurotus*

Είδος: *Pleurotus ostreatus*



Εικόνα14 *Pleurotus ostreatus* (kinoko-ya.sakura.ne.jp)

Το είδος έχει διάφορες λαϊκές ονομασίες: μαύρος καβακίτης, λευκίτης, συκίτης, ελατομανίτης, ελατάς, καρβέλι, πίτα, συκωταριά, πλευρίτης, βλαντρα, ξερακομανίτης κ.α.

Οικολογία: Εμφανίζεται το φθινόπωρο και το χειμώνα σε ομάδες από μονήρη ή συνήθως αλληλοεπικαλυπτόμενα βασιδιώματα, σε νεκρό ξύλο πλατύφυλλων και ελάτου.

Μορφολογία: Το είδος σχηματίζει πύλο με διάμετρο 4-12 cm. Είναι κυρτό, με μορφή γλώσσας, οστράκου ή ριπιδίου, λείο, θαμπό και μεταξένιο. Έχει χρώμα αργιλόχρωμο, γκριζωπό, γκριζοκαφετί, κυανό ή καφέ-βιολετί. Ακόμη φέρει περίμετρο κυματιστή και γραμμωτή κατά την ωριμότητα. Η σάρκα του είναι λευκή ή γκριζωπή, ινώδης, σκληρή, με ευχάριστη μυρωδιά και ήπια γεύση. Τα ελάσματα του είναι λευκωπά ή κρεμ, πυκνά και κατερχόμενα. Διαθέτει στίπο με διαστάσεις 0,5-3x1-1,15 cm, στοιχειώδες ή ανύπαρκτο, έκκεντρο ή πλευρικό, μερικές φορές κυρτό, συμπαγές, ινώδες και σκληρό, λευκωπό ή κρεμ (Zervakis & Ballis, 1996).

3.2.3.3 *Κατηγορίες ανώτερων βασιδιομυκήτων*

Οι μύκητες που αποδομούν νεκρή οργανική ύλη αναπτυσσόμενοι σαπροτροφικά διακρίνονται σε μύκητες φαιάς σήψης, μαλακής σήψης και λευκής σήψης.

- Φαιάς σήψης

Οι μύκητες της κατηγορίας αυτής ανήκουν στους βασιδιομύκητες αποσυνθέτουν κυρίως τις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες του ξύλου και σε περιορισμένο βαθμό τη λιγνίνη. Τα ένζυμα που παράγουν είναι μεγάλα ώστε να μπορέσουν να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα του ξύλου, κάτι που είναι απαραίτητο για να συνυπάρξουν μαζί με άλλα ενζυμικά συστήματα για αποτελεσματική αποδόμηση.

- Μαλακής σήψης

Η αποδόμηση από μύκητες μαλακής σήψης (κυρίως Ασκομύκητες) γίνεται σε πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τις άλλες δυο κατηγορίες. Κατά συνέπεια μειονεκτούν στο αποτέλεσμα της αποδόμησης από ποσοτικής άποψης. Έχουν την ικανότητα να αποδομούν λιγνίνη μερικώς αλλά κυρίως διασπούν πολυσακχαρίτες.

- Λευκής σήψης

Η πιο αποτελεσματική αποδόμηση στη φύση γίνεται από τους μύκητες που έχουν την δυνατότητα να αποδομήσουν τις κυτταρίνες αλλά και τη λιγνίνη. Οι μύκητες αυτοί κατατάσσονται στους μύκητες λευκής σήψης και έχουν καταγραφεί και ταξινομηθεί και ανήκουν σε διάφορα γένη. Αρχικά διασπούν τη λιγνίνη ώστε να έχουν πρόσβαση στις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες. Ακόμη μπορούν να αποδομήσουν και τις φαινολικές ενώσεις λόγω της ομοιότητας του παρουσιάζουν με τη λιγνίνη (Eriksson, et al., 1990).

3.2.4 Λιγνινολυτικό σύστημα μυκήτων λευκής σήψης

3.2.4.1 Η δομή της λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι ένα πολυμερές που σχηματίζεται από την ένωση βασικών μονομερών μονάδων. Υπάρχουν τρεις τέτοιες πρόδρομες μονάδες με κοινή τη δομή του τύπου φαινυλο-προπανίου, που διαφέρουν στον αριθμό των μεθοξυλομάδων. Τα μονομερή ενώνονται μεταξύ τους με αιθερικούς και ανθρακικούς δεσμούς. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα αρκετά πολύπλοκο μόριο, η λιγνίνη (Vanholme, et al., 2010).

Η ιδιαίτερη δομή του μορίου της λιγνίνης την καθιστά δύσκολή στην αποδόμηση. Οι μύκητες χρησιμοποιούν εξωκυτταρικούς μηχανισμούς για να διασπάσουν αυτό το μεγάλο και έντονα διακλαδιζόμενο πολυμερές. Στους μηχανισμούς περιλαμβάνονται οξειδωτικές αντιδράσεις και σε λιγότερο βαθμό υδρολυτικές ώστε να αποδομηθούν οι σταθεροί αιθερικοί και ανθρακικοί δεσμοί του μορίου. Ένα ακόμα γεγονός που συνεισφέρει στην

δυσκολία αποδόμησης της λιγνίνης είναι ότι η λιγνίνη αποτελείται από ένα σύνολο στερεοϊσομερών και τα ένζυμα που παράγονται από τους μύκητες για την λιγνινόλυση δεν θα πρέπει να εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση όπως οι περισσότεροι βιοκαταλύτες. Τέλος, η ιδιότητα της λιγνίνης να είναι αδιάλυτη στο νερό περιορίζει την αποικοδόμηση της (Hammel, 1997).

3.2.4.2 Συνθήκες δράσης λιγνινολυτικών μυκήτων

Τόσο η απουσία εξειδίκευσης, που χαρακτηρίζει τα ένζυμα που παράγονται από τις συγκεκριμένες κατηγορίες μυκήτων, όσο και οι δομικές σχέσεις πολλών αρωματικών ρύπων με τα φυσικά υποστρώματα αυτών των ενζύμων, υπέδειξαν τη χρήση των λιγνινολυτικών αυτών μικροοργανισμών στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Οι λιγνινολυτικοί μύκητες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη λιγνίνη ως μοναδική πηγή ενέργειας και άνθρακα, αντίθετα εξαρτώνται από τα πιο αφομοιώσιμα πολυσακχαρίδια που υπάρχουν στα υποστρώματα που περιέχουν και λιγνίνη.

Στους περισσότερους από τους μύκητες που έχουν μελετηθεί, η λιγνινόλυση συμβαίνει κατά το δευτερογενή μεταβολισμό, κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό για την παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων είναι συνήθως το άζωτο. Λόγω της δυσκολίας αποδόμησης της λιγνίνης, οι μύκητες επιστρατεύουν ασυνήθιστους μηχανισμούς για να την αποδομήσουν. Αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει τους μηχανισμούς αυτούς και όλοι παρουσιάζουν ένα βασικό χαρακτηριστικό: έχουν ως βάση τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, προερχόμενων από τη λιγνίνη, όπου λόγω της αστάθειας τους λαμβάνουν μέρος σε μια σειρά αυτό - επαγόμενων αντιδράσεων διάσπασης (Crestini, et al., 2003).

3.2.4.3 Λιγνινολυτικά ένζυμα και μηχανισμοί λιγνινόλυσης

Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν τη δυνατότητα μέσω ενός ενζυμικού συστήματος που διαθέτουν να διασπούν τη λιγνίνη και έτσι μπορούν να αναπτύσσονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα κύρια ένζυμα που παράγουν είναι η λακκάση, η υπεροξειδάση της λιγνίνης και η Mn-υπεροξειδάση (Jaouani, et al., 2005). Ακόμη, τα ένζυμα αυτά δεν παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση και έτσι οι μύκητες του είδους μπορούν να αναπτυχθούν σε όλα τα υλικά που είναι δύσκολο να αποικοδομηθούν όπως τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Bourbonnais, et al., 1995).

Λακκάση

Η λακκάση δομικά αποτελείται από τέσσερα ενεργά κέντρα τα οποία περιέχουν ένα ιόν χαλκού (Cu^{+2}). Το κάθε ένα από αυτά διατηρεί διαφορετικές θέσεις και διακρίνονται σε τρεις τύπους T1, T2 και T3. Ρόλος του T1 είναι η πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, ο T2 ενεργοποιεί το μοριακό άζωτο και το T3 είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου. Ο T3 περιέχει δύο ιόντα χαλκού (Palmer, et al., 2001).

Οι λακκάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στις πολυχαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες. Παράγονται κυρίως από βασιδιομύκητες και κάποιους ασκομύκητες αλλά και από βακτήρια (Robles, et al., 2002). Με τη λακκάση οξειδώνονται πολλά οργανικά και αρωματικά υποστρώματα, όπως φαινολικά συστατικά και διαμίνες (Thurston 1994, Minussi, Pastore and Duran, 2002). Η λακκάση χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα διάφορες ο- και p-διφαινόλες, πολυφαινόλες, αμινοφαινόλες, αρυλοδιαμίνες, πολυαμίνες και λιγνίνη. Ειδικότερα, η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων γίνεται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών που μπορεί μετά να πολυμεριστούν ή να οδηγήσουν σε αποπολυμερισμό (Thurston, 1994; Minussi, et al., 2002). Η αντίδραση της οξείδωσης γίνεται στα κέντρα του χαλκού. Η λακκάση έχει αντοχή σε θερμοκρασίες μέχρι και τους 60 °C (Solomon, et al., 1996).

Υπεροξειδάση του Μαγγανίου και υπεροξειδάση της λιγνίνης (λιγνινάση)

Οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν, εκτός από τις λακκάσες και άλλα είδη ενζύμων που ανήκουν στην ομάδα των υπεροξειδασών. Όταν καταλύουν αντιδράσεις προσδίδουν οξειδωτικά μέσα μικρού μοριακού βάρους. Το Mn δίνει στο ένζυμο ένα ηλεκτρόνιο για έλθει στην αρχική κατάσταση και ταυτόχρονα μετατρέπεται σε Mn^{+3} . Η αποδέσμευση του ηλεκτρονίου από το ιόν Mn γίνεται παρουσία χηλικών ενώσεων που σταθεροποιούν το ιόν (Glenn, et al., 1986).

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Για να επανέλθει στην αρχική κατάσταση προσλαμβάνει από το υπόστρωμα δύο ηλεκτρόνια από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Οξειδώνουν πολυφαινόλες αλλά και μη φαινολικές δομές της λιγνίνης και αρωματικών αιθέρων που μοιάζουν με τη βασική ομάδα της. Ουσιαστικά η λιγνινάση δρα στο διάσπαση του δεσμού $\text{C}_a\text{-C}_b$ που είναι βασική αντίδραση της λιγνινόλυσης. Από τη δράση της λιγνινάσης στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα γίνεται αποπολυμερισμός με ενδιάμεσο στάδιο το σχηματισμό ελευθέρων ριζών που αντιδρούν σε μια σειρά μετενζυμικών αντιδράσεων (Tien, et al., 1988).

3.2.4.4 Καλλιέργεια βασιδιομυκήτων σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα

Λόγω της ικανότητας των μυκήτων λευκής σήψης να αποδομούν την λιγνίνη, υπάρχουν αρκετές ερευνητικές εργασίες που μελετούν την καλλιέργεια τους σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα που προέρχονται από τα γεωργικά υπολείμματα. Στην Ελλάδα, στο τέλος της καλλιέργειας των περισσότερων φυτικών ειδών τα υπολείμματα παραμένουν ανεκμετάλλευτα ενώ αποτελούν ένα μεγάλο μέρος της βιομάζας που παρήχθηκε (απορρίμματα από τον εκκοκκισμό βάμβακος και αραβόσιτου, πυρηνελουργεία, βιομηχανικές επεξεργασίες ξύλου, κλαδέματα ελιάς, άχυρο σίτου κ.α.) (Philippoussis, et al., 2001; Zervakis, et al., 2013). Η πλειοψηφία αυτών στο τέλος της καλλιέργειας καίγονται ή ενσωματώνονται στο έδαφος.

Με βάση τις ιδιότητες των βασιδιομυκήτων, η εμπορική καλλιέργεια των βασιδιομυκήτων κατευθύνεται προς την αξιοποίηση των γεωργικών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, τα είδη *Pleurotus* καλλιεργούνται κυρίως σε άχυρο σιτηρών, ενώ τα *Hericium*, *Ganoderma* και *Lentinula* σε πριονίδια (Stamets , 2000). Ελαφρώς ζυμωμένα υποστρώματα αποτελούμενα από υπολείμματα βάμβακος και ρυζιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη καλλιέργεια του *Volvariella volvacea*, ενώ θετικά αξιολογήθηκε η ανάπτυξη στελεχών *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Agrocybe cylindracea*, *V. volvacea* σε υπολείμματα βάμβακος, άχυρο σίτου και κελύφη φιστικιών (Philippoussis, et al., 2001). Το *Pleurotus* έχει δοκιμαστεί ακόμα και σε πολτό και φλοιό καφέ, μειώνοντας την περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ταννίνες (Fan, et al., 2000).

3.2.5 Διατροφική αξίαμανιταριών

Η γεύση και το άρωμα των εδώδιμων μανιταριών οφείλεται στα συστατικά τους που μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πτητικές και μη πτητικές ενώσεις. Οι πτητικές ενώσεις που περιέχονται εξαφανίζονται με το πέρασμα του χρόνου και μειώνονται σημαντικά με το μαγείρεμα. Άρα, η γεύση των μανιταριών που έχουν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, ή έχουν μαγειρευτεί, οφείλεται στις μη πτητικές ενώσεις που διαθέτουν. Η γεύση και το άρωμα των μανιταριών οφείλεται κυρίως σε χαμηλού μοριακού βάρους και υδατοδιαλυτές ενώσεις, που περιλαμβάνουν 5'-νουκλεοτίδια, ελεύθερα αμινοξέα και σάκχαρα (Hui, 2010).

Πίνακας 6: Σύσταση μανιταριών του είδους *Hericium erinaceus* (Mau, et al., 2001)

Πίνακας Συστατικά	% Συγκέντρωση
Υγρασία	4,31 ± 0,46 *
Ξηρό βάρος	95,69 ± 0,46
Τέφρα	9,35 ± 0,12
Υδατάνθρακες	57 ± 0,63
Λιπαρά	3,52 ± 0,16
Φυτικές ίνες	7,81 ± 0,07
Πρωτεΐνες	22,3 ± 0,71

Γενικά, τα μανιτάρια είναι μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών, που αντιστοιχούν σε 19%-35% του ξηρού τους βάρους. Οι καρποφορίες του γένους *Hericium* περιέχουν 22,3% πρωτεΐνης, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από άλλα εδώδιμα είδη όπως *Dictyophora indusiata* (14,6%), *Grifola frondosa* (21,1%) και *Tricholoma giganteum* (16,1%) (Mau, et al., 2001). Το περιεχόμενο σε λιπαρά των μανιταριών κατά μέσο όρο ανέρχεται στο 4% του ξηρού τους βάρους ενώ κυμαίνεται μπορεί να κυμανθεί 1,1% έως 8,3% (Miles, et al., 2004). Τα μανιτάρια του γένους *Hericium* περιέχουν 3,52% λιπαρά (Mau, et al., 2001). Όσον αφορά τους υδατάνθρακες το *H. erinaceus* περιέχει 57% υδατάνθρακες ενώ γενικά στα μανιτάρια έχουν ποσοστό 44-74.3% του ξηρού τους βάρους. Οι φυτικές ίνες που περιέχει είναι 7,81%, δηλαδή παρόμοιο ποσοστό με άλλα είδη, π. χ. *Agaricus bisporus* (8,1%), *Lentinula edodes* (7,3-8 %), *Pleurotus* sp. (11,5%) και *V. voluacea* (9,3%) αλλά αυξημένο σε σχέση με το *Flammulina velutipes* (3,7%) (Mau, et al., 2001; Miles, et al., 2004).

Στα μανιτάρια πολλοί διαφορετικοί πολυσακχαρίτες. Στο είδος *H. erinaceus* περιέχονται μανιτόλη, τριαλόζη, και αραβιτόλη (Mau, et al., 2001). Σε άλλα είδη οι πολυσακχαρίτες βρέθηκαν 349-457 mg/g ξηρού βάρους, στο είδος *V. voluacea* (Mau, et al., 1997), 205-320 mg/g στο *A. bisporus* (Tseng, et al., 1999), 98,7-316 mg/g στα *Auricularia* spp. και *Tremella fuciformis* (Mau, et al., 1998), 6,96-20,8 mg/g στο *Pleurotus eryngii*, 188-270 mg/g στο *Clitocybe maxima*, 125 ± 3,02 mg/g στο *P.eryngii* var. *ferulae* και 137 ± 1,57 mg/g στο *P. ostreatus* (Tsai, et al., 2009). Στο *H. erinaceus* είναι 162,64 ± 6,85 mg/g ξηρού βάρους (Mau, et al., 2001).

Πίνακας 7: Συγκέντρωση υδατοδιαλυτών σακχάρων στο είδος *H. erinaceus* (Mau, et al., 2001)

Υδατοδιαλυτά σάκχαρα (mg/g ξηρού βάρους)	
Αραβιτόλη	127,17 ± 8,45
Γλυκόζη	11,35 ± 1,74
Μανιτόλη	12,98 ± 1,76
myo - Inositol	1,43 ± 0,12
Τριαλόζη	9,71 ± 1,06
Συγκέντρωση σακχάρων	162,64 ± 6,85

Τα μανιτάρια περιέχουν, επίσης, και ελεύθερα αμινοξέα και msg (monosodiumglutamate-like) ενώσεις, σε συγκέντρωση 77,92 και 22,67 mg/g ξηρού βάρους αντίστοιχα (MilesandChang 2004). Στο είδος *C. maxima* είναι 17,6-37,6 mg/g και 5,2-8,9 mg/g αντίστοιχα, στο *P. eryngii var ferulea* 10,5 ± 0,09 και 1,76 ± 0,09 mg/g, στο *P. ostreatus* 12,5 ± 0,16 mg/g (Tsai, et al., 2009) και 2,14 ± 0.03 mg/g, στο *A. aegerita* 49,79 και 11,9 mg/g αντίστοιχα, τέλος στο είδος *V. volnacea* (Mau, et al., 1997) 36.11-60.18 και 11,20-26.21 mg/g αντίστοιχα. Το είδος *H. erinaceus* έχει όμοια σύσταση με τα είδη του γένους *Pleurotus*, δηλαδή 10,93 και 1,0 mg/g ξηρού βάρους αντίστοιχα (Mau, et al., 2001).

Τα 5'-νουκλεοτίδιαμπορείναείναι 5'-guasinemonophosphate (5'-GMP), 5'-inosinenonophosphate (5'-IMP) και 5'-xanthosinemonophosphate (5'-XMP) (Tsai, et al., 2009). Στο είδος *H. erinaceus* έχουν συγκέντρωση 14,1 ± 0,43 mg/g ξηρού βάρους (Mau, et al., 2001). Συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη μανιταριών η συγκέντρωσή τους στο *H. erinaceus* είναι αυξημένη. Ενδεικτικά, στο *A. bisporus* η συγκέντρωσή είναι 1.63–4.89 mg/g ξηρού βάρους (Tseng, et al., 1999)και στο *P. eryngii* είναι 1,63–4.89 mg/g (Tsai, et al., 2009).

3.3 Σκοπός της εργασίας

Πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συγκριτική αξιολόγηση μυκήτων των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Hericiium erinaceus* στην αποδόμηση και στην αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου μέσω της παρακολούθησης των μεταβολών επιλεγμένων ρυπαντικών παραμέτρων. Επίσης συναξιολογήθηκε και η παραγωγή συγκεκριμένων ενζύμων από τους μύκητες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αποβλήτου.

Παράλληλα διερευνήθηκε η δυνατότητα καλλιέργειας του είδους *H. erinaceus* για την παραγωγή καρποφοριών σε υποστρώματα που περιείχαν διάφορες αναλογίες παραπροϊόντων ελαιοκομίας σε σχέση με συμβατικά υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδια. Ακολούθησε προσδιορισμός βασικών διατροφικών χαρακτηριστικών των μανιταριών που παράχθηκαν και εξετάστηκαν οι μεταβολές στη σύσταση των καρποφοριών αναλόγως του υποστρώματος καλλιέργειας.

4 Υλικά και μέθοδοι

4.1 Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

Σκοπός είναι η μελέτη της μεταβολής των ιδιοτήτων του τριφασικού αποβλήτου ελαιοτριβείου όταν σε αυτό αναπτυχθούν συγκεκριμένα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης και ειδικότερα βασιδιομυκήτων. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν οι μεταβολές στο pH, στην αγωγιμότητα, στο φαινολικό φορτίο, στο χρώμα και στη φυτοτοξικότητα του αποβλήτου. Επιπλέον προσδιορίστηκε η παραγωγή βιομάζας από τα μυκηλιακά στελέχη και η παραγωγή ενζύμων (λακκάση, υπεροξειδάση του μαγγανίου, υπεροξειδάση της λιγνίνης και στην οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης) που συνδέονται με την αποικοδόμηση συστατικών των αποβλήτων. Όλες οι παράμετροι αξιολογήθηκαν σε τόσο σε διαφορετικά στελέχη όσο και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τριφασικού αποβλήτου. Πραγματοποιήθηκαν 2 πειραματικές διαδικασίες. Το πρώτο πείραμα ήταν προκαταρκτικό για την αξιολόγηση των στελεχών, ενώ στο δεύτερο εξετάστηκαν οι μεταβολές στο υπόστρωμα με την πάροδο του χρόνου.

4.1.1 Πρώτο πείραμα με καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

4.1.1.1 Προετοιμασία στελεχών

Καταρχάς πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα ώστε να παρατηρηθεί η συμπεριφορά των μυκήτων *Hericium erinaceus* (στελέχη 4514 και 3001) και *Pleurotus ostreatus* (στέλεχος 179). Τα στελέχη προέρχονταν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ. Αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (μητρικές καλλιέργειες) σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C.

Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar (PDA)

Η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας που το παρείχε (Conda). Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό προστέθηκαν 39 g σκόνης PDA και το μίγμα θερμάνθηκε αναδεδυόμενο έως ότου διαλυθούν τελείως. Τοποθετήθηκε σε φιάλες με βιδωτό πώμα και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 121 °C και

πίεση 1,1 atm. Μετά το τέλος της αποστείρωσης το θρεπτικό μοιράστηκε σε πλαστικά τρυβλία Petri σε θάλαμο νηματικής ροής.

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για να μπορέσουν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά στις καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα έπρεπε να προσαρμοστούν στην παρουσία υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων στο θρεπτικό μέσο. Έτσι, εμβολιάστηκαν ασηπτικά, σε θάλαμο νηματικής ροής, από τις μητρικές καλλιέργειες σε τρυβλία με στερεό μέσο καλλιέργειας που περιείχε 10 % τριφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου. Έπειτα, αναπτύχθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 27°C έως ότου καλυφθεί με μυκήλιο όλη η επιφάνεια του υποστρώματος.

Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου με 10% (v/v σε νερό) τριφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου:

Η επεξεργασία του αποβλήτου γινόταν σύμφωνα με την παράγραφο 2.1.1.2. Ακολούθησε αραιώση του με απιονισμένο νερό 10% (v/v σε νερό). Ύστερα, στερεοποιήθηκε με Agar 1,5 % (w/v) και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά στους 121°C και πίεση 1,1 atm. Τέλος, μοιράστηκε σε πλαστικά τρυβλία Petri σε θάλαμο νηματικής ροής.

4.1.1.2 Επεξεργασία καλλιιεργειών σε υγρά υποστρώματα

Πρώτα, έγινε επεξεργασία του τριφασικού αποβλήτου ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά του συστατικά και να ρυθμιστεί το pH. Το απόβλητο προέρχονταν από ελαιοτριβείο στην Κρήτη (Καστέλι Χανίων) και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Η απόψυξη γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου το προηγούμενο βράδυ από την επεξεργασία. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Ρύθμιση pH στο 5,5 με τη χρήση διαλύματος 2M CaO
2. Φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για 10 λεπτά (Biofuge Stratos)
3. Παραλαβή υπερκευμένου και διήθηση με απλό διηθητικό χαρτί με τη βοήθεια αντλίας κενού

Έπειτα το απόβλητο αραιώθηκε με απιονισμένο νερό σε συγκεντρώσεις 12,5%, 25% και 50% (v/v) και μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Σε κάθε φιάλη υπήρχε 100 ml αραιωμένου αποβλήτου και ένδειξη για την συγκέντρωση αποβλήτου που περιείχε. Οι φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 1 ώρα σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,1 atm.

Στη συνέχεια, αφού το περιεχόμενο των φιαλών έφθασε σε θερμοκρασία δωματίου, εμβολιάστηκαν ασηπτικά με τα στελέχη των μυκήτων σε θάλαμο νηματικής ροής. Το εμβόλιο παραλήφθηκε από το τρυβλίο με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα διαμέτρου 1,2 cm ώστε όλα τα εμβόλια να έχουν το ίδιο μέγεθος. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 27 °C και αναδεύονταν με το χέρι μια φορά κάθε μέρα.

Για κάθε στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε υπήρχαν 4 επαναλήψεις από κάθε επέμβαση. Ακόμη, υπήρχαν υποστρώματα σε 4 φιάλες από κάθε επέμβαση (12,5 %, 25%, 50 %) που δεν είχαν εμβολιαστεί και παρέμειναν στις ίδιες συνθήκες με τις εμβολιασμένες φιάλες (μάρτυρας) σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, εμβολιάστηκαν και υποστρώματα αποτελούμενα από Malt Extract (15 g/l) (4 επαναλήψεις). Τα εμβόλια για της φιάλες με Malt Extract προερχόταν από καλλιέργειες σε PDA, ενώ όλα τα υπόλοιπα εμβόλια προέρχονταν από στερεά υποστρώματα με 10% (v/v) τριφασικό απόβλητο.

Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου Malt Extract

Σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό διαλύθηκαν 15 g Malt Extract Broth (Conda) και έπειτα μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες. Οι φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι και αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,1 atm.

4.1.1.3 Αναλύσεις

1. Μέτρηση βιομάζας

Υλικά και όργανα

- Διηθητικό χαρτί Whatman No 4
- Εμβολιασμένα δείγματα υγρών αποβλήτων - Δείγματα μάρτυρα
- Freeze dryer (Telstar - Cryodos)
- Ζυγός ακριβείας

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε μετά από 42 ημέρες καλλιέργειας με την παραλαβή του μυκηλίου πάνω σε διηθητικό χαρτί Whatman No 4, το οποίο προηγουμένως είχε ζυγιστεί. Η συγκεκριμένη διαδικασία έγινε με τη βοήθεια αντλίας κενού και το υγρό μέσο καλλιέργειας, αφού παραλήφθηκε αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C). Στη συνέχεια το διηθητικό χαρτί με τη βιομάζα που είχε συγκρατήσει στην επιφάνεια του

ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και υπολογίστηκε (αφού αφαιρέθηκε το βάρος του διηθητικού χαρτιού, το νωπό βάρος της βιομάζας). Στη συνέχεια, το μυκήλιο τοποθετήθηκε στην κατάψυξη (-20°C) για 24 ώρες και έπειτα στο λυοφιλιωτή για 24 ώρες ώστε να χάσει την υγρασία του. Μετά ζυγίστηκε (ξηρό βάρος βιομάζας) και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

2. Μέτρηση pH και αγωγιμότητας

Το τελικό pH του υγρού μέσου καλλιέργειας μετά την παραλαβή του μυκηλίου μετρήθηκε σε πεχάμετρο (Corning - Ell Model 12) και η αγωγιμότητα σε αγωγιμόμετρο (Jenway, 4010 Conductivity meter). Οι μετρήσεις αγωγιμότητας έγιναν στο Εργαστήριο Εδαφολογίας του ΓΠΑ.

3. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος (μέθοδος Folin-Ciocalteu) (Waterman, et al., 1994) .

Υλικά και όργανα

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα υγρών αποβλήτων που είχαν βιοεπεξεργαστεί ή μη
- Αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu (MERCK)
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου - 20% w/v Na₂CO₃ (Alpha Aesar)
- Συριγγικό οξύ (Alpha Aesar)
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml – Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml – Σιφώνιο των 20 ml
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi)

Πειραματική διαδικασία

- Προσθήκη 20 ml απιονισμένου νερού στις ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- Προσθήκη 250 μl του δείγματος (είχε αραιωθεί κατάλληλα όπου χρειάστηκε)
- Προσθήκη 125μl του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu
- Μετά από 1 min, προσθήκη 3,75 ml διαλύματος Na_2CO_3 20% w/v
- Ανάδευση του δείγματος
- Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ακριβώς
- Μέτρηση απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (760 nm)
- Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με χρήση συριγγικού οξέος, χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 0, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400, και 1600 μg συριγγικού οξέος/ml

4. Μέτρηση δείκτη βλαστικότητας

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων ή μη υγρών αποβλήτων
- Σπόροι μαρουλιού από βιολογική καλλιέργεια
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα του 1ml – Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Τρυβλία Petri
- Πλαστική σακούλα

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Zucconi *et al* (1981). Αρχικά τοποθετήθηκε μια στρώση από τρία διηθητικά χαρτιά στο εσωτερικό του τρυβλίου Petri και στην επιφάνεια τους απλώθηκαν 25 σπόροι μαρουλιού, οι οποίοι διαβρέχτηκαν με 3 ml δείγματος βιοεπεξεργασμένου και μη αποβλήτου (είχε αραιωθεί κατάλληλα). Ακολούθως, τα τρυβλία πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε νάιλον σακούλες με αυξημένη υγρασία και επώαστηκαν στους 25 ° C επί τρεις ημέρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το δείγμα αναφοράς (μάρτυρας) χρησιμοποιώντας ποσότητα απιονισμένου νερού. Ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των εκβλαστημένων σπόρων, καθώς και του μήκους του ριζιδίου και του βλαστιδίου.

Ο δείκτης βλαστικότητας (%GI) δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$GI (\%) = (\text{αριθμός των σπόρων που βλάστησαν} \times \text{μήκος του ριζιδίου των σπόρων του δείγματος}) / (\text{αριθμό σπόρων του δείγματος αναφοράς που βλάστησαν} \times \text{το μήκος του ριζιδίου των σπόρων στο μάρτυρα})$

4. Μέτρηση αποχρωματισμού

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων ή μη αποβλήτων
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml – Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi)

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση του αποχρωματισμού πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ποσότητας δειγμάτων και μάρτυρα (όπου χρειάστηκε αραιώθηκαν κατάλληλα) σε κυψελίδα. Ακολούθησε τοποθέτηση αυτής στο φασματοφωτόμετρο και μέτρηση της απορρόφησης στα 525 nm (Aggelis, et al., 2002).

5. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμου λακκάση

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της λακκάσης υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Bourbonais *et al.*(1990). Βασίζεται την οξείδωση του υποστρώματος ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline – 6 –sulphonicacid).

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων (όπου χρειάστηκε αραιώθηκαν κατάλληλα)
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml – Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)

- Πεχάμετρο
- Αντιδραστήριο 2,2 –azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfolic acid (ABTS, Biomedical)
- Διάλυμα τρυγικού νατρίου 0,1 M (pH 4,5) [Sodium tartrate] (Alpha Aesar)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,6 ml τρυγικού νατρίου (0,1 M, pH 4,5) και 0,4ml διηθημένου δείγματος. Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται με 0,2 ml ABTS (1,5 mM) κατόπιν αναδεύσεως. Ακλούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 425 nm κάθε 20 sec μέχρι τον τερματισμό της αντίδρασης (δηλ. σταθεροποίηση της τιμής απορρόφησης). Επίσης, υπήρξε τυφλό στο οποίο έχει αντικατασταθεί το δείγμα με νερό για τον μηδενισμό του οργάνου.

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

$$\text{Laccase activity} = dA_{(425 \text{ nm})}/dt_{(\text{min})} \times E (\text{l/mol}\cdot\text{cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

$$\text{όπου } E = 36 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται στην μονάδα (U) όπου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά min.

6. Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) και Mn-υπεροξειδάση

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα του MnP υπολογίζεται σύμφωνα με την μέθοδο των Ngo & Lenhoff (1980). Βασίζεται στην οξείδωση του Mn (II) σε Mn (III) και χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το MnSO₄. Αρχικά εκτιμάται η AL ενεργότητα σε μείγμα αντίδρασης χωρίς MnSO₄ και H₂O₂ (είναι η καλούμενη 'background activity'). Ακολουθεί η εκτίμηση της AP ενεργότητας σε μείγμα χωρίς MnSO₄ (background activity + ενεργότητα των ανεξάρτητων Mn υπεροξειδασών). Τέλος, γίνεται η εκτίμηση της AR ενεργότητας σε ένα πλήρες μείγμα που περιέχει MnSO₄ και H₂O₂. Η έναρξη των αντιδράσεων για τις AP και AR ενεργότητες επιτυγχάνεται με πρόσθεση H₂O₂.

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

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0,02, 0,2 και 1 ml
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)
- Πεχάμετρο (Corning-Ell Model 12)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) 0,1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο (Alpha Aesar) για τη ρύθμιση του pH στο 4,5
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB, Alpha Aesar)
- Διάλυμα 1 mM 3 -3 methyl – 2 – benzothiazololinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH, Alpha Aesar)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος 0,1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4,5), 0,1ml διαλύματος 25 mM DMAB και 0,05 ml διαλύματος 1 mM MBTH. Η εκκίνηση της μη-ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,33 ml δείγματος. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 509 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

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

$$\text{Background activity} = dA_{(590 \text{ nm})}/dt_{(\text{min})} \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

όπου $E (\text{l/mol.cm}) = 32,9 \text{ l/mol.cm}$

Η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται στην μονάδα (U) όπου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά min

- Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn)

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0,02, 0,2, 1 ml – Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)
- Πεχάμετρο (Corning-Ell Model 12)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) 0,1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο (Alpha Aesar) για τη ρύθμιση του pH τιμή 4,5
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB, Alpha Aesar)
- Διάλυμα 25mM 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH, Alpha Aesar)
- 10 mM H₂O₂ (Carlo Erba)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτωμένης του Mn) πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος 0,1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4,5), 0,1ml διαλύματος 25 mM DMAB, 0,05 ml διαλύματος 1 mM MBTH και 0,33 ml διηθημένου δείγματος. Η εκκίνηση της αντιδράσεως πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,005ml διαλύματος 10 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το τερματισμό της αντίδρασης.

Η ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτωμένου του Mn) υπολογίζεται ως εξής:

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

όπου $E \text{ (l/mol.cm)} = 32,9 \text{ l/mol.cm}$

Στη συνέχεια, η υπεροξειδάση (μη εξαρτωμένου το Mn) υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της background activity. Συνεπώς:

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

Η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται στην μονάδα (U) όπου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά min.

- Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων (όπου χρειάστηκε αραιώθηκαν κατάλληλα)
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0,02, 0,2 και 1 ml - Ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)
- Πεχάμετρο (Corning-Ell Model 12)
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) 0,1 M, στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο (Alpha Aesar) για τη ρύθμιση του pH τιμή 4,5
- Διάλυμα 25 mM 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB, Alpha Aesar)
- Διάλυμα 25 mM 3 –methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH, Alpha Aesar)
- 10 mM H₂O₂ (Carlo Erba)
- 20 mM MnSO₄ (Mallinc Krodt Inc.)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Mn - υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος 0,1 M ηλεκτρικού – γαλακτικού νατρίου (pH 4.5), 0,1 ml διαλύματος 25 mM DMAB, 0,05 ml διαλύματος 1 mM MBTH, 0,33 ml δείγματος και 0,005 ml 20 mM MnSO₄. Η εκκίνηση της αντιδράσεων έγινε με προσθήκη 0,005 ml διαλύματος 10 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι τον τερματισμό της αντίδρασης.

Η ενεργότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίστηκε ως εξής:

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

όπου $E \text{ (l/mol.cm)} = 32,9 \text{ l/mol.cm}$

Η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται στην μονάδα (U) όπου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά min.

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

Συνεπώς:

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

- Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP) μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Tien & Kirk (1988). Η μετρούμενη αύξηση της απορρόφησης στα 310nm οφείλεται στην οξειδωση της veratryl alcohol σε veratryl aldehyde.

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων (όπου χρειάστηκε αραιώθηκαν κατάλληλα)
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 0,02, 0,2 και 1 ml
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)
- Πεχάμετρο (Corning-ElI Model 12)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl alcohol, Alpha Aesar)
- 0,1 M τρυγικό νάτριο (Alpha Aesar) (pH=3)
- 54 mM H₂O₂ (Carlo Erba)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της υπεροξειδάσης της λιγνίνης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,4 ml τρυγικού νατρίου (0,1 M, pH=3), 0,2 ml δείγματος και 0,0175 ml διαλύματος 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης. Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 0,0075 ml διαλύματος 54 mM H₂O₂. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

- Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Υλικά και όργανα

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υγρών αποβλήτων (όπου χρειάστηκε αραιώθηκαν κατάλληλα)
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες 0,02, 0,2, 1 ml – Ακρορύγχια
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer)

- Πεχάμετρο (Corning-ElI Model 12)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl alcohol, Alpha Aesar)
- 0,1 M τρυγικό νάτριο (Alpha Aesar) (pH = 3)
- 54mM H₂O₂ (Carlo Erba)

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κυψελίδα 0,4 ml τρυγικού νατρίου (0,1 M, pH = 3) και 0,2 ml δείγματος. Η εκκίνηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,0175 ml διαλύματος 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης. Ακολούθησαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

4.1.2 Δεύτερο πείραμα με καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

Σκοπός του πειράματος ήταν η αξιολόγηση των μεταβολών σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου λόγω της ανάπτυξης του στελέχους *Hericium erinaceus* (στέλεχος 4514) σε σχέση με το χρόνο καλλιέργειας. Οι μετρήσεις που έγιναν ήταν οι ίδιες με αυτές που έγιναν στο πρώτο πείραμα με τη διαφορά ότι σε αυτό το πείραμα πραγματοποιούνταν μετρήσεις μια φορά την εβδομάδα για 5 εβδομάδες.

Και σε αυτό το πείραμα υπήρχαν υποστρώματα με απόβλητο ελαιοτριβείου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις που δεν είχαν εμβολιαστεί (μάρτυρας) και εμβολιασμένα υποστρώματα αποτελούμενα από Malt extract. Για κάθε επέμβαση είχαν προστεθεί επιπλέον φιάλες ώστε κάθε εβδομάδα να αφαιρείται μια σειρά από 4 επαναλήψεις η κάθε μια. Όσον αφορά το μάρτυρα, κάθε εβδομάδα αφαιρούνταν δείγμα 10 ml για να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις.

4.2 Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα

4.2.1 Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου σε διάφορα στερεά υποστρώματα εντός σωλήνων ('race tubes')

Υλικά και όργανα

- Πριονίδι οξιάς μικρής διατομής
- Άχυρο σίτου
- Κλαδέματα ελιάς
- Φύλλα ελιάς
- Πίτουρο
- Διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου από την Μεσσηνία που είχε διατηρηθεί στο ψυγείο
- Ανθρακικό ασβέστιο

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά τα υποστρώματα (άχυρο σίτου, κλαδέματα ελιάς, φύλλα ελιάς, πριονίδι οξιάς) τοποθετήθηκαν για διαβροχή σε νερό βρύσης για 24 ώρες, ώστε να αυξηθεί η υγρασία τους στο 50-80%. Ακολούθησε η προσθήκη του πίτουρου για την ρύθμιση του λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N) και για τον εμπλουτισμό με θρεπτικά μικροσυστατικά των υποστρωμάτων καλλιέργειας: 10% (w/w) στο άχυρο σίτου, 20% (w/w) στο πριονίδι, 5% (w/w) στα φύλλα και κλαδέματα ελιάς και στο διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου. Ακόμη προστέθηκε 1% (w/w) ανθρακικό ασβέστιο για τη ρύθμιση του pH σε επίπεδα ικανοποιητικά για την ανάπτυξη των μυκήτων. Οι επεμβάσεις που σχεδιάστηκαν φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

Πίνακας 8: Υποστρώματα καλλιέργειας και οι συντομογραφίες τους. Τα υποστρώματα με βάση το πριονίδι οξιάς χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *Hericium erinaceus*, ενώ εκείνα με βάση το άχυρο σίτου για την καλλιέργεια του *Pleurotus ostreatus*.

Επέμβαση	Συντομογραφία
Πριονίδι οξιάς (ή άχυρο σίτου) 100%	BS 100% (ή WS 100%)
Πριονίδι οξιάς (ή άχυρο σίτου) + 25% Διφασικό απόβλητο	BS (ή WS) +25% TPOMW
Πριονίδι οξιάς (ή άχυρο σίτου) + 50% διφασικό απόβλητο	BS (ή WS) + 50% TPOMW
Πριονίδι οξιάς (ή άχυρο σίτου) + 75% διφασικό απόβλητο	BS (ή WS) + 75% TPOMW
Πριονίδι οξιάς +25% κλαδέματα ελιάς	BS + 25% OLPR
Πριονίδι οξιάς +50% κλαδέματα ελιάς	BS + 50% OLPR
Πριονίδι οξιάς + 75% κλαδέματα ελιάς	BS + 75% OLPR
Κλαδέματα ελιάς 100%	OLPR 100%
Κλαδέματα ελιάς + 25% Διφασικό απόβλητο	OLPR + 25% TPOMW
Κλαδέματα ελιάς + 50% Διφασικό απόβλητο	OLPR + 50% TPOMW
Άχυρο σίτου + 25% φύλλα ελιάς	WS + 25% OLV
Άχυρο σίτου + 50% φύλλα ελιάς	WS + 50% OLV
Άχυρο σίτου + 75% φύλλα ελιάς	WS + 75% OLV
Φύλλα ελιάς 100%	OLV 100%
Φύλλα ελιάς + 25% Διφασικό απόβλητο	OLV + 25% TPOMW
Φύλλα ελιάς + 50% Διφασικό απόβλητο	OLV + 50% TPOMW

Αφού τα υποστρώματα αναμείχθηκαν στις παραπάνω αναλογίες, τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες διαμέτρου 2,6 cm και μήκους 10 cm και πωματίστηκαν με βαμβάκι. Για κάθε επέμβαση έγιναν 4 επαναλήψεις.

Ύστερα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 °C και πίεση 1,1 atm για 1 ώρα. Αφού, το περιεχόμενο τους έφθασε σε θερμοκρασία δωματίου, εμβολιάστηκε με τα στελέχη των μυκήτων. Το εμβόλιο πάρθηκε με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα διαμέτρου 1,2 cm σε ασηπτικές συνθήκες. Όσον αφορά τους σωλήνες που περιείχαν διφασικό απόβλητο το εμβόλιο προέρχονταν από τρυβλία που το θρεπτικό τους υπόστρωμα περιείχε 10% (v/v) υγρό απόβλητο ελαιολτριβείου, ενώ τα υπόλοιπα εμβόλια προέρχονταν από τρυβλία με PDA. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για το πριονίδι και τα κλαδέματα ελιάς ήταν *Hericium erinaceus* 4514 και 3001 και για το άχυρο και τα φύλλα ελιάς το *Pleurotus ostreatus* 179. Η επώαση έγινε στους 27 °C για 28 ημέρες. Οι μετρήσεις (mm/day) της

γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου λαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες σε 4 αντιδιαμετρικά σημεία κάθε σωλήνα (Philiproussis, et al., 2001; Zervakis, et al., 2001).

Για τα υποστρώματα καλλιέργειας μετρήθηκε ο λόγος C/N με τη χρήση στοιχειακού αναλυτή (Carlo Erba, EA 1108 Elemental analyzer), αφού τα δείγματα είχαν νωρίτερα τοποθετηθεί σε ξηραντήρα στους 300 °C και είχαν κονιορτοποιηθεί. Ακόμη, μετρήθηκε η υγρασία των υποστρωμάτων μετά τη διαβροχή τους σε ζυγό προσδιορισμού υγρασίας (Mettler LP 16).

Τέλος, αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου στα 'race tubes' και επιλέχθηκαν τα υποστρώματα για την καλλιέργεια μανιταριών που ακολούθησε.



Εικόνα 15 Πειραματικοί σωλήνες ('race tubes') για τον προσδιορισμό της μυκηλιακής ανάπτυξης

4.2.2 Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού για καλλιέργεια μανιταριών («σπόρος» – spawn)

Για την καλλιέργεια μανιταριών απαιτείται η δημιουργία «σπόρου» αποικισμένου από το στέλεχος του μύκητα που έχει επιλεγθεί. Για τη διαδικασία αυτή επιλέχθηκε ο σπόρος σιταριού.

Υλικά και όργανα

- Σιτάρι
- Ανθρακικό ασβέστιο CaCO_3 ή μαρμαρόσκονη
- Θεϊκό ασβέστιο CaSO_4
- Κωνικές φιάλες 2L

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προστέθηκε το σιτάρι σε νερό που βράζει και συνεχίστηκε το βράσιμο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, παρέμεινε στο βραστό νερό για άλλα 15 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκε η περίσσεια υγρασίας και αφέθηκε να κρυώσει καλά. Προστέθηκε 4% CaCO_3 (w/w) και 2% CaSO_4 (w/w). Στη συνέχεια οι φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι και αποστειρώθηκαν στους 121 °C και πίεση 1,1 atm για 1 ώρα. Ακολούθως εμβολιάστηκε με τμήματα μυκήλιου από καλλιέργεια σε PDA του επιθυμητού στελέχους υπό ασηπτικές συνθήκες και σε θάλαμο νηματικής ροής. Ο «σπόρος» επώαστηκε στους 27 °C σε σκοτεινό θάλαμο για περίπου 1 μήνα έως ότου αποικιστεί πλήρως. Για την αξιολόγηση της καλλιεργητικής διαδικασίας στα διάφορα στερεά υποστρώματα καταγράφηκαν για κάθε επανάληψη τα ακόλουθα: Η διάρκεια επώασης (δηλαδή το χρονικό διάστημα από την ημέρα του εμβολιασμού έως τον πλήρη αποικισμό του υποστρώματος με το μυκήλιο), το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την ημέρα εμβολιασμού μέχρι την ημέρα που σχηματίστηκε η πρώτη καταβολή καρποφορίας (πρωιμότητα), το συνολικό βάρος των παραχθέντων μανιταριών, ενώ τέλος υπολογίστηκε η βιολογική αποδοτικότητα ως επί τοις εκατό λόγο βάρους νωπών μανιταριών προς το ξηρό βάρος του αντίστοιχου υποστρώματος (Philippoussis, et al., 2001).

4.2.3 Καλλιέργεια μανιταριών

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πειράματος καλλιέργειας στους σωλήνες ('race tubes'), ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το στέλεχος *Hericium erinaceus* 4514. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί και για την καλλιέργεια μανιταριών. Σκοπός του πειράματος ήταν να αξιολογηθεί η παραγωγή μανιταριών του στελέχους αναλόγως του υποστρώματος, καθώς και η παραλαβή καρποφοριών ώστε να γίνουν αναλύσεις διατροφικών χαρακτηριστικών.

Υλικά και όργανα

- Πριονίδι οξιάς μικρής διατομής
- Κλαδέματα ελιάς
- Πίτουρο
- Ανθρακικό ασβέστιο – Μαρμαρόσκονη

Πειραματική διαδικασία

Τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

Πίνακας 9: Στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια *Hericium erinaceus*

Επέμβαση	Συντομογραφία
Πριονίδι οξιάς 100%	BS 100% (ή WS 100%)
Πριονίδι οξιάς +25% κλαδέματα ελιάς	BS + 25% OLPR
Πριονίδι οξιάς +50% κλαδέματα ελιάς	BS + 50% OLPR
Πριονίδι οξιάς + 75% κλαδέματα ελιάς	BS + 75% OLPR
Κλαδέματα ελιάς 100%	OLPR 100%

Αρχικά, τα υλικά που θα χρησιμοποιούνταν ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια παρέμειναν για 24 ώρες σε νερό βρύσης ώστε να αποκτήσουν 70% υγρασία περίπου και ακολούθησε η ανάμειξη των υλικών. Πρώτα, προστέθηκε το πίτουρο σε ποσοστό 5% (w/w) στα κλαδέματα ελιάς και 20% (w/w) στο πριονίδι. Στη συνέχεια προστέθηκε το ανθρακικό ασβέστιο σε ποσοστό 1% (w/w). Τα μίγματα των υποστρωμάτων αναμείχθηκαν καλά και τοποθετήθηκε

1 kg από το καθένα σε αποστειρώσιμες σακούλες και οι οποίες πωματίστηκαν με βαμβάκι. Για κάθε υπόστρωμα καλλιέργειας υπήρχαν 4 επαναλήψεις. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C και πίεση 1,1 atm για 2 ώρες σε αυτόκαυστο. Όταν τα υποστρώματα ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου εμβολιάστηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικές συνθήκες με το «σπόρο» σε ποσοστό 3-4% (w/w) και κλείστηκαν ερμητικά. Έπειτα παρέμειναν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 27 °C έως ότου καλυφθεί το υπόστρωμα πλήρως από το μυκήλιο. Μετά τον αποικισμό του υποστρώματος από το μυκήλιο, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειας με σχετική υγρασία 95-98%, συνεχές φως, θερμοκρασία 20 °C ώστε να παραληφθούν οι καρποφορίες. Κατά την διάρκεια του πειράματος υπήρξε καταγραφή του χρονικού διαστήματος από τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων μέχρι την ολοκλήρωση της επώασης, του χρόνου που χρειάστηκε στον θάλαμο καλλιέργειας για την εμφάνιση της πρώτης καρποφορίας, η ημέρα συλλογής καθώς και το βάρος των καρποφοριών που παράχθηκε συνολικά.



Εικόνα 16. Καλλιέργεια μανιταριών του στελέχους *Hericium erinaceus* 4514

4.2.4 Ανάλυση σύστασης καρποφοριών

Στόχος ήταν η αξιολόγηση συγκεκριμένων διατροφικών και χημικών παραμέτρων και η πιθανή συσχέτιση τους με το υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργήθηκαν. Μετρήθηκαν τα ολικά λιπαρά, οι ολικές ινώδεις, η τέφρα, οι ολικές πρωτεΐνες, τα αντιοξειδωτικά και η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων.

Καταρχάς, οι καρποφορίες διατηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C). Έπειτα, λυοφιλιώθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν. Για τον προσδιορισμό των ολικών λιπαρών, των ολικών ινωδών και της τέφρας χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα της ανάλυσης Wendee από τους Henneberg και Stohmann το 1864 και πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων του Γ.Π.Α.

4.2.4.1 Προσδιορισμός τέφρας

Σκοπός είναι ο έμμεσος προσδιορισμός της οργανικής ουσίας του δείγματος μετά από καύση της οργανικής του ουσίας.

Υλικά και όργανα

- Ζυγός ακριβείας
- Κλίβανος στους 100 °C
- Ξηραντήρας
- Κάψες χώνευσης
- Πυραντήριο

Πρώτα οι κάψες χώνευσης τοποθετήθηκαν στον ξηραντήρα για να μην αυξηθεί η υγρασία τους μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-30 λεπτά). Έπειτα, τοποθετήθηκε 1 g δείγματος περίπου σε κάθε κάψα (καταγράφηκε το ακριβές βάρος του δείγματος). Κάθε κάψα χώνευσης είχε αριθμηθεί (αντιστοιχούσε σε ένα δείγμα) και ζυγιστεί. Όλες οι κάψες τοποθετήθηκαν στον αποτεφρωτήρα στους 550 °C για 5 ώρες. Όταν τέλειωσε ο χρόνος καύσης, κλείστηκαν οι κλίβανοι και αφέθηκε να πέσει η θερμοκρασία τους. Οι κάψες χώνευσης με το δείγμα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα ώστε να μην απορροφήσουν υγρασία και ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας.

Το βάρος της τέφρας υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$T (g) = [(Μεικτό βάρος μετά την αποτέφρωση - Βάρος κάψας) \times 100] / \text{βάρος δείγματος}$$



Εικόνα 17 Εισαγωγή δειγμάτων στον αποτεφρωτήρα

4.2.4.2 Προσδιορισμός λιπαρών

Η μέθοδος βασίζεται στη μέθοδο Soxhlet κατά την οποία γίνεται εκχύλιση του δείγματος με σκοπό την απομόνωση της διαλυτής ύλης (ακατέργαστο λίπος). Η διαδικασία της εκχύλισης γίνεται με τη βοήθεια του 2055 Soxtec Manual Unit που ελέγχει τη θερμοκρασία και έχει χρονική λειτουργία για τα διαφορετικά βήματα της διαδικασίας. Η θέση των φυσιγγίων εκχύλισης και το άνοιγμα/κλείσιμο των βαλβίδων για την ανάκτηση του διαλύματος ελέγχονται χειροκίνητα. Η μονάδα ελέγχου έχει ακόμη μια αντλία αέρα για την εξάτμιση του τελευταίου ίχνους διαλύματος από τα φυσίγγια εκχύλισης.

Υλικά και μέθοδοι

- Συσκευή εκχύλισης 2055 Soxtec Manual unit
- Φυσίγγια εκχύλισης
- Μεταλλικά δοχεία εκχύλισης
- Πετρελαϊκός αιθέρας (30-60°)

Πειραματική διαδικασία

Συνοπτικά, τα προς ανάλυση δείγματα ζυγίστηκαν μέσα στα φυσίγγια εκχύλισης και εισήλθαν στη μονάδα εκχύλισης. Μετά την προσθήκη διαλύτη (πετρελαϊκός αιθέρας) στα μεταλλικά δοχεία εκχύλισης, το διαλυτό υλικό (λίπος) εκχυλίστηκε μέσα στον διαλύτη σε μια διαδικασία δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο, το δείγμα εμβαπτίστηκε μέσα στο βραστό διαλύτη για να διαλυθεί όλο το λίπος. Στο δεύτερο στάδιο το δείγμα σηκώθηκε πάνω από την επιφάνεια του διαλύτη ώστε να επιτραπεί το επαρκές ξέπλυμα με το διαλύτη από τους συμπυκνωτές. Μετά την εκχύλιση οι βαλβίδες του συμπυκνωτή έκλεισαν και ανήλθαν στην

υψηλότερη θέση. Μετά από μερικά λεπτά η μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύτη συλλέγεται από τον συμπυκνωτή σε δοχείο συλλογής. Τα τελευταία κατάλοιπα του διαλύτη εξατμίζονται όταν ανοίγει η αντλία αέρα. Τελικά τα φυσιγγια εκχύλισης ξηραίνονται και ζυγίζονται.

Αναλυτικότερα, ζυγίστηκαν 0,5 g δείγματος, προστέθηκαν στα αριθμημένα φυσιγγια και πωματίστηκαν με βαμβάκι. Τα αριθμημένα μεταλλικά δοχεία εκχύλισης από τον κλίβανο τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς να αυξηθεί η υγρασία τους. Έπειτα ζυγίστηκαν και καταγράφηκε το βάρος τους. Τα φυσιγγια εκχύλισης τοποθετήθηκαν στη μονάδα εκχύλισης και όταν η θερμοκρασία έφτασε τους 75°C, προστέθηκαν και τα μεταλλικά δοχεία που περιείχαν 55 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Τα φυσιγγια εμβαπτίστηκαν στο διαλύτη για 15 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκε το δείγμα από το διαλύτη για άλλα 15 λεπτά, τα φυσιγγια ανήλθαν ακόμη μια θέση στη μονάδα εκχύλισης και ανοίχτηκε η αντλία αέρα ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης. Μόλις πέρασαν 10 λεπτά, τοποθετήθηκαν τα μεταλλικά δοχεία εκχύλισης σε φούρνο για 20 λεπτά. Τέλος, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα και όταν ήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίστηκαν και καταγράφηκε το βάρος τους.

Οι ολικές λιπαρές ουσίες υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον τύπο:

$$ΛΟ (g) = \{[(\text{Βάρος δοχείου} + \text{λίπος}) - (\text{Βάρος δοχείου})] \times 100\} / \text{Βάρος δείγματος}$$



Εικόνα 18 Συσκευή εκχύλισης 2055 Soxtec Manual unit

4.2.4.3 Προσδιορισμός ινωδών ουσιών

Η μέθοδος βασίστηκε στην απομάκρυνση των μη κυτταρινούχων συστατικών με τη χρήση διαλυμάτων θειικού οξέως και υδροξειδίου του νατρίου.

Υλικά και όργανα

- Ζυγός ακριβείας
- Φούρνος
- Κλίβανος
- Ξηραντήρας
- 2 ποτήρια ζέσεως
- ANKOM²⁰⁰
- Ειδικά σακίδια (F57 - F58 ANKOM)
- Θερμοσυγκολλητής (ANKOM)
- Moisture stop weight pouch ANKOM
- Μαρκαδόρος (F08 ANCOM)
- Κάψες χώνευσης
- 2 l διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,313 N
- 2 l διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 0,255 N
- 10 l απιονισμένο νερό
- Πετρελαϊκός αιθέρας 30 – 60 °

Πειραματική διαδικασία

Πρώτα, τα σακίδια (ANKOM) αριθμήθηκαν και ζυγίστηκαν (w_1) σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, σε κάθε σακίδιο τοποθετήθηκε περίπου 1g δείγματος, θερμοσυγκολλήθηκε και καταγράφηκε το ακριβές βάρος του δείγματος και ο αριθμός του σακιδίου. Υπήρχε, ακόμα, ένα κενό σακίδιο για τις απαραίτητες διορθώσεις (c_1). Τα σακίδια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να ετοιμαστούν όλα. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως με πετρελαϊκό αιθέρα και καλύφθηκαν από ένα μικρότερο ποτήρι ζέσεως. Μετά από 10 λεπτά, απομακρύνθηκε ο πετρελαϊκός αιθέρας και προστέθηκε νέα ποσότητα αιθέρα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Κάθε φορά τα δείγματα ανακινούνταν ώστε το δείγμα να μη συσσωρεύεται σε ένα σημείο. Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό στατό του μηχανήματος ANKOM²⁰⁰ και αφού η βαλβίδα ήταν κλειστή προστέθηκαν 2 l θειικού οξέος. Ακολούθησε θέρμανση έως τους 100 °C και συνεχής ανάδευση για 45 λεπτά. Ύστερα, αφαιρέθηκε το θειικό οξύ με το άνοιγμα της βαλβίδας και

πραγματοποιήθηκαν 3 ξηπλύματα με 1,5 l βραστό απιονισμένο νερό για 5 λεπτά κάθε φορά. Η ίδια διαδικασία έγινε και με το υδροξείδιο του νατρίου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για 8 ώρες τουλάχιστον ώστε να ξηρανθούν. Οι ζεστές κάψες και τα σακίδια από το κλίβανο τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι κάψες ζυγίστηκαν καθώς και τα σακίδια, και ακολούθησε αποτέφρωση στους 600 °C για 2 ώρες. Τέλος, οι κάψες που ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και καταγράφηκε το βάρος τους.

Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ινωδών ουσιών είναι:

$$\% \text{ ινώδεις ουσίες} = 100 \times [(w_3 - (w_1 \times C_1))] / w_2$$

W_1 : βάρος σακιδίου χωρίς δείγμα

W_2 : βάρος δείγματος

W_3 : απώλεια βάρους της οργανικής ύλης

C_1 : διόρθωση κενού σακιδίου

4.2.4.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων από τις καρποφορίες έγινε με την αξιολόγηση της δραστηριότητας στις ελεύθερες ρίζες με τη χρήση DPPH (2,2 – diphenyl – 1- picrylhydrazyl). Αρχικά είναι απαραίτητη η παραλαβή εκχυλίσματος από τα λυοφιλιωμένα και κονιορτοποιημένα δείγματα.

➤ Εκχύλιση

Υλικά και μέθοδοι

- Ζυγός ακριβείας
- Γυάλινη πιπέτα 10 ml
- Στατό
- Τράπεζα ανάδευσης (stirrer)
- Φυγόκεντρος (Biofuge Stratos)
- Falcon των 15 ml
- Μεθανόλη (Carlo Erba)
- Περιστροφικός εξατμιστής κενού (rotary evaporator)
- Αυτόματη πιπέτα του 1ml - Ακρορύγχια

- Eppendorf tubes
- Ξηραντήρα

Πειραματική διαδικασία

Καταρχάς μέσα σε φιαλίδια falcon ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας περίπου 0,5 g δείγματος και καταγράφηκε το ακριβές του βάρος. Με γυάλινη πιπέτα των 10 ml προστέθηκε 10 ml μεθανόλης. Τα falcon τοποθετήθηκαν σε στατό και ανακινήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης για 48 ώρες στις 250 rpm. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 2500 rpm στους 2 °C. Το υπερκείμενο παραλήφθηκε με αυτόματη πιπέτα του 1 ml και τοποθετήθηκε σε νέο φιαλίδιο falcon. Στο ίζημα προστέθηκαν 2,5 ml μεθανόλη και ανακινήθηκαν για άλλες 2 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 2500 rpm για 10 min και το υπερκείμενο προστέθηκε στο ίδιο falcon με το προηγούμενο διάλυμα. Ολόκληρη η ποσότητα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 5 min στις 2500 rpm. Καθαρές φιάλες του περιστροφικού εξατμιστή, που βρίσκονταν σε ξηραντήρα, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και σημειώθηκε το βάρος τους. Το εκχύλισμα του δείγματος τοποθετήθηκε στη φιάλη και με τη βοήθεια του εξατμιστή αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα μεθανόλης. Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στο φούρνο για 10 λεπτά για να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα μεθανόλης και έπειτα στον ξηραντήρα ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Η φιάλη του εξατμιστή ζυγίστηκε ξανά και σημειώθηκε το βάρος της. Από τη διαφορά του τελικού βάρους της φιάλης από το αρχικό είναι το συνολικό methanol extract / 0,5 g δείγματος. Ύστερα προστέθηκαν 2 ml μεθανόλης ώστε να επαναδιαλυθεί το εκχύλισμα και τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes.

➤ Μέτρηση αντιοξειδωτικών

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα που έχουν τα διαλύματα που περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH το οποίο έχει έντονο μωβ χρώμα. Η απορρόφηση πραγματοποιείται στην περιοχή του ορατού (515nm).

Υλικά και όργανα

- Διάλυμα DPPH 100 μM σε μεθανόλη
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi)
- Κυψελίδες
- Αυτόματες πιπέτες 1 ml και 200 μl – Ακρορύγχια
- Eppendorf tubes
- Vortex
- Trolox για τη καμπύλη αναφοράς
- Μεθανόλη

Πειραματική διαδικασία

Καταρχάς, σε 25 μl από το εκχύλισμα κάθε δείγματος προστέθηκαν 975 μl διαλύματος DPPH σε erpendorf tubes και το μίγμα ανακινήθηκε με vortex. Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση για χρόνο $t=0$ και για $t = 30$ min στα 515 nm. Για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Trolox και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mmol Trolox/g ξηρού βάρους. Μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου (Kalogeropoulos, et al., 2013).

4.2.4.5 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου

Στο εκχύλισμα από τις καρποφορίες μετρήθηκε ακόμα και το ολικό φαινολικό φορτίο με τη μέθοδο Folin – Ciolcateau.

Υλικά και μέθοδοι

- Αντιδραστήριο Folin – Ciolcateau (Merck)
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματες πιπέτες των 20 μl , των 100 μl και του 1 ml
- Vortex
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (Alpha – Aesar)
- Erpendorf tubes
- Γαλλικό οξύ (Aldrich)
- Φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi)

Πειραματική διαδικασία

Πρώτα, 790 μl απιονισμένο νερό και 10 μl εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε erpendorf tubes και προστέθηκαν 10 μl αντιδραστηρίου Folin – Ciolcateau. Ακολούθησε ανακίνηση σε vortex και μετά από 1 λεπτό προστέθηκε 0,15 ml Na_2CO_3 . Τα erpendorfs ανακινήθηκαν ξανά και παρέμειναν στο σκοτάδι για 2 ώρες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο στα 750 nm. Για το μηδενισμό του οργάνου ετοιμάστηκε δείγμα στο οποίο είχε αντικατασταθεί το εκχύλισμα με απιονισμένο νερό. Ακόμη, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς με γαλλικό οξύ (Kalogeropoulos, et al., 2013).

4.2.4.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνών και υδατανθράκων

Ο προσδιορισμός πρωτεϊνών και των υδατανθράκων έγινε με τη βοήθεια στοιχειακού αναλυτή Carlo Erba, EA 1108 Elemental analyzer όπου μετρήθηκε το ποσοστό αζώτου στα δείγματα καρποφοριών που είχαν προηγουμένως ξηρανθεί και κονιορτοποιηθεί.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνών υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ πρωτεΐνες} = \% \text{ αζώτου} * 4,38 (\% \text{ ξηρού βάρους})$$

Η συγκέντρωση υδατανθράκων ισούται με:

$$\% \text{ υδατάνθρακες} = 100 - (\% \text{ πρωτεϊνών} - \% \text{ λιπαρών ουσιών} - \% \text{ τέφρας}) (\% \text{ ξηρού βάρους})$$

4.3 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 19. Για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kolmogorov – Smirnov σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$. Για τις συγκρίσεις των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA και τα κριτήρια Duncan. Η μέθοδος Welch και το κριτήριο Games Howell χρησιμοποιήθηκε όταν οι πληθυσμοί εντός των ίδιων επεμβάσεων παρουσίαζαν άνισες διασπορές.

5 Αποτελέσματα

5.1 Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

5.1.1 Αποτελέσματα πρώτου πειράματος

5.1.1.1 Προσδιορισμός pH, αγωγιμότητας, ξηρής βιομάζας και αποχρωματισμού

Αφού ακολουθηθήκαν οι διαδικασίες που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα (Υλικά και Μέθοδοι) για τον προσδιορισμό του pH, της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και της μεταβολής των ολικών φαινολικών, του χρώματος και της φυτοτοξικότητας, έγινε και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

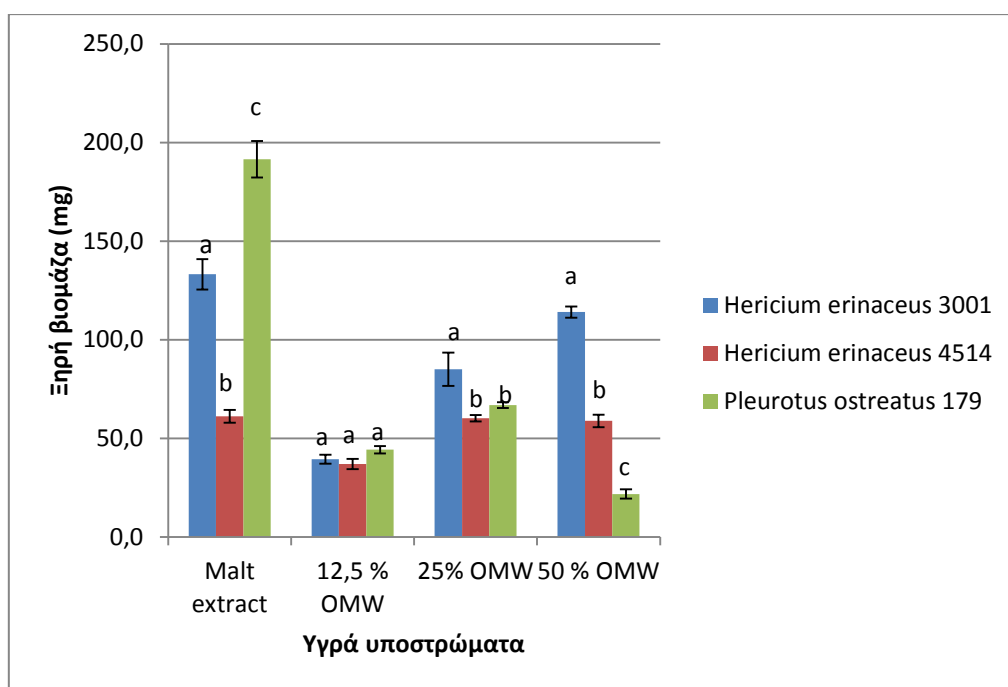
Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας (ξηρό βάρος) από τα τρία στελέχη βασιδιομυκητών σε διάφορες συγκεντρώσεις υγρού αποβλήτου ελαιολιβερίου.

Πίνακας 10: Ξηρή βιομάζα μυκηλίων (mg) από τα τρία στελέχη βασιδιομυκήτων ύστερα από επώαση 42 ημερών στους 27°C στο σκοτάδι σε υγρά υποστρώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις τριφασικού απόβλητου ελαιολιβερίου (OMW). Διαφορετικά πεζά γράμματα στη γραμμή υποδηλώνουν στατιστικών σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα ($p = 0.05$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα ανάπτυξης.

Στέλεχος	Malt extract	12,5% OMW	25% OMW	50% OMW
<i>Hericium erinaceus</i> 3001	133,20 ± 7,66 a, A *,**	39,40 ± 2,27 b, A	85,00 ± 8,25 c, A	114,00 ± 2,84 d, A
<i>Hericium erinaceus</i> 4514	61,20 ± 23,26 a, B	37,00 ± 2,65 b, A	60,20 ± 1,62 a, B	58,90 ± 3,18 a, B
<i>Pleurotus ostreatus</i> 179	191,50 ± 9,20 a, C	44,30 ± 1,88 b, A	66,90 ± 1,46 c, B	21,80 ± 2,35 d, C

Καταρχήν, τα τρία στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικές συμπεριφορές στην ανάπτυξη τους παρουσία υγρού αποβλήτου ελαιολιβερίου. Όπως ήταν αναμενόμενο στο Malt extract, που είναι και ο μάρτυρας, παρατηρείται η μεγαλύτερη ανάπτυξη μυκηλίου και στα τρία στελέχη. Ειδικά, στο *H. erinaceus* 3001 και στο *P. ostreatus* 179 παρουσιάζονται και στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις επεμβάσεις που έγιναν με τριφασικό απόβλητο ελαιολιβερίου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι επεμβάσεις με 12,5 % υγρό απόβλητο ελαιολιβερίου, όπου εμφανίζεται μειωμένη ανάπτυξη και για τα 3 στελέχη

σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις με στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1. Ακόμη, παρατηρείται αξιόλογη ανάπτυξη μυκηλίου ακόμα και στις επεμβάσεις με 50% απόβλητο, μικρότερη όμως σε σύγκριση με εκείνες με 25% OMW. Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος *H. erinaceus* 4514, που εμφανίζει αυξημένη ανάπτυξη που δε διαφέρει σημαντικά από το μαρτύρα.



Διάγραμμα 1: Βάρος ξηρής βιομάζας (g) των *H. erinaceus* 4514, *H. erinaceus* 3001, *P. ostreatus* 179 ύστερα από 42 μέρες επώασης σε διαφορετικά υγρά υποστρώματα (Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα των τριών επαναλήψεων.). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας ($\alpha = 0.05$) ανάμεσα στα στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας που εμφάνισαν τα διαφορετικά υποστρώματα μετά το τέλος του πειράματος βιοεπεξεργασίας τους με τα υπό μελέτη στελέχη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση του pH σε όλες τις επεμβάσεις και τα στελέχη από την αρχική τιμή του 5,5. Όσον αφορά την ηλεκτρική αγωγιμότητα, η ανάπτυξη του στελέχους *H. erinaceus*. 3001 αύξησε στα υποστρώματα 25% OMW και 50% OMW, ενώ στο 12,5 % OMW προκάλεσε μείωση. Το στέλεχος *H. erinaceus* 4514 αύξησε την ηλεκτρική αγωγιμότητα στο 12,5% OMW, αλλά τη μείωσε στο 25% και στο 50% OMW χωρίς να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τέλος το *P. ostreatus*. 179 μείωσε σε όλα τα υποστρώματα την ηλεκτρική αγωγιμότητα (Πίνακας 11).

5.1.1.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου

Παρατηρείται μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου σε όλες τις επεμβάσεις σε σχέση με το αρχικό με στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 11). Το *P. ostreatus* παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης (περίπου 60%). Στην επέμβαση 25% OMW τα στελέχη *H. erinaceus* μείωσαν τη συγκέντρωση φαινολικών κατά 35 – 40%, ενώ στη συγκέντρωση αποβλήτου 50% η μείωση ήταν 50% από το *H. erinaceus* 4514 και 27% από το *H. erinaceus* 3001.

5.1.1.3 Προσδιορισμός φυτοτοξικότητας

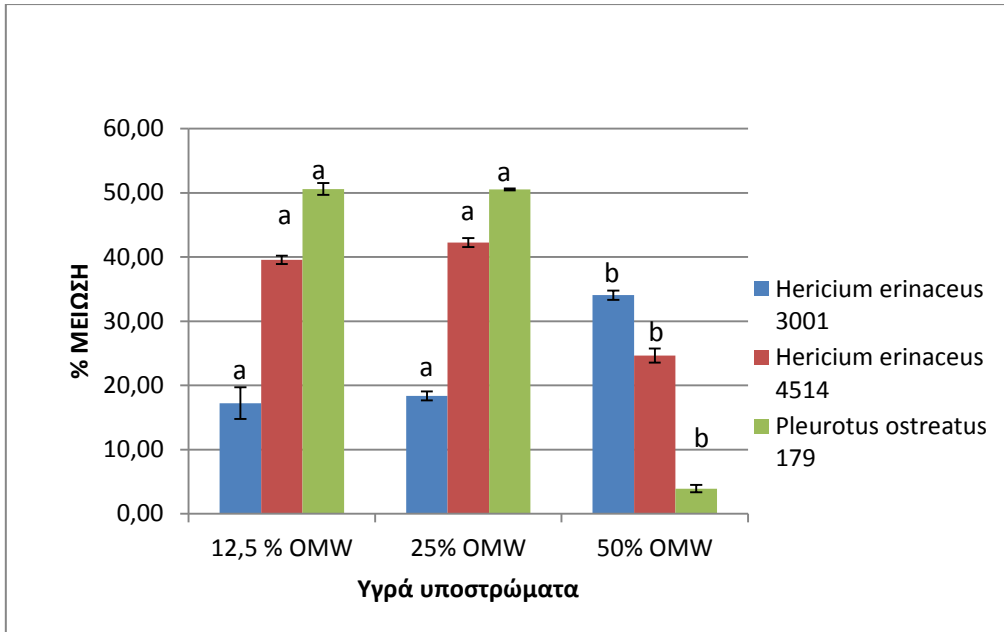
Αύξηση της βλαστικότητας των σπόρων παρατηρήθηκε στις επεμβάσεις 12,5% και 25% συγκέντρωσης υγρών αποβλήτων μετά την επεξεργασία με τα στελέχη των μυκήτων (Πίνακας 11). Ο μεγαλύτερος δείκτης βλαστικότητας (GI%) παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 12,5% OMW από το στέλεχος *H. erinaceus* 3001 (95%), ενώ στην ίδια επέμβαση τα στελέχη *P. ostreatus* 179 και *H. erinaceus* 4514 προκάλεσαν ανάλογα αποτελέσματα (60-68 %). Στις επεμβάσεις 25% OMW με τα στελέχη *H. erinaceus* 3001 και 4514, ο δείκτης βλαστικότητας ήταν 62% και 44% αντίστοιχα. Αντίθετα, το *P. ostreatus* 179 στο 25% OMW δεν αύξησε το δείκτη βλαστικότητας. Στην επέμβαση 50% OMW δε παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του δείκτη βλαστικότητας και στα τρία στελέχη.

5.1.1.4 Προσδιορισμός αποχρωματισμού

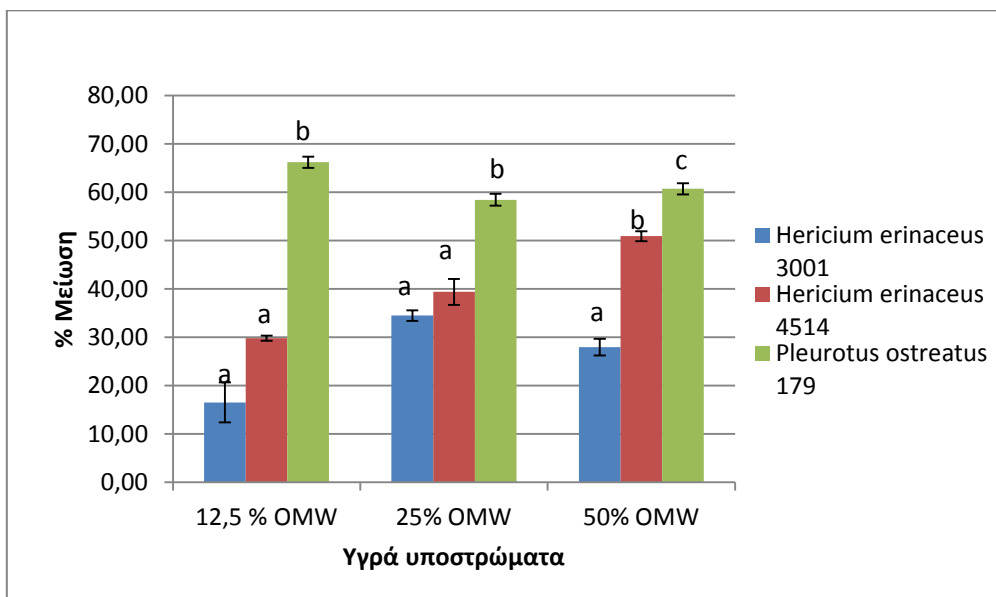
Μείωση της έντασης του χρώματος παρατηρήθηκε σε όλες τις επεμβάσεις εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 11, Διάγραμμα 2). Στις επεμβάσεις 12,5% και 25% OMW μεγαλύτερη μείωση χρώματος προκάλεσε το στέλεχος *P. ostreatus* 179 (50%), ενώ το *H. erinaceus* 3001 παρουσίασε 17-18% και το *H. erinaceus* 4514 39-42%. Στην επέμβαση (50 % OMW) το *P. ostreatus* 179 εμφάνισε μικρή μείωση (3%), ενώ τα στελέχη του είδους *H. erinaceus* 3001 και 4514 μείωσαν κατά 34 % και 24% αντίστοιχα.

Πίνακας 11: Τιμές pH, ηλεκτρικής αγωγιμότητας, έντασης χρώματος, συγκέντρωσης ολικών φαινολικών και δείκτη βλαστικότητας GI% των υγρών υποστρωμάτων πριν και μετά τον αποικισμό του από τα τρία στελέχη μυκήτων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα στη στήλη δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη και το αρχικό δείγμα σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$

Επέμβαση	Στέλεχος μύκητα	pH	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS / cm)	Ένταση χρώματος	Ολικό φαινολικό φορτίο (μg συριγγικού οξέος / ml)	Δείκτης βλαστικότητας GI%
12,5% OMW	<i>H. erinaceus</i> 3001	5,00 ± 0,04 a *	1,66 ± 0,03 a	0,26 ± 0,1 c	1850,43 ± 184,44 b	95,04 ± 0,06 a
	<i>H. erinaceus</i> 4514	4,40 ± 0,04 b	2,03 ± 0,09 b	0,16 ± 0,0 b	1555,63 ± 27,13 b	96,91 ± 0,06 a
	<i>P. ostreatus</i> 179	5,75 ± 0,03 c	1,44 ± 0,36 c	0,13 ± 0,0 a	748,78 ± 59,63 a	53,02 ± 0,08 b
	Αρχικό δείγμα	5,50 ± 0,0 d	2,06 ± 0,15 b	0,26 ± 0,0 d	2216,69 ± 13,40 c	53,25 ± 0,06 b
25% OMW	<i>H. erinaceus</i> 3001	5,40 ± 0,04 a	6,78 ± 0,09 c	0,34 ± 0,01 c	2212,22 ± 73,85 b	71,77 ± 0,03 b
	<i>H. erinaceus</i> 4514	4,85 ± 0,04 b	3,93 ± 0,69 b	0,24 ± 0,01 b	2046,96 ± 210,29 b	59,82 ± 0,10 b
	<i>P. ostreatus</i> 179	5,20 ± 0,06 c	2,76 ± 0,20 a	0,21 ± 0,0 a	1403,14 ± 82,79 a	12,28 ± 0,10 a
	Αρχικό δείγμα	5,50 ± 0,0 a	4,12 ± 0,06 b	0,42 ± 0,02 d	3378,02 ± 22,33 c	19,41 ± 0,03a
50 % OMW	<i>H. erinaceus</i> 3001	5,22 ± 0,05 a	11,50 ± 0,20 a	0,59 ± 0,01 a	3646,02 ± 173,89 c	4,81 ± 0,03 a
	<i>H. erinaceus</i> 4514	5,00 ± 0,05 b	7,73 ± 0,15 b	0,67 ± 0,02 b	2484,69 ± 117,12 b	5,08 ± 0,04 a
	<i>P. ostreatus</i> 179	5,28 ± 0,011 a	5,51 ± 0,04 c	0,85 ± 0,01 c	1988,28 ± 119,09 a	0,72 ± 0,00 a
	Αρχικό δείγμα	5,50 ± 0,0 c	6,90 ± 0,07 d	0,89 ± 0,04 c	5061,95 ± 114,17 d	2,33 ± 0,00 a



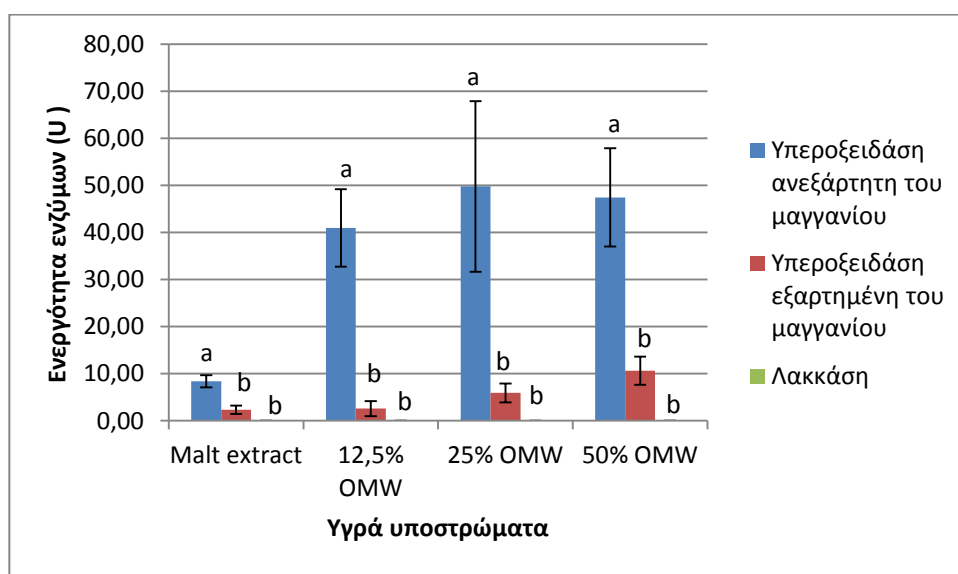
Διάγραμμα 2: Μείωση έντασης χρώματος (%) στα υγρά υποστρώματα μετά τον αποικισμό τους από τα τρία στελέχη μυκήτων (σε σχέση με το αρχικό απόβλητο). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας ($\alpha = 0.05$) ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα



Διάγραμμα 3: % Μείωση ολικού φαινολικού φορτίου των υγρών υποστρωμάτων μετά τον αποικισμό τους από μύκητες. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας ($\alpha = 0.05$) ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα

5.1.1.5 Προσδιορισμός ενεργότητας των ενζύμων λακκάση, και υπεροξειδάσης ανεξάρτητης και εξαρτημένης του μαγγανίου

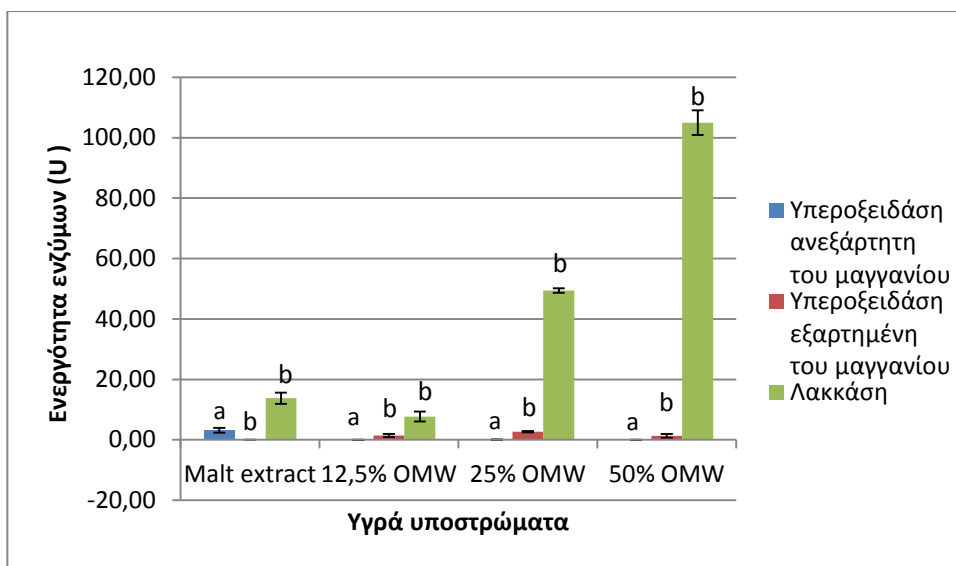
Μετρήθηκαν ενεργότητες για τα ένζυμα λακκάση, υπεροξειδάση εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου, ενώ δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα για τα ένζυμα οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης και υπεροξειδάση της λιγνίνης.



Διάγραμμα 4: Ενεργότητα (U) των τριών υπό μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και σε Malt extract ύστερα από επεξεργασία με το στέλεχος *Hericium erinaceus* 3001. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα.

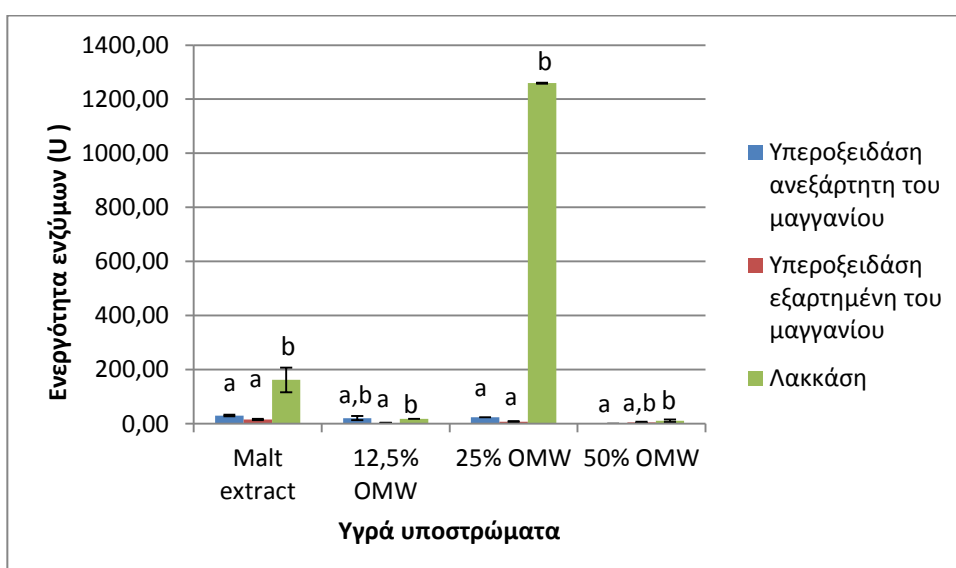
Ειδικά όσον αφορά το στέλεχος *Hericium erinaceus* 3001, εμφάνισε αυξημένη ενεργότητα της υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου (40 -49 U) στα υποστρώματα με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα (Διάγραμμα 4). Χαμηλότερη ήταν η ενεργότητα της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης, ενώ η ενεργότητα της λακκάσης ήταν μηδενική. Ακόμη παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι η ενεργότητα των ενζύμων στο υπόστρωμα Malt extract ήταν από ελάχιστη έως μηδενική.

Το στέλεχος *H. erinaceus* 4514 εμφάνισε τη μεγαλύτερη ενεργότητα ενζύμου λακκάσης σε όλα τα υποστρώματα σε σχέση με το στέλεχος *H. erinaceus* 3001 με στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 12, Διάγραμμα 5). Ειδικότερα, στο υπόστρωμα 50%OMW η ενεργότητα της λακκάσης ήταν 104 U, ενώ (μικρή) ενεργότητα υπήρξε ακόμα και στο Malt extract. Τα υπόλοιπα ένζυμα εμφάνισαν χαμηλή έως μηδενική ενεργότητα.



Διάγραμμα 5: Ενεργότητα (U) των τριών υπό μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και σε Malt extract ύστερα από επεξεργασία με το στέλεχος *Hericium erinaceus* 4514. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα

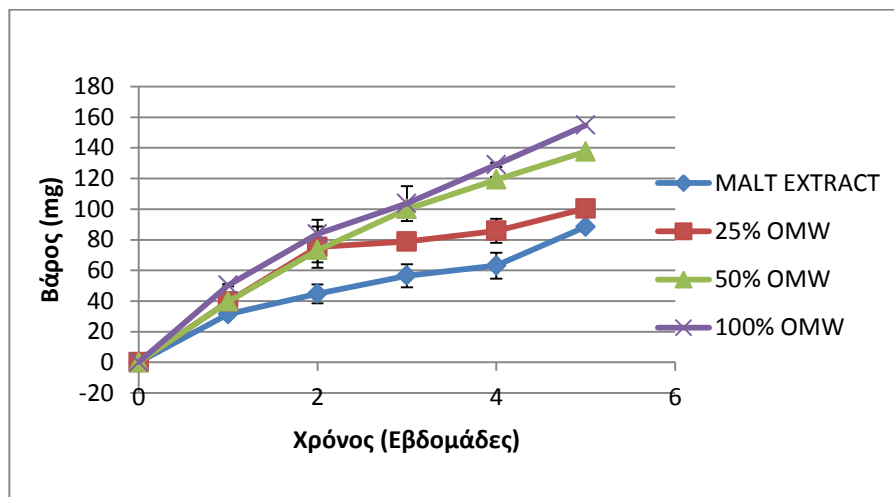
Για το στέλεχος *P. ostreatus* 179, παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα ενζύμου της λακκάσης στο υπόστρωμα με 25% OMW (1100 U) (Πίνακας 12, Διάγραμμα 4). Τα υπόλοιπα ένζυμα εμφάνισαν χαμηλή ενεργότητα εμφανίζοντας και στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 6: Ενεργότητα (U) των τριών υπό μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και σε Malt extract ύστερα από επεξεργασία με το στέλεχος *Pleurotus ostreatus* 179. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα

5.1.2 Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος καλλιέργειας σε υγρά υποστρώματα

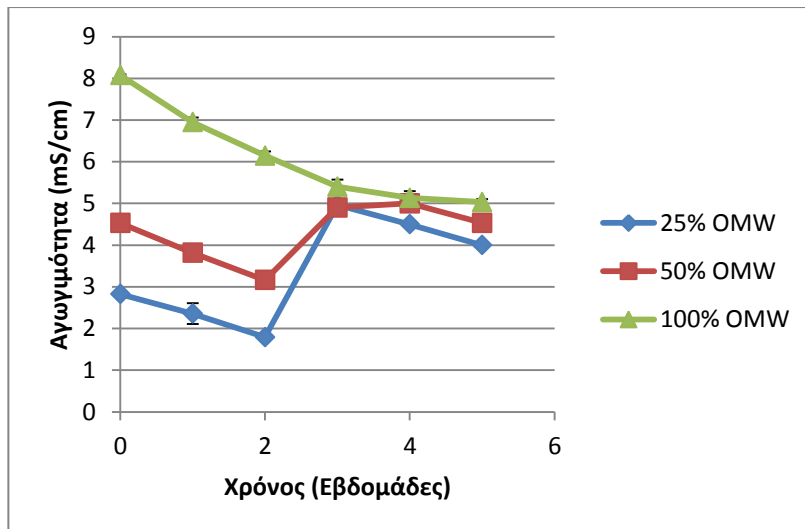
5.1.2.1 Προσδιορισμός pH, αγωγιμότητας και ξηρής βιομάζας



Διάγραμμα 7: Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας σε σχέση με το χρόνο του *H. erinaceus* 4514. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

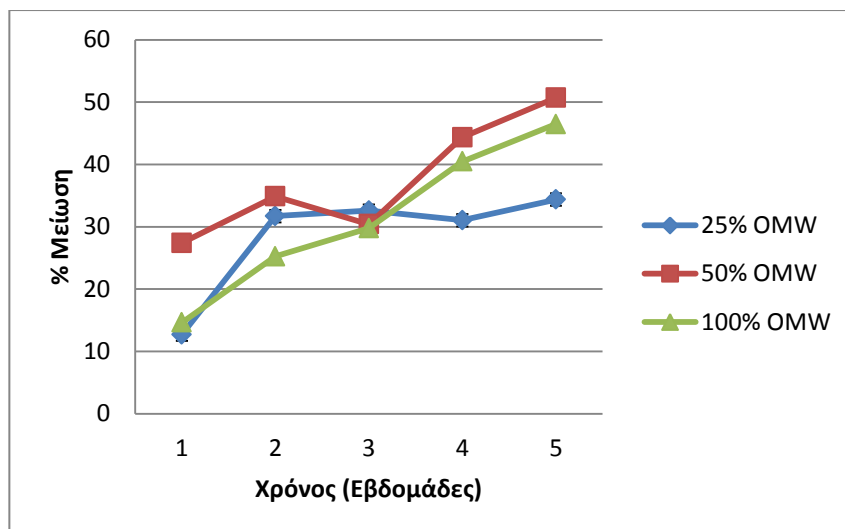
Αφού ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι, στο Διάγραμμα 7 και τον Πίνακα 12 φαίνονται τα αποτελέσματα για κάθε εβδομάδα του στελέχους *Hericiium erinaceus* 4514. Παρατηρούμε ότι στις επεμβάσεις με τα υγρά απόβλητο ελαιοτριβείου υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με το Malt extract. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση αποβλήτου στο υγρό υπόστρωμα τόσο αυξάνεται και η παραγωγή μυκηλίου, ξεπερνώντας ακόμα και την παραγωγή βιομάζας στο Malt extract. Στο υπόστρωμα με 100% απόβλητο ελαιοτριβείου εμφανίστηκε η μέγιστη τιμή (154,8 mg).

Ακόμη, εμφανής είναι η μείωση του pH που προκαλεί η ανάπτυξη του στελέχους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με το αρχικό που ήταν ρυθμισμένο στο 5,5 (Πίνακας 12). Με την αύξηση της συγκέντρωσης αποβλήτου στο υπόστρωμα παρατηρείται ότι το pH μειώνεται με την αύξηση του μύκητα. Στο υγρό υπόστρωμα με 25% συγκέντρωση αποβλήτου εμφάνισε 4,0 – 4,97, στο 25% OMW 4,9 – 5,03, και στο 100% OMW 5,3 – 5,10. Όσον αφορά την αγωγιμότητα, οι τιμές ανά εβδομάδα εμφανίζουν σύγκλιση προς την ολοκλήρωση της καλλιέργειας (5,03 mS/cm) έχοντας ξεκινήσει από αρκετά διαφορετικές 2,8, 4,52 και 8,07 (mS/cm) για τα υποστρώματα 25%, 50% και 100% απόβλητο αντίστοιχα (Διάγραμμα 8, Πίνακας 12).



Διάγραμμα 8: Προσδιορισμός αγωγιμότητας για κάθε εβδομάδα μετά τον αποικισμό από το *H. erinaceus* 4514. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων.

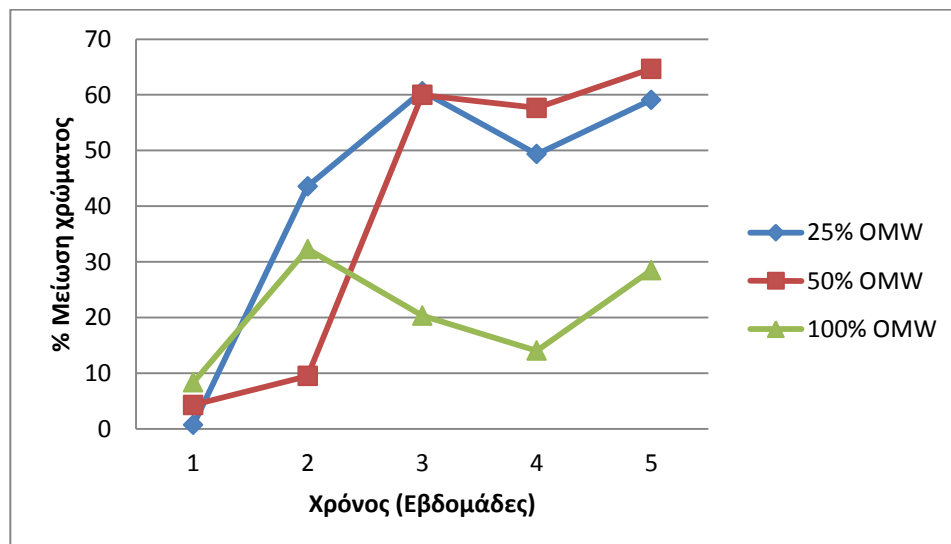
5.1.2.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών



Διάγραμμα 9: Μείωση ολικών φαινολικών (%) από τον *H. erinaceus* 4514 μετά την ανάπτυξη του σε διάφορα υποστρώματα κατά τη διάρκεια διαστήματος 5 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων.

Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα ολικά φαινολικά των υγρών υποστρωμάτων που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 9, Πίνακας 12). Η μεγαλύτερη μείωση φαινολικού φορτίου εμφανίστηκε στο 50% OMW, ενώ στο 25% OMW, υπήρξε αρχικά σημαντική μείωση (2^η εβδομάδα, \approx 31%) και έπειτα το ποσοστό μείωσης παρέμεινε σταθερό. Ακόμη παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό μείωσης στο υπόστρωμα με 100% απόβλητο (50%). Με

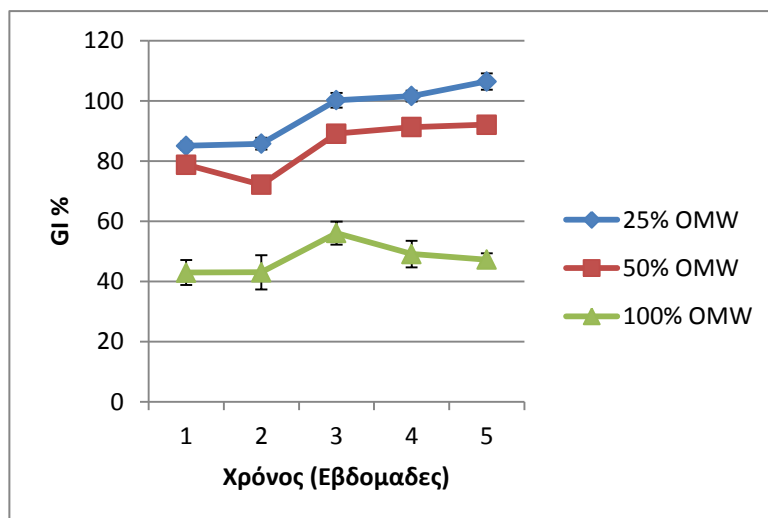
την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη του στελέχους το ποσοστό της μείωσης των φαινολικών αυξάνεται.



Διάγραμμα 10: Μείωση έντασης χρώματος (%) από τον *H. erinaceus* 4514 μετά την ανάπτυξη του σε διάφορα υποστρώματα κατά τη διάρκεια διαστήματος 5 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων.

Αρχικά και τα τρία υγρά υποστρώματα παρατηρήθηκε μείωση της έντασης του χρώματος έως 60% (Διάγραμμα 10, Πίνακας 12). Μετά την 3^η εβδομάδα ο αποχρωματισμός σταθεροποιήθηκε, ενώ κατά την 4^η εβδομάδα εμφανίστηκε μικρή αύξηση στην ένταση του χρώματος. Χαμηλό ποσοστό μείωσης της έντασης του χρώματος συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα εμφάνισε το 100% απόβλητο ελαιотριβείου (28%), ενώ παρουσίασε και το χαμηλότερο ποσοστό αύξησης κατά την 4^η εβδομάδα 14%. Το μέγιστο παρατηρήθηκε κατά την 5^η εβδομάδα (64%) στο υπόστρωμα με 50% απόβλητο ελαιотριβείου.

5.1.2.3 Προσδιορισμός δείκτη βλαστικότητας



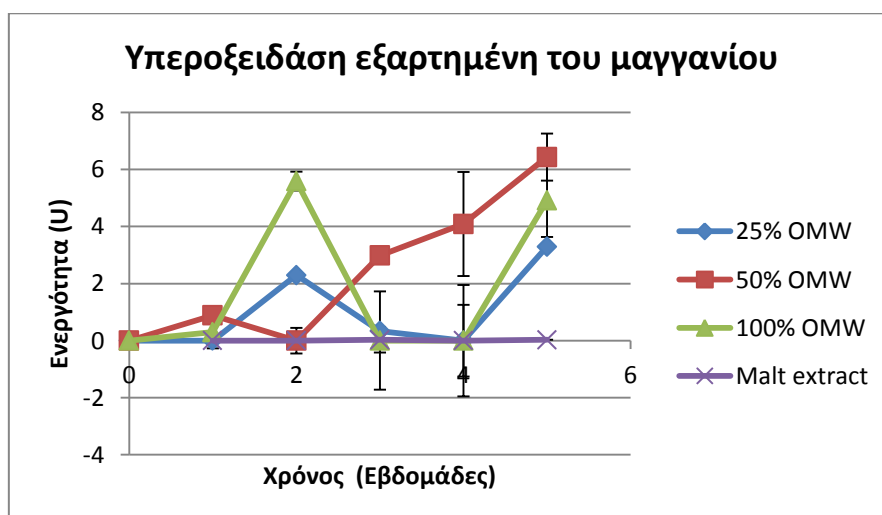
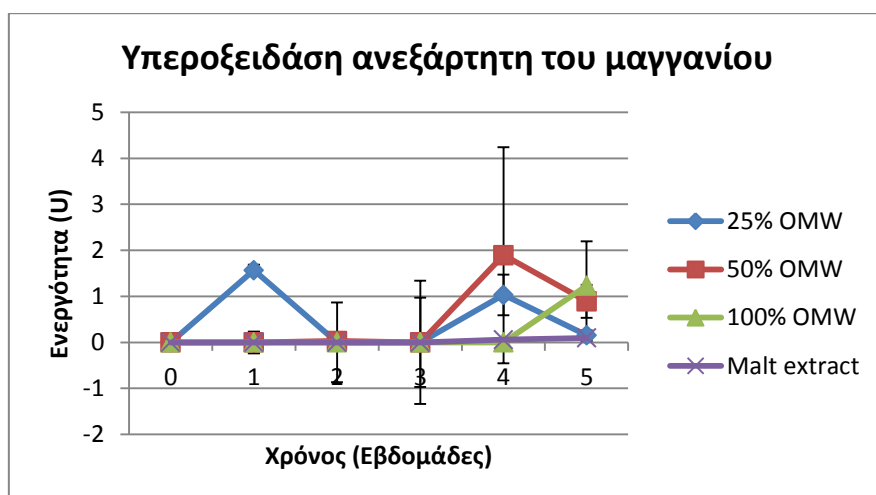
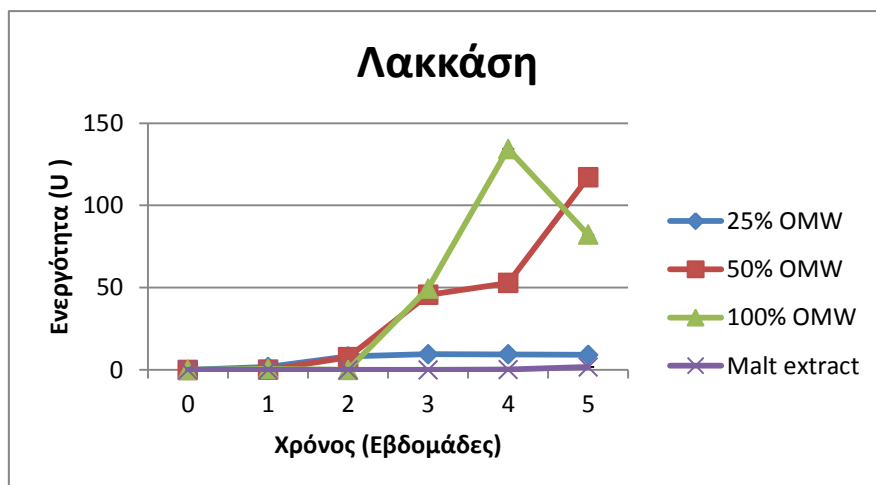
Διάγραμμα 11: Δείκτης βλαστικότητας GI% όπως μετρήθηκε σε διάφορα υποστρώματα κατά τη διάρκεια διαστήματος 5 εβδομάδων επώασης με τον *H. erinaceus* 4514. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

Σταδιακή αύξηση του δείκτη βλαστικότητας παρατηρήθηκε στο διάστημα των πέντε εβδομάδων (Διάγραμμα 11, Πίνακας 12). Μικρότερο δείκτη βλαστικότητας εμφάνισε το υπόστρωμα με 100% OMW λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης αποβλήτου, ενώ η αύξηση της βλαστικότητας ήταν εξαιρετικά μεγάλη στο 25% OMW. Συγκριτικά, η αύξηση του δείκτη βλαστικότητας ήταν μεγαλύτερη στα υποστρώματα με 25 και 50% υγρό απόβλητο.

Πίνακας 12 Ξηρή βιομάζα (mg) του μύκητα *H. erinaceus* 4514 και μεταβολές pH, της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (mS/cm), της έντασης χρώματος των υγρών υποστρωμάτων και των ολικών φαινολικών (μg συριγγικού οξέος / ml), όπως μετρήθηκαν ανά εβδομάδα σε πέντε χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής αύξησης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα στις τιμές κάθε στήλης δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα.

Χρόνος (Εβδομάδες)	Υποστρώματα	Ξηρή βιομάζα (mg)	pH	Αγωγιμότητα (mS/cm)		Ένταση χρώματος		Ολικά φαινολικά (μg συριγγικού οξέος/ml)	
				Επεξεργασμένο δείγμα	Αρχικό δείγμα	Επεξεργασμένο δείγμα	Αρχικό δείγμα	Επεξεργασμένο δείγμα	Αρχικό δείγμα
1 ^η εβδομάδα	25% OMW	39,65 ± 0,85 a	4,97 ± 0,03 a	2,36 ± 0,25 a	2,03 ± 0,23 a	0,235 ± 0,0	0,324 ± 0,06	2352,2 ± 129,0	2650,0 ± 56,5
	50% OMW	39,65 ± 0,85 a	5,03 ± 0,03 a	3,82 ± 0,05 b	4,29 ± 0,08 b	0,368 ± 0,01	0,423 ± 0,01	3007,3 ± 277,0	3967,6 ± 17,6
	100% OMW	50,28 ± 4,61 b	5,10 ± 0,0 b	6,95 ± 0,12 c	7,14 ± 0,03 c	0,611 ± 0,03	0,665 ± 0,02	5175,1 ± 119,6	5359,7 ± 205,9
	Malt extract	31,34 ± 1,54 a							
2 ^η εβδομάδα	25% OMW	75,22 ± 2,96 a	4,97 ± 0,06 a	1,79 ± 0,04 a	1,96 ± 0,03 a	0,133 ± 0,01	0,255 ± 0,0	1840,0 ± 117,3	2243,5 ± 166,4
	50% OMW	73,31 ± 1,91 a	4,9 ± 0,0 a, b	3,16 ± 0,08 b	3,58 ± 0,03 b	0,348 ± 0,01	0,351 ± 0,01	2697,6 ± 406,2	3495,6 ± 206,6
	100% OMW	83,80 ± 0,71 b	5,4 ± 0,05 b	6,15 ± 0,1 c	6,85 ± 0,11 c	0,451 ± 0,03	0,530 ± 0,0	4531,9 ± 59,6	5925,5 ± 259,6
	Malt extract	42,79 ± 5,53 c							
3 ^η εβδομάδα	25% OMW	78,76 ± 13,48 a, b	4,9 ± 0,0 a	1,89 ± 0,06 a	1,9 ± 0,05 a	0,093 ± 0,0	0,242 ± 0,01	1816,2 ± 101,8	2645,5 ± 145,0
	50% OMW	100,02 ± 8,07 b	4,9 ± 0,0 a	3,49 ± 0,09 b	3,69 ± 0,07 b	0,154 ± 0,01	0,381 ± 0,03	2882,2 ± 409,9	3806,8 ± 307,1
	100% OMW	103,69 ± 9,27 b	5,4 ± 0,05 a	6,65 ± 0,17 c	6,84 ± 0,15 c	0,531 ± 0,04	0,711 ± 0,01	4258,0 ± 338,2	6303,7 ± 218,7
	Malt extract	56,55 ± 6,08 a							
4 ^η εβδομάδα	25% OMW	85,85 ± 1,89 a	4,5 ± 0,0 a	2,03 ± 0,02 a	2,31 ± 0,05 a	0,120 ± 0,01	0,251 ± 0,0	1857,7 ± 5,6	2967,0 ± 142,2
	50% OMW	119,23 ± 3,66 b	5,0 ± 0,3 b	3,76 ± 0,03 b	4,38 ± 0,10 b	163 ± 0,0	0,416 ± 0,03	2304,5 ± 15,6	4436,6 ± 51,7
	100% OMW	128,91 ± 11,41 b	5,13 ± 0,03 c	6,88 ± 0,16 c	7,90 ± 0,0 c	0,573 ± 0,03	0,733 ± 0,01	3608,8 ± 41,6	6616,3 ± 33,4
	Malt extract	63,09 ± 7,53 a							
5 ^η εβδομάδα	25% OMW	100,29 ± 7,76 a	4,0 ± 0,0 a	2,37 ± 0,05 a	2,54 ± 0,04 a	0,285 ± 0,01	0,097 ± 0,0	1768,5 ± 119,1	2694,6 ± 77,8
	50% OMW	137,49 ± 1,91 b	4,53 ± 0,03 a	4,05 ± 0,01 b	4,7 ± 0,02 b	0,480 ± 0,01	0,136 ± 0,0	2042,4 ± 10,2	4110,5 ± 288,1
	100% OMW	154,80 ± 1,36 b	5,03 ± 0,03 a	8,45 ± 0,07 c	9,55 ± 0,47 c	0,812 ± 0,02	0,477 ± 0,0	3245,5 ± 101,7	6308,1 ± 145,24
	Malt extract	88,44 ± 8,45 a							

5.1.2.4 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων



Διάγραμμα 12 έως 14: Ενεργότητα (U) των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση ανεξάρτητης και εξαρτημένης του μαγγανίου όπως προσδιορίστηκαν σε διάφορα υποστρώματα κατά τη διάρκεια διαστήματος 5 εβδομάδων επώασης με τον *H. erinaceus* 4514. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ενεργότητα των ενζύμων που παρήχθησαν από το στέλεχος *H. erinaceus* 4514 (Διάγραμμα 12 -14). Μεταβολές στις ενεργότητες παρατηρούνται κατά τη διάρκεια των πέντε εβδομάδων του πειράματος για κάθε ένζυμο. Η λακκάση αρχικά έχει χαμηλή ενεργότητα (1,71 – 8,78 U) και αυξάνεται αρκετά την 3^η και 4^η εβδομάδα στα υποστρώματα με 50% OMW και 100% OMW (45,59 – 134,27 U). Η υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου εμφανίζεται τη 2η εβδομάδα στο 25% OMW και μετά την 3η εβδομάδα στα άλλα δύο υποστρώματα με βάση το απόβλητο ελαιοτριβείου (μεγαλύτερη ενεργότητα παρουσίασε στο υπόστρωμα 50% OMW την 4^η εβδομάδα καλλιέργειας 1,89 U). Στο 25% απόβλητο παρουσιάζεται μόνο την 2^η και την 4^η εβδομάδα, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα υποστρώματα που εμφανίζεται την 4^η εβδομάδα και διατηρείται έως την 5^η. Η εξαρτημένη του μαγγανίου υπεροξειδάση παρουσίασε υψηλότερες τιμές ενεργότητας σε σχέση με την ανεξάρτητη του μαγγανίου υπεροξειδάση και οι τιμές έφθασαν σε μέγιστα την 5^η εβδομάδα (6,43 U). Στο 25% και 50% απόβλητο ελαιοτριβείου, αυξάνεται στις πρώτες και έπειτα στην 5^η εβδομάδα. Αντίθετα στο 100% απόβλητο αυξάνεται σταδιακά σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

5.2 Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα

5.2.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα ('race tubes')

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για τα στελέχη *Hericium erinaceus* 3001, 4514 και *Pleurotus ostreatus* 179 έτσι ώστε να μετρηθεί ο ρυθμός της μυκηλιακής ανάπτυξης τους σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα και να αξιολογηθεί η καταλληλότητα των τελευταίων για την καλλιέργεια μανιταριών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 13 και 14. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες ήταν το άχυρο σίτου (WS) και το πριονίδι οξιάς (BS).

Πίνακας 13: Ρυθμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης μυκηλίου *Pleurotus ostreatus* 179 (mm/day) σε διάφορα υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο (WS), φύλλα ελιάς (OLV) και διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (TPOMW) ('race tubes'). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα στη στήλη δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα

Υποστρώματα	Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm/day)
WS 100%	1,93 ± 0,10 c
WS + 25% TPOMW	1,57 ± 0,06 b, c
WS + 50% TPOMW	1,49 ± 0,04 b, c
WS + 25% OLV	1,84 ± 0,07 c
WS + 50% OLV	1,52 ± 0,15 b, c
WS + 75% OLV	1,84 ± 0,07 b, c
OLV 100%	1,48 ± 0,02 b, c
OLV + 25% TPOMW	1,08 ± 0,38 a, b
OLV + 50% TPOMW	0,59 ± 0,30 a

Το στέλεχος *P. ostreatus* 179 παρουσίασε αξιόλογο ρυθμό ανάπτυξης ($1,84 \pm 0,07$ mm/day) στο υπόστρωμα WS + 75% OLV που δε διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα που είναι και το σύννηθες υπόστρωμα καλλιέργειας για το γένος (Πίνακας 13). Υψηλό ρυθμό ανάπτυξης εμφάνισε και στα υποστρώματα που είναι μίγματα με διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου

(0,59 - 1,57 mm/day). Ο ρυθμός ανάπτυξης στα υποστρώματα με φύλλα ελιάς ήταν μειωμένος σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά δε διέφερε στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 14: Ρυθμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης μυκηλίων των στελεχών *Hericium erinaceus* 4514 και 3001 (mm/day) σε διάφορα υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδι (BS), κλαδέματα ελιάς (OLPR) και διφασικό απόβλητο ελαιολιτριβείου (TPOMW) ('race tubes'). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα στη στήλη δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα.

Υποστρώματα	Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm/day)	
	<i>Hericium erinaceus</i> 4514	<i>Hericium erinaceus</i> 3001
BS 100%	1,48 ± 0,04 d	1,93 ± 0,01 c
BS + 25% TPOMW	1,24 ± 0,03 d	1,57 ± 0,06 b, c
BS + 50% TPOMW	1,15 ± 0,02 d	1,49 ± 0,04 b, c
BS + 25% OLPR	0,5 ± 0,17 b, c	1,84 ± 0,07 c
BS + 50% OLPR	0,64 ± 0,05 c	1,52 ± 0,15b, c
BS + 75% OLPR	0,71 ± 0,02 c	1,38 ± 0,04 b, c
OLPR 100%	0,0 ± 0,0 a	1,48 ± 0,02 b, c
OLPR + 25% TPOMW	0,63 ± 0,16 c	1,08 ± 0,38 a, b
OLPR + 50% TPOMW	0,20 ± 0,03 a, b	0,59 ± 0,04 a

Τα στελέχη του είδους *H. erinaceus* δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα υποστρώματα με διφασικό απόβλητο ελαιολιτριβείου (Πίνακας 14). Μικρή ανάπτυξη εμφάνισε το στέλεχος 4514 στα υποστρώματα με κλαδέματα ελιάς, σε αντίθεση με το 3001 που αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά στα διάφορα μείγματα.

5.2.2 Καλλιέργεια μανιταριών

Η καλλιέργεια μανιταριών του γένους *Hericium erinaceus* έγινε με το στέλεχος 4514 το υπόστρωμα περιείχε κλαδέματα ελιάς σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα για την παραγωγή των καρποφοριών, την πρωιμότητα και την βιολογική αποδοτικότητα εμφανίζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Διάρκεια επώασης (ημέρες), πρωιμότητα (ημέρες), παραγωγή σε μανιτάρια (g) και βιολογική αποδοτικότητα του στελέχους *Hericium erinaceus* 4514 σε διάφορα υποστρώματα καλλιέργειας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα δεξιά των τιμών κάθε στήλης δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα

Στερεά υποστρώματα	Διάρκεια επώασης (ημέρες)	Πρωιμότητα (ημέρες)	Απόδοση (g)	Βιολογική αποδοτικότητα (g/kg ξηρού βάρους υποστρώματος)
BS 100%	28,00 ± 0,00 a	15,00 ± 4,04 a	20,82 ± 0,63 a	59,60 ± 1,80 a
BS + 25% OLPR	28,00 ± 0,00 a	10,00 ± 1,00 a	22,53 ± 0,49 a	64,44 ± 1,39 a
BS + 50% OLPR	29,33 ± 0,66 a	12,33 ± 1,45 a	19,47 ± 2,44 a	53,79 ± 3,56 a
BS +75 % OLPR	29,00 ± 0,58 a	12,33 ± 1,20 a	19,70 ± 30,19 b	242,85 ± 4,62 b
OLPR 100%	29,00 ± 0,58 a	14,00 ± 1,52 a	73,12 ± 9,51 b	308,33 ± 27,11 b

Στην καλλιέργεια μανιταριών αξιολογήθηκε η απόδοση σε βάρος, η πρωιμότητα και η βιολογική αποδοτικότητα. Στην διάρκεια επώασης και στην πρωιμότητα, οι διαφορές που εμφάνισαν τα διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας ήταν μικρές και όχι στατιστικά σημαντικές. Η πρωιμότητα είχε 10 – 15 ημέρες διάρκεια και η διάρκεια επώασης 28 ημέρες. Αντίθετα, όσον αφορά την απόδοση και την βιολογική αποδοτικότητα τα κλαδέματα ελιάς στο υπόστρωμα αύξησαν σημαντικά την παραγωγή σε σχέση με το σύνηθες υπόστρωμα καλλιέργειας με στατιστικά σημαντικές διαφορές στα υποστρώματα με 75% κλαδέματα ελιάς και 100% κλαδέματα ελιάς (Πίνακας 15). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παράμετρος της βιολογικής αποδοτικότητας εμφανίζοντας τιμές 242,85 και 308,33 (g/kg ξηρού βάρους υποστρώματος) στα υποστρώματα με 75% και 100% κλαδέματα ελιάς αντίστοιχα. Στο υπόστρωμα με 75% κλαδέματα ενώ στην απόδοση δε παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα, η βιολογική αποδοτικότητα αυξήθηκε αρκετά.



Εικόνα 19: Καρποφορίες του στελέχους *H. erinaceus* 4514 (Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας)

5.2.3 Ανάλυση σύστασης καρποφοριών

Η τέφρα αντιπροσωπεύει τα ανόργανα συστατικά των μανιταριών και κυρίως τα μέταλλα που περιέχονται στη σύστασή τους. Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των επιλεγμένων διατροφικών χαρακτηριστικών των καρποφοριών που παρήχθησαν από διάφορα υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε το στέλεχος *Hericium erinaceus* 4514.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα προσδιορισμού τέφρας, λιπαρών ουσιών, ολικών ινωδών, αντιοξειδωτικών, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και ολικών φαινολικών που μετρήθηκαν σε μανιτάρια *Hericium erinaceus* 4514 προερχόμενα από διάφορα υποστρώματα καλλιέργειας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους και τυπικά σφάλματα των μέσων. Διαφορετικά γράμματα στα δεξιά των τιμών κάθε στήλης δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας.

Υποστρώματα καλλιέργειας	Τέφρα (% ξηρού βάρους)	Λιπαρές Ουσίες (% ξηρού βάρους)	Ολικές ινώδεις (%)	Ολικά φαινολικά (mg γαλλικού οξέος / g ξηρού βάρους)	Πρωτεΐνες(% ξηρού βάρους)	Υδατάνθρακες (% ξηρού βάρους)	Αντιοξειδωτικά (mmol TE / g ξηρού Βάρους)
BS 100%	9,19 ± 0,23 a	1,56 ± 0,24 a	5,98 ± 0,25 a	10848,70 ± 4,93 a	28,68 ± 2,72 a	60,56 ± 2,99 a	1,39 ± 0,00 a
BS + 25% OLPR	9,43 ± 0,59 a	1,57 ± 0,12 a	6,78 ± 0,26 b	10841,45 ± 2,44 a	24,74 ± 1,41 a	64,25 ± 1,78 a	1,49 ± 0,01 a, b
BS + 50% OLPR	8,63 ± 0,59 a	2,19 ± 0,12 a	4,88 ± 1,39 a	10841,77 ± 3,65 a	27,79 ± 0,12 a	60,39 ± 0,77a	0,90 ± 0,31 b
BS + 75% OLPR	9,78 ± 0,50 a	2,33 ± 0,18 b	5,12 ± 0,78 a	10844,55 ± 1,60 a	25,65 ± 3,33 a	62,22 ± 0,77 a	1,81 ± 0,10 a, b
OLPR 100%	7,92 ± 0,29 a	2,78 ± 0,28 b	5,59 ± 0,62 a	10847,32 ± 4,53 a	26,16 ± 1,82 a	63,14 ± 1,64 a	1,36 ± 0,05 a

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατηρούμε ότι η αντικατάσταση στο υπόστρωμα του πριονιδιού οξιάς με τα κλαδέματα ελιάς δεν επηρέασαν κανένα από τα διατροφικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν.

Το ποσοστό της τέφρας που παρουσιάζουν οι καρποφορίες κυμάνθηκε από 7.92 – 9.43 % ξηρού βάρους, χωρίς να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα (Πίνακας 16).

Παρόμοια είναι και η εικόνα από τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών, Το φαινολικό φορτίο κυμαίνεται από 10841,45- 10848,7 mg γαλλικού οξέος / g ξηρού βάρους και δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με το υπόστρωμα καλλιέργειας, αλλά υποδεικνύει μια μικρή αύξηση με την αύξηση του ποσοστού των κλαδεμάτων ελιάς στο υπόστρωμα (Πίνακας 16).

Αντίθετα, το υπόστρωμα καλλιέργειας επηρεάζει το ποσοστό λιπαρών ουσιών που περιέχουν οι καρποφορίες. Η αύξηση του ποσοστού των κλαδεμάτων ελιάς προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπαρά. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζουν οι επεμβάσεις με 75% κλαδέματα ($2,33 \pm 0,29$) και 100% κλαδέματα ελιάς ($2,78 \pm 0,28$).

Η περιεκτικότητα σε ολικές ινώδεις είναι 4,88 -6,78%, με μεγαλύτερη τιμή στο υπόστρωμα με 25% κλαδέματα ελιάς. Στα υπόλοιπα υποστρώματα ενώ εμφανίζει αύξηση με την αύξηση των κλαδεμάτων ελιάς, οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Για τη συγκέντρωση υδατανθράκων παρατηρήθηκαν τιμές 60,56-64,25 % ξηρού βάρους χωρίς να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις. Παράλληλα, το ποσοστό των πρωτεϊνών ήταν 24,74 - 28,68% ξηρού βάρους και πάλι χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 17).

Η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ήταν αυξημένη στο υπόστρωμα BS + OLPR 75% ($1,81 \pm 0,10$ mmol TE / g ξηρού βάρους) και η μικρότερη τιμή παρατηρήθηκε στο BS + 50% OLPR ($0,90 \pm 0,31$ mmol TE / g ξηρού βάρους) (Πίνακας 16). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα υποστρώματα BS 100%, BS + 25% OLPR, BS + 75% OLPR, OLPR 100%.

6 Συζήτηση

6.1 Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

Σκοπός της δοκιμής ήταν να αξιολογηθεί η ανάπτυξη στελεχών βασιδιομυκήτων σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και οι μεταβολές που προκλήθηκαν στις ιδιότητες του υποστρώματος.

Αρκετές εργασίες έχουν γίνει για τη μελέτη της συμπεριφοράς στελεχών βασιδιομυκήτων (στελέχη του γένους *Pleurotus* και άλλα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης) παρουσία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου με ενδιαφέροντα αποτελέσματα (Ntougias, et al., 2012; Kissi, et al., 2001; Fountoulakis, et al., 2002). Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η παραγωγή βιομάζας από διαφορετικά στελέχη βασιδιομυκήτων ήταν αυξημένη στο Malt Extract σε σχέση με τα υποστρώματα από απόβλητο ελαιουργείων. Ειδικότερα, όσον αφορά τα υποστρώματα καλλιέργειας με απόβλητο παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης αποβλήτου, αυξάνεται και η παραγωγή βιομάζας από τα στελέχη του γένους *Hericium*, λόγω της αύξησης θρεπτικών συστατικών, σε αντίθεση με το *Pleurotus ostreatus* που η αυξανόμενη συγκέντρωση αποβλήτου παρεμποδίζει την ανάπτυξη του.

Σε προηγούμενες εργασίες έχει παρατηρηθεί μείωση του pH με την καλλιέργεια στελεχών του γένους *Pleurotus ostreatus*, αύξηση από τα στελέχη *Ganoderma australe* και *Ganoderma carnosum* και μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Ntougias, et al., 2012). Αντίστοιχη αύξηση του pH έχει καταγραφεί και στην καλλιέργεια του *Pleurotus sajor-caju* (Yesilada, et al., 1999). Σε αντίθεση κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε μείωση του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σε όλες τις επεμβάσεις τόσο από το *Pleurotus ostreatus* 179 όσο και από το *Hericium erinaceus* 3001, όχι όμως για το στέλεχος 4514 που παρατηρήθηκε μείωση αλλά χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Υψηλότερες τιμές στη μείωση της έντασης χρώματος καταγράφηκαν σε μελέτες που έγιναν με τα στελέχη *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju* και από τα ξυλοσηπτικά στελέχη *Ganoderma* σε σχέση με τα ποσοστά που παρατηρήθηκαν στην εργασία αυτή τόσο για το *P. ostreatus* 179, όσο και για τα *Hericium erinaceus* 3001 και 4514 (Ntougias, et al., 2012; Yesilada, et al., 1999; Kissi, et al., 2001; Matos, et al., 2007). Μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης χρώματος εμφάνισε το *P. ostreatus* στο 50% OMW. Παράλληλα παρατηρείται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ανάπτυξη των στελεχών στο

υπόστρωμα καλλιέργειας τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό μείωσης της έντασης χρώματος.

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού των φαινολικών και του ποσοστού μείωσης τους λόγω ανάπτυξης των στελεχών που εξετάστηκαν δεν διαφέρουν πολύ από τα αποτελέσματα των εργασιών που έχουν γίνει μέχρι τώρα. Οι Yesalida *et al.* (1999) κατέγραψαν ποσοστό μείωσης 60% από το στέλεχος *Pleurotus sajor-caju* και 35-45% από τα *Pleurotus ostreatus* και *Phanerochaete chrysosporium*. Επίσης, παρόμοια ποσοστά με την παρούσα μελέτη παρουσίασαν οι Ntougias *et al* (2012) στο υπόστρωμα με 25% υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου, δηλαδή της τάξεως 55-60% περίπου. Εξαιρετικά υψηλό ποσοστό μείωσης παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Ganoderma applanatum* (94%) σε υγρές καλλιέργειες με 20% συγκέντρωση αποβλήτου (Matos, *et al.*, 2007).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης φαινολικών του αποβλήτου (50%) από το στέλεχος *P. ostreatus* 179 στις επεμβάσεις 12.5% και 25% OMW . Στην επέμβαση 50% OMW το ποσοστό ήταν χαμηλότερο λόγω της μειωμένης ανάπτυξης του μύκητα. Αντίθετα, το στέλεχος *H. erinaceus* 3001 αν και εμφάνισε περιορισμένη παραγωγή βιομάζας μείωση φαινολικών, ακόμα σε σχέση με το στέλεχος του ίδιου είδους *H. erinaceus* 4514 (το οποίο παρόλο που αναπτύχθηκε λιγότερο προκάλεσε μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης ολικού φαινολικού φορτίου).

Η τοξικότητα των αποβλήτων οφείλεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά τους όπως έχει επισημανθεί σε μελέτες και υποστηρίζεται από πειράματα φυτοτοξικότητας (Ouzounidou, *et al.*, 2010; Ntougias, *et al.*, 2012). Διάφορα στελέχη του είδους *P. ostreatus* έχουν εμφανίσει βλαστικότητα που κυμαίνεται από 27% σε υγρή καλλιέργεια με 75% OMW έως 80% σε συγκέντρωση 25% OMW (Ntougias, *et al.*, 2012; Tsioulpas, *et al.*, 2002). Τα αποτελέσματα της δοκιμής φυτοτοξικότητας της παρούσας μελέτης ήταν χαμηλότερα στη συγκέντρωση 50% OMW, λόγω της περιορισμένης ανάπτυξης του στελέχους *P.ostreatus*, αλλά της τάξεως του 50% στις επεμβάσεις με 12.5% OMW και 25% OMW. Όσον αφορά τα υποστρώματα τα οποία επεξεργαστήκαν με στελέχη του γένους *Hericium* παρουσίασαν υψηλά ποσοστά βλαστικότητας, τα όποια μειώνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης αποβλήτου.

Ακόμη, υπάρχουν εργασίες στις οποίες έχει προσδιοριστεί η ενεργότητα ενζύμων που παράγονται από στελέχη μυκήτων λευκής σήψης που αναπτύσσονται σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Η λακκάση είναι ένζυμο του οποίου η σύνθεση του προάγεται από την παρουσία φαινολικών ενώσεων που περιέχουν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Η μέγιστη ενεργότητα της λακκάσης που έχει καταγραφεί είναι από το στέλεχος *P. ostreatus* όταν το

αντίστοιχο φαινολικό φορτίο του υπερκειμένου σε υγρή καλλιέργεια ήταν 2,55 g/l ενώ σε άλλη εργασία όταν η συγκέντρωση φαινολικών ήταν 1,5 g/l (Tsioupras, et al., 2002; Tomati, et al., 1990). Στην παρούσα μελέτη η μέγιστη ενεργότητα λακκάσης καταμετρήθηκε σε επέμβαση όπου η συγκέντρωση φαινολικών ήταν 1,4 g/l (50% OMW) από το στέλεχος *P. ostreatus* 179. Το στέλεχος *H. erinaceus* 3001 δεν εμφάνισε καθόλου ενεργότητα λακκάσης, ενώ για το στέλεχος 4514 του ίδιου είδους το μέγιστο εμφανίστηκε στην συγκέντρωση 25% OMW. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στην επέμβαση με 50% υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου δε αναπτύχθηκε σχεδόν καθόλου. Σε άλλη εργασία το *P. ostreatus* παρουσιάζει υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης σε ακόμη πιο χαμηλές συγκεντρώσεις ολικού φαινολικού φορτίου. Ακόμη, κατέγραψαν την ενεργότητα και των υπεροξειδασών εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου που εμφάνισαν τιμές αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με την ενεργότητα της λακκάσης αλλά υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές της παρούσας εργασίας (Ntougias, 2012).

Άρα συμπεραίνουμε ότι η αποτοξικοποίηση του αποβλήτου γίνεται με τη παραγωγή των υπεροξειδασών ανεξάρτητης και εξαρτημένης του μαγγανίου για το στέλεχος *H. erinaceus* 3001, Το στέλεχος *H. erinaceus* 4514 αποτοξικοποιεί κυρίως μέσω της λακκάσης και έπειτα με την υπεροξειδάση εξαρτημένης του μαγγανίου, αφού ανιχνεύτηκε σε πολύ χαμηλή ενεργότητα. Τέλος, το *P. ostreatus* 179 χρησιμοποιεί την λακκάση ως κύριο ένζυμο αποτοξικοποίησης. Τα ένζυμα οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης και υπεροξειδάση της λιγνίνης παρουσίασαν μηδενική ενεργότητα σε όλες τις επεμβάσεις.

Όσον αφορά το δεύτερο μέρος των πειραμάτων με καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε άλλη μια δοκιμή με το στέλεχος *H. erinaceus* 4514 για το οποίο έγιναν μετρήσεις κάθε εβδομάδα για 5 εβδομάδες. Έτσι αξιολογήθηκαν όλοι οι υπό μελέτη παράμετροι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μύκητα. Τα αποτελέσματα αριθμητικά δεν είναι συγκρίσιμα με εκείνα από το προηγούμενο πείραμα για το ίδιο στέλεχος, λόγω της ποικιλομορφίας της σύστασης που παρουσιάζουν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές παρτίδες αποβλήτου) για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.1.5.2 της εισαγωγής. Μπορούμε όμως να συγκρίνουμε τη γενική εικόνα της συμπεριφοράς του στελέχους καθώς αναπτύσσεται στις διάφορες συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Παρόμοιες εργασίες έχουν γίνει από τους Ntougias *et al* (2012) για διαφορετικά είδη βασιδιομυκήτων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παραγωγή βιομάζας στις επεμβάσεις με απόβλητο ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το Malt extract που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια

των μυκήτων. Ειδικότερα, όσο μεγάλωνε η συγκέντρωση αποβλήτου ελαιοτριβείου στο υπόστρωμα καλλιέργειας τόσο αυξανόταν και η ανάπτυξη του στελέχους πιθανόν λόγω της συνακόλουθης αύξησης των θρεπτικών συστατικών που αυτό περιέχει. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του στελέχους από τη τοξικότητα του αποβλήτου δεν παρατηρήθηκε, πιθανότατα λόγω του χαμηλού ολικού φαινολικού φορτίου που είχαν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου που χρησιμοποιήθηκαν για το δεύτερο πείραμα.

Αντίθετα, όσον αφορά τις μετρήσεις του pH και από τα δυο πειράματα υγρών καλλιεργειών που έγιναν με το στέλεχος *H. erinaceus* 4514, παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μείωση του pH του μέσου καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια των πέντε εβδομάδων υπήρξε σταδιακή μείωση του pH του υποστρώματος λόγω της ανάπτυξης του στελέχους. Στις μετρήσεις αγωγιμότητας, από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις όπως και στο πρώτο πείραμα. Παρόλα αυτά, αρχικά και στις τρεις συγκεντρώσεις αποβλήτου η αγωγιμότητα μειώθηκε, ενώ στην πορεία αυξήθηκε (στην επέμβαση με 100% ΟΜW μειώθηκε) για να αποκτηθούν τελικά παρόμοιες τιμές για όλες τις επεμβάσεις.

Σταδιακά αυξανόμενη ήταν η μείωση του φαινολικού φορτίου και της έντασης του χρώματος (αποχρωματισμός) λόγω της ανάπτυξης του στελέχους στο υπόστρωμα. Παράλληλα, αυξήθηκε και ο δείκτης βλαστικότητας των αποβλήτων λόγω της αποτοξικοποίησης σε βαθμό που δεν παρουσιάζει σημαντική παρεμπόδιση της βλάστησης των σπόρων. Το ποσοστό μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου ήταν παρόμοιο με το ποσοστό που παρατηρήθηκε στο πρώτο πείραμα. Αρχικά η μείωση της έντασης του χρώματος ήταν αρκετά αυξημένη ενώ μετά την 3^η εβδομάδα σταθεροποιήθηκε.

Στην αποτοξικοποίηση του αποβλήτου και στην ανάπτυξη του στελέχους σημαντικό ρόλο παίζουν τα ένζυμα που παράγει. Κατά κύριο λόγο ανιχνεύθηκε λακκάση και σε πολύ μικρότερες ενεργότητες οι υπεροξειδάσες (ανεξάρτητη και εξαρτημένη του μαγγανίου). Τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης του μύκητα στο υπόστρωμα δεν παράγεται λακκάση. Οπότε συμπεραίνουμε ότι η ανάπτυξη του μύκητα στη συγκεκριμένη περίοδο διευκολύνεται από τα άλλα δύο ένζυμα (υπεροξειδάσες εξαρτημένη και ανεξάρτητης του μαγγανίου) έστω και σε χαμηλές ενεργότητες τα οποία συνεχίζουν να παράγονται μέχρι το τέλος του πειράματος.

6.2 Καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα

6.2.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα

Τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες κατά την πειραματική διαδικασία ήταν το άχυρο σίτου (WS) για το *P. ostreatus* και το πριονίδι οξιάς για τα δύο στελέχη *H. erinaceus*. Τα υποστρώματα αυτά παρουσίασαν και τον υψηλότερο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης, χρησιμοποιούνται άλλωστε και σε εμπορική κλίμακα για την παραγωγή καρποφοριών.

Στο παρελθόν μελέτες έδειξαν ότι το άχυρο σίτου δεν μπορεί να αντικατασταθεί ικανοποιητικά από κελύφη φιστικιών και απόβλητα εκκοκκιστηρίου βαμβακιού ως στερεά υποστρώματα, διότι ο ρυθμός της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii* και *Volvariella volvacea* που δοκιμάστηκαν ήταν σημαντικά μικρότερος στα συγκεκριμένα υλικά (Philliproussis, et al., 2011; Philipproussis, et al., 2001). Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν σε υποστρώματα με πριονίδι λεύκας, πριονίδι βελανιδιάς, στελέχη καλαμποκιού και πυρηνόξυλο (Zervakis, et al., 2001). Το *H. erinaceus* έχει δοκιμαστεί σε επεμβάσεις με υπολείμματα καλλιέργειας ρυζιού, κριθαριού, σίτου, κινέζικου λάχανου, σόγιας και κελύφη αυγών σε συνδυασμό με πριονίδι οξιάς, εμφανίζοντας μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης στο υπόστρωμα με το κριθάρι (Han Gyu Ko, et al., 2005). Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι στο άχυρο σίτου αλλά και στο πριονίδι οξιάς θα μπορούσε να προστεθεί 25% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου δίχως να επηρεάσει σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη.

6.2.2 Καλλιέργεια μανιταριών

Στο πείραμα με την καλλιέργεια μανιταριών επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν τα κλαδέματα ελιάς και το πριονίδι οξιάς με το στέλεχος *H. erinaceus* 4514. Σε παρόμοιες εργασίες έχει μελετηθεί η δημιουργία βασιδιομάτων για στελέχη του γένους *Hericium* όχι όμως και η απόδοση (Han Gyu Ko, et al., 2005). Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η διάρκεια επώασης και η πρωιμότητα δε επηρεάζεται από την προσθήκη κλαδεμάτων ελιάς σε καμιά από τις επεμβάσεις. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η μέγιστη απόδοση εμφανίστηκε στο υπόστρωμα με 100% κλαδέματα ελιάς. Οι τιμές της βιολογικής

αποδοτικότητας στα υποστρώματα αυτά είναι πολύ αυξημένες σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Θα μπορούσαμε να πούμε λοιπόν ότι τα κλαδέματα ελιάς θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν πλήρως το πριονίδι οξιάς που είναι και το σύνηθες υπόστρωμα καλλιέργειας σε εμπορική κλίμακα.

6.2.3 Ανάλυση της σύστασης των μανιταριών

Σε εργασίες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα για τη σύσταση των καρποφοριών έχουν αναφερθεί ποσοστά τέφρας που συμφωνούν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας. Οι συγκεντρώσεις λιπαρών και ινωδών ουσιών (%) είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Mau, et al., 2001).

Παρατηρούμε από τα αποτελέσματα της διατροφικής ανάλυσης των καρποφοριών της παρούσας εργασίας ότι η αύξηση του ποσοστού κλαδεμάτων ελιάς στο υπόστρωμα καλλιέργειας δεν μεταβάλλει με στατιστικά σημαντικές διαφορές τα διατροφικά χαρακτηριστικά των καρποφοριών. Το ποσοστό της τέφρας, των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και ινωδών ουσιών, καθώς και συγκέντρωση αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών δεν επηρεάζονται από το ποσοστό κλαδεμάτων στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Αντίθετα, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης λιπαρών με την αύξηση της συγκέντρωσης των κλαδεμάτων στο υπόστρωμα εμφανίζοντας παράλληλα και στατιστικά σημαντικές διαφορές.

7 Συμπεράσματα

Από τα πειράματα της παρούσας εργασίας και τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι τα τρία στελέχη των μυκήτων λευκής σήψης (*Pleurotus ostreatus* 179, *Hericiium erinaceus* 3001 και *H. erinaceus* 4514) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιοτριβείου διότι κατόρθωσαν να μειώσουν περίπου κατά το ήμισυ τα ολικά φαινολικά και την ένταση του χρώματος και να αυξήσουν το δείκτη βλαστικότητας των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι τα τρία στελέχη χρησιμοποιούν με διαφορετικό τρόπο τα ένζυμα που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση του υγρού αποβλήτου. Παράλληλα, όσον αφορά την καλλιέργεια για παραγωγή μανιταριών του είδους *Hericiium erinaceus*, η χρήση στο υπόστρωμα καλλιέργειας κλαδεμάτων ελιάς σε μείγμα με πριονίδι οξιάς δεν επηρέασε δυσμενώς την παραγωγή καρποφοριών με αποτέλεσμα να μπορεί να αντικαταστήσει το συμβατικό υπόστρωμα χωρίς να επηρεάζονται βασικά διατροφικά χαρακτηριστικά.

8 Βιβλιογραφία

Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., & Zervakis, G. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), pp. 353-360.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.).

Arienzo, M., De Martino, A., Capasso, R., Di Maro, A., & Parente, A. (2003). Analysis of carbohydrates and amino acids in vegetables waste waters by ion chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14(2), pp. 74-82.

Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglou, A., Sengul, F., & Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews on Environmental Science and Technology*, 34(3), pp. 209-247.

Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. John Wiley & Sons.

Bourbonnais, R., Paice, M. C., Reid, I., Lanthier, P., & Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes vericolor* and role of mediator 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sufonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), pp. 1876-1880.

Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1993). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47, pp. 3535-3540.

Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective pytoxic effects of polyphenols from vegetables waste waters. *Phytochemistry*, 31(12), pp. 4125-4128.

Carbera, F., Lopez, R., Martinez, A., Dupuy de Lome, E., & Murillo, J. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), pp. 215-225.

- Caryuela, M. L., Sanchez-Monedero, M. A., & Roig, A. (2006). Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry*, *41*(3), pp. 616-623.
- Cassano, A., Conidi, C., Giorno, L., & Drioli, E. (2013). Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, *248-249*, pp. 185-193.
- Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., & Garcia, D. (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *38*(3-4), pp. 193-203.
- Crestini, C., Jurasek, L., & Argyropoulos, D. S. (2003). On the Mechanism of the Laccase - Mediator System in the Oxidation. *Chemistry-A European Journal*, *9*(21), pp. 5371-5378.
- D' Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., & Sermanni, G. G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, *61*, pp. 209-218.
- Drysdale, G., Kasan, H., & Bux, F. (1999). Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA*, *25*, pp. 357-362.
- Eriksson, K., Ander, B., & Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer-Verlag*, p. 407.
- Fan, L., Pandey, A., Mohan, R., & Soccol, C. (2000). Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnologica*, *20*, pp. 41-52.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Parrella, A., & Temussi, F. (2004). Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), pp. 5151-5154.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parella, A., & Temussi, F. (2003). Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewaters: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(4), pp. 1005-1009.
- Fountoulakis, M. S., Dokianakis, S., Kornaros, M. E., Aggelis, G. G., & Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, *36*, pp. 4735-4744.

Genedebien, A., Ferguson, R., Brink, J., Horth, H., Sullivan, M., & Davis, R. (2001). Survey of waste spread on land.

Glenn, J. K., Akileswaran, L., & Gold, M. H. (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(2), pp. 688-696.

Hammel, K. E. (1997). Fungal Degradation of lignin. *Cab International*, pp. 33-45.

Han Gyu Ko, Hyu Gu Park, Sang Ho Park, Chang Won Choi, Seong Hwan Kim, & Won Mok Park. (2005). Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation. *Biosource Technology*, 96, pp. 1439-1444.

Harrison, K.A. 1973. The genus *Hericium* in North America. *The Michigan Botanist*. 12:177-194

Hui, Y. H. (2010). *Handbook of fruit and vegetable flavors*.

Israilides, C. J., Vlyssides, A., Mourafeti, V. N., & Karvouni, G. (1997). Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system. *Biosource Technology*, 61, pp. 163-170.

Jaouani, A., Guillen, F., Penninckx, M. J., Martinez, A. T., & Martinez, M. (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), pp. 478-486.

Kalogeropoulos, N., Yanni, A., Koutrotsios, G., & Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild mushrooms from the island of Lesvos Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, pp. 378-385.

Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., & Crowther, J. C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science*(7).

Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., & Sannia, G. (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 221-226.

Knupp, G., Rucker, G., Ramos-Cormenzana, A., Hoyos, S. G., Neugebauer, M., & Ossenkop, T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3), pp. 277-282.

Lacko, N., Bux, F., & Kasan, C. H. (1999). Survey of filamentous bacteria in activated sludge plants in KwaZulu-Nata. *Water SA*, 25(1), pp. 63-68.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2005). *Βιολογία των μικροοργανισμών*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., & Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oli mill waste waters with the ligninolytic fungus pleurotus ostreatus. *Water research*, 30(8), pp. 1914-1918.
- Matos, A., Bezerra, R., & Dias , A. (2007). Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatus* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), pp. 279-275.
- Mau, J.-L., & Tseng, Y.-H. (1998). Nonvolatile taste componets of three strains of *Agrocybe cylindracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 2071-2074.
- Mau, J.-L., Chyau, C.-C., Li, J.-Y., & Tseng, Y.-H. (1997). Flavor compounds in straw mushrooms *Volvariella volvacea* harvested at different stages of maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), pp. 4726-4729.
- Mau, J.-L., Lin, H.-C., Ma, J.-T., & Song, S.-F. (2001). Non volatile taste components of several speciality mushrooms. *Food Chemistry*, 73(4), pp. 461-466.
- McNamara, C. C., Anastasiou, C. C., Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Mekki , A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological research*, 161(2), pp. 93-101.
- Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2007). Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Enviromental Management*, 84(2), pp. 134-140.
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Duran, N. (2002). Potentian applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6-7), pp. 205-216.
- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), pp. 3509-3514.

Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). *Olive processing waste management: Literature Review and Patent Survey* (Second edition ed.). Elsevier.

Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautova, V., & Zervakis, (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains. *Chemosphere*, *88*(5), pp. 620-626.

Ntougias, S., Gaitis, F., Katsaris, P., Skoulika, S., Iliopoulos, N., & Zervakis, I. G. (2013). The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties- Evaluation of *Pleurotus* strains ad bioindicators of the effluents toxicity. *Chemosphere*, *92*, pp. 399-405.

Ouzounidou, G., Zervakis, G. I., & Gaitis, F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Enviromental Toxixology*, *4*, pp. 21-38.

Palmer, A. E., Lee, S., & Solomon, E. I. (2001). Decay of the peroxide intermediate in. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(27), pp. 6591-6599.

Paraskeva, C. A., Papadakis, V. G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D. G., & Koutsoukos, P. G. (2007). Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination*, *213*(1-3), pp. 218-229.

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

Philippoussis, A., Zervakis, G., & Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(2), pp. 191-200.

Phillipoussis, A., & Diamantopoulou, P. (2011). Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, pp. 344-357.

Robles, A., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Omar, N., Perez, R., & Galvez, A. (2002). Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(4), pp. 516-522.

Roig, A., Caryela, M. L., & Sanchez-Monedero, M. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26.

Rozzi, A., & Malpei, F. (1996). Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp. 135-144.

Ruiz-Rodriguez A, Soler-Rivas C, Polonia I, Wichers HJ (2010) Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64:638–645.

Sayadi, S., & Radhouane, E. (1992). Decolourization of olive mill waste waters by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and biotechnology*, 37, pp. 813-817.

Sierra, J., Marti, E., Montserrat, G., Cruannas, R., & Garrau, M. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *The Science of the Total Environment*(279), pp. 207-214.

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

Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*.

Steven, H. D. (2008). Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), pp. 823-824.

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

Tien, M., & Kirk, K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, pp. 238-249.

Tomati, V., Galli E., Lena, G., & Suffone, R. (1990). Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste waters. *Journal Annali dell' Istituto Sperimentale Agronomico*, 21, pp. 275-279.

Tsai, S.-Y., Huang, S.-J., Lo, S.-H., Wu, T.-P., Lian, P.-Y., & Mau, J.-L. (2009). Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 113(2), pp. 578-584.

Tseng, Y.-H., & Mau, J.-L. (1999). Contents of sugars, free amino acids and free 5'-nucleotides in mushrooms, *Agaricus bisporus*, during postharvest storage. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 79(11), pp. 1519-1523.

Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., & Aggelis, G. (2002). Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biosource Technology*, 84, pp. 251-257.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153, pp. 895-905.

Vermerris, W., & Nickolson, R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. *Springer*.

Waterman, P., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. In *Methods in ecology* (pp. 83-85). Oxford: Lawton JH.

Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163(863), pp. 150-160.

Wui, S. A., & Elimelech, M. (2008). Fatty acid fouling of reverse osmosis membranes: Implication for wastewater reclamation. *Water research*, 42, pp. 4393-4403.

Yesilada, O., Sik, S., & Sam, M. (1999). Treatment of olive oil mill wastewater with fungi. *Turkish Journal of Biology*, 23, pp. 231-240.

Zenjari, B., Hajjouji, E., Baddi, G. A., Bailly, J. R., Revel, J. C., Nejmeddine, A., & Hafidi, M. (2006). Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater–straw mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3), pp. 433-437.

Zervakis, G.I., Koutrotsios, G. & Katsaris, P. (2013). Composted versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms - An assessment of selected cultivation and quality parameters. *BioMed Research International*, 13 pp.

Zervakis GI, Ntougias S, Ouzounidou G, Gaitis F (2011). Treatment of two-phase olive mill wastes through commercial-scale composting and evaluation of the end-product for agricultural use. In Lekkas TD (ed) Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST2011). Global NEST, Rhodes (Greece), pp A2083–A2089.

Zervakis, G., Phillippoussis, A., Ioannidou, S., & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46, pp. 231-234.

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

Zervakis, G. & Balis, C. (1996). A pluralistic approach on the study of *Pleurotus* species, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100, 717-731.

Zucconi, F., Peta, A., Forte, M., & De Bertoldi, M. (1994). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22, pp. 54-57.

Δήμου, Δ. Μ. (1992). *Εισαγωγή στη βιολογία των μυκήτων*.

Ζερβάκης, Γ. Ι. (2011). *Εισαγωγή στην Μυκητολογία*. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Θεριός, Ι. Ν. (2005). *Ελαιοκομία*.

Κυριτσάκης, Α. (2009). Το ελαιόλαδο, το πυρηνέλαιο και τα υπόπροϊόντα ελαιουργίας. *Γεωργία και Κτηνοτροφία*(6/2009).

Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (1999). *Σύγχρονη Ελαιοκομία-Το ελαιόδενδρο*.

Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (1999). *Σύγχρονη Ελαιοκομία-Η ελαιουργία*.

Μπαλής, Κ. (1993). *Μαθήματα Γενικής Μικροβιολογίας- Εισαγωγή στον κόσμο των μυκήτων*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ποντίκης, Κ. Α. (2000). *Ειδική Δενδροκομία - Ελαιοκομία (Τόμ. 3)*. Αθήνα: Αθ. Σταμούλης.

Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου. (2003). *Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα*. Επιμελητές: Αικ. Πολυμέρου – Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα.

Σαρλής, Γ. Π. (1999). *Συστηματική Βοτανική*. Αθήνα: Σταμούλης.

Χριστιάς, Χ. (1999). *Μυκητολογία*. Αθήνα: Αγρότυπος Α.Ε.