

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

Μεταπτυχιακή Εργασία

**Βιοαποδόμηση οργανικών
συστατικών υγρών αποβλήτων
ελαιουργείων με χρήση μυκήτων
λευκής σήψης**

Κωνσταντίνα Μπαλάσκα
Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ζερβάκης

ΑΘΗΝΑ 2014
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

Μεταπτυχιακή Εργασία

**Βιοαποδόμηση οργανικών
συστατικών υγρών αποβλήτων
ελαιουργείων με χρήση μυκήτων
λευκής σήψης**

Κωνσταντίνα Μπαλάσκα
Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ζερβάκης

Τριμελής Επιτροπή:
Γεώργιος Ζερβάκης
Πέτρος Ταραντίλης
Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης

ΑΘΗΝΑ 2014

Περίληψη

Τα παραπροϊόντα των τριφασικών ελαιουργείων στην Ελλάδα και όχι μόνο αποτελούν υψηλό ρυπογόνο παράγοντα για το περιβάλλον.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η αποτοξικοποίηση των αποβλήτων μέσω βιολογικής αερόβιας διεργασίας με τη χρήση δύο μυκήτων λευκής σήψης, των *Abortiporus biennis* ABL436 και *Phanerochaete chrysosporium* PHL322. Επίσης εκτιμήθηκε η ενεργότητα των ενζύμων αυτών. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν επεξεργασίες όπως αποστείρωση και παστερίωση, με ανάδευση και στατικές φιάλες, με προσθήκη μικρών ποσοτήτων μετάλλων Mn, Cu, αλλά και με προσθήκη πηγής αζώτου. Τέλος, διερευνήθηκε η χρησιμότητα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) στην ταυτοποίηση οργανικών συστατικών για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, δηλαδή την πιθανή αποτοξικοποίηση των αποβλήτων.

Μέσω των πειραματικών διαδικασιών διαπιστώθηκε ότι η αποστείρωση είναι η καλύτερη προεργασία του αποβλήτου. Επίσης, ότι με την ανάδευση και τα δύο στελέχη *Abortiporus biennis* και *Phanerochaete chrysosporium* μπόρεσαν να αποδομήσουν φαινολικές ενώσεις αλλά και να αποχρωματίσουν το απόβλητο τουλάχιστον κατά 50% και το μέγιστο κατά 90%. Το *Abortiporus biennis* είναι πιο αποδοτικό σε σχέση με το *Phanerochaete chrysosporium*, σε οποιοσδήποτε από τις παραπάνω συνθήκες. Επίσης, οι προσθήκες ποσοτήτων μετάλλων επιταχύνουν την αποδόμηση. Η προσθήκη πηγής αζώτου βοηθάει τους μύκητες να αποδομήσουν κατά 80-90% το φαινολικό φορτίο.

Τέλος, η υπέρυθρη φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της αποδόμησης των οργανικών συστατικών των αποβλήτων ελαιουργείων.

Abstract

The by-products of three phase olive mills in Greece, but not only here, are a high polluting factor for the environment.

In this study, the detoxification of olive mill wastewater (OMWW) was studied through aerobic biological process using two white rot fungi, *Abortiporus biennis* ABL436 and *Phanerochaete chrysosporium* PHL322 and was evaluated. Furthermore, the activity of involved enzymes was estimated.

For this purpose, special treatments were used such as sterilization and pasteurization, stirred and unstirred, adding small quantities of metals Mn, Cu, and adding nitrogen source. Finally, we investigated the utility of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) in the identification of organic components to confirm the results and review the possible detoxification of the olive mill waste water.

Through the experiments, it was found that sterilization is a better pretreatment of the waste. Also, that with stirring, both *Abortiporus biennis* and *Phanerochaete chrysosporium* were able to reduce the total phenolic content and discolor the waste for at least 50% and at the maximum 90%. *Abortiporus biennis* is more effective than *Phanerochaete chrysosporium*, in any circumstance above. Small quantities of metals accelerate the degradation of phenols. Adding nitrogen source degrades the phenolic content by 80-90%.

Finally, infrared spectroscopy FT-IR can be a useful tool for monitoring the degradation of the organic components of olive mill waste water.

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, στα πλαίσια του ΠΜΣ του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΓΠΑ). Επίσης το φασματοσκοπικό κομμάτι αυτής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του ΓΠΑ.

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινώς όλους όσους συνέβαλαν στη πραγματοποίησή και την ολοκλήρωσή αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής διατριβής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη, για την ανάθεση αυτού του θέματος, την επιστημονική του υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές σε όλα τα στάδια εκπόνησης του πειράματος αλλά και για την υπομονή του και το πνεύμα αισιοδοξίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ταραντίλη Πέτρο, για την αποδοχή του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την παραχώρηση του οργάνου φασματοσκοπίας στο Εργαστήριο Χημείας, και βέβαια για το χρόνο που μου αφιέρωνε σε κρίσιμα σημεία του πειράματος. Σαφέστατα, ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη ως μέλος της επιτροπής μου και για τις χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κουτρώτσιο Γεώργιο για την υπερπολύτιμη βοήθειά του σε διάφορα, τεχνικά και μη, θέματα που προέκυψαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων αλλά και για το φιλικό περιβάλλον στον εργαστηριακό χώρο, στο οποίο συνετέλεσαν και τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την πλήρη υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1.1. ΕΛΑΙΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	15
1.1.1. Το ελαιόδεντρο στην Ευρώπη και τον κόσμο.....	15
1.1.2.Ελαιουργεία.....	19
1.1.2.1. Γενική περιγραφή διαδικασίας παραγωγής ελαιολάδου.....	19
1.1.2.2. Τύποι ελαιουργείων.....	21
1.1.3. Υποπροϊόντα- Απόβλητα ελαιουργείων.....	24
1.1.4. Τεχνολογίες για την διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείου.....	29
1.2. ΜΥΚΗΤΕΣ.....	31
1.2.1. Βασιδιομύκητες	32
1.2.2. Μύκητες λευκής σήψης.....	33
1.2.2.1. <i>Abortiporus biennis</i>	34
1.2.2.2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	34
1.2.2.3. Ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης.....	35
1.2.2.4. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων.....	36
1.3.ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ.....	37
1.3.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
2.1. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	49
2.1.1. Σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar.....	50
2.1.2. Σε υγρό απόβλητο μαζί με άγαρ.....	50
2.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.....	50
2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΩΝ.....	50

2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΥΓΡΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	51
2.5. ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	52
2.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	52
2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ.....	55
2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΥ.....	56
2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ.....	57
2.9.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση.....	57
2.9.2. Μελέτη της παρεμβολής του επεξεργασμένου υγρού αποβλήτου στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένης ή μη του Mn)	57
2.9.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn).....	58
2.9.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση.....	58
2.9.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης.....	59
2.9.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση....	60
2.10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	60
2.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	60
2.12. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ FT-IR.....	61
2.13. ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ FT-IR.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
3.1. ΠΡΩΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση θερμικής προεπεξεργασίας δειγμάτων.....	64
3.1.1. Μετρήσεις Φαινολικών και αποχρωματισμού.....	64

3.1.2. Παραγωγή βιομάζας.....	67
3.1.3. Ενεργότητα ενζύμων.....	67
3.2. ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση της ανάδευσης των καλλιεργειών και της προσθήκης μετάλλων (συνενζύμων).....	69
3.2.1. Μετρήσεις Φαινολικών και Αποχρωματισμού.....	69
3.2.2. Παραγωγή βιομάζας.....	81
3.2.3. Ενεργότητα ενζύμων.....	84
3.2.4. Φάσματα FT-IR.....	88
3.3. ΤΡΙΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση της προσθήκης Αζώτου.....	96
3.3.1. Μετρήσεις φαινολικών και αποχρωματισμού.....	96
3.3.2. Παραγωγή βιομάζας.....	98
3.3.3. Ενεργότητα ενζύμων.....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1.2.1. Γραμμή παραγωγής κλασσικού τύπου ελαιουργείου.....	22
Σχήμα 1.1.2.2. Γραμμή παραγωγής φυγοκεντρικών συστημάτων.....	23
Σχήμα 1.1.3.1.: Οι φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί σε αφθονία στα Υ.Α.Ε. με το κατά IUPAC όνομα τους, το μοριακό βάρος και τη δομή τους.....	28
Σχήμα 2.6.1. Πειραματική διαδικασία Νο1.....	53
Σχήμα 2.6.2. Πειραματική διαδικασία Νο2.....	54
Σχήμα 2.6.3. Πειραματική διαδικασία Νο3.....	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ- ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1.1.2.1: Φυγοκεντρικός διαχωριστής για την εξαγωγή του ελαιολάδου.....	21
Εικόνα 1.2.1.1: Σχηματική αναπαράσταση βασιδιοκαρπίου: α. Πίλος, β. Στύπος, γ. Βόλβα, δ. Δακτύλιος, ε. Ελάσματα, στ. Υπολείμματα καθολικού πέπλου.....	33
Εικόνα 1.3.1.1. Μορφές δονήσεων μορίων.....	39
Εικόνα 1.3.1.2. Συμβολόμετρο του Albert Michelson.....	43
Εικόνα 1.3.1.3: Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος για τη λήψη φάσματος με τη τεχνική DRIFTS.....	45
Εικόνα 2.13.1: Όργανο μέτρησης απορρόφησης υπερύθρου ακτινοβολίας.....	62
Εικόνα 3.2.4.1: Φάσμα FT-IR υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. Η σκιαγραφημένη περιοχή είναι η περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος 1800-900 cm^{-1}	88
Εικόνα 3.2.4.2: Το παραπάνω φάσμα FT-IR με όλες τις κορυφές του.....	89
Εικόνα 3.2.4.3: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις T1 (μπλε) και T3 (κόκκινο).....	90
Εικόνα 3.2.4.4: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn [T1 (κόκκινο) - T3 (πράσινο)].....	90
Εικόνα 3.2.4.5: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Cu [T1 (φούξια) - T3 (κόκκινο)].....	91
Εικόνα 3.2.4.6: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn [T1 (κόκκινο) - T3 (πράσινο)].....	91
Εικόνα 3.2.4.7: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (μπλε) - T3 (κόκκινο)].....	92
Εικόνα 3.2.4.8: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (κόκκινο) -T3 (πράσινο)].....	92
Εικόνα 3.2.4.9: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις χρονικές στιγμές T1 (γαλάζιο) και T3 (κόκκινο).....	93
Εικόνα 3.2.4.10: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn [T1 (φούξια) - T3 (κόκκινο)].....	93
Εικόνα 3.2.4.11: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Cu [T1(μπλε) - T3 (κόκκινο)].....	94
Εικόνα 3.2.4.12: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn [T1 (πράσινο) - T3 (κόκκινο)].....	94
Εικόνα 3.2.4.13: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (κόκκινο) -T3 (φούξια)].....	95

Εικόνα 3.2.4.14: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm ⁻¹ . <i>A. biennis</i> στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (πράσινο) - T3 (κόκκινο)].....	95
Διάγραμμα 1.1.1.1: Κατανάλωση ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (με μπλε) και παγκοσμίως (με πορτοκαλί) μέσα σε 25 χρόνια, 1990-2014.....	16
Διάγραμμα 1.1.1.2: Παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (με μπλε) και παγκοσμίως (με πράσινο) μέσα σε 25 χρόνια, 1990-2014.....	17
Διάγραμμα 1.1.2.1: Ποσοστό % της κατανομής ελαιουργείων στην Ελλάδα.....	19
Διάγραμμα 2.7.1: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των φαινολικών.....	56
Διάγραμμα 3.1.1.1. Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i>	65
Διάγραμμα 3.1.1.2. Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	65
Διάγραμμα 3.1.1.3. Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i>	66
Διάγραμμα 3.1.1.4. Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για τη <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	66
Διάγραμμα 3.1.2.1. Παραγωγή βιομάζας (σε g) <i>Abortiporus biennis</i> και <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	67
Διάγραμμα 3.2.1.1: Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	70
Διάγραμμα 3.2.1.2: Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	70
Διάγραμμα 3.2.1.3.: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών σε αναδεδυόμενες (αριστερά) και μη αναδεδυόμενες (δεξιά) φιάλες για το <i>Abortiporus biennis</i>	71
Διάγραμμα 3.2.1.4: Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	72
Διάγραμμα 3.2.1.5: Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Abortiporus biennis</i> στις μη Αναδεδυόμενες φιάλες.....	72
Διάγραμμα 3.2.1.6: Η επί % μείωση του χρώματος σε αναδεδυόμενες(αριστερά) και μη αναδεδυόμενες(δεξιά) φιάλες για το <i>Abortiporus biennis</i>	73

Διάγραμμα 3.2.1.7: Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	74
Διάγραμμα 3.2.1.8: Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	75
Διάγραμμα 3.2.1.9: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με <i>Phanerochaete chrysosporium</i> σε αναδεδυόμενες (αριστερά) και μη αναδεδυόμενες (δεξιά) φιάλες.....	76
Διάγραμμα 3.2.1.10: Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	77
Διάγραμμα 3.2.1.11: Πορεία του χρώματος του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	77
Διάγραμμα 3.2.1.12: Η επί % μείωση του χρώματος σε αναδεδυόμενες (αριστερά) και μη αναδεδυόμενες (δεξιά) φιάλες για το <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	78
Διάγραμμα 3.2.1.13: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με <i>Abortiporus biennis</i> (αριστερά) και <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (δεξιά) σε αναδεδυόμενες φιάλες.....	79
Διάγραμμα 3.2.1.14: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με <i>Abortiporus biennis</i> (αριστερά) και <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (δεξιά) σε Μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	80
Διάγραμμα 3.2.1.15: Η επί % μείωση του χρώματος με <i>Abortiporus biennis</i> (αριστερά) και <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (δεξιά) σε αναδεδυόμενες φιάλες.....	80
Διάγραμμα 3.2.1.16: Η επί % μείωση του χρώματος με <i>Abortiporus biennis</i> (αριστερά) και <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (δεξιά) σε μη Αναδεδυόμενες φιάλες.....	81
Διάγραμμα 3.2.2.1: Η παραγωγή μυκηλίου σε g <i>Abortiporus biennis</i> σε αναδεδυόμενες φιάλες (αριστερά) και μη αναδεδυόμενες φιάλες (δεξιά).....	82
Διάγραμμα 3.2.2.2.: Η παραγωγή μυκηλίου σε g <i>Phanerochaete chrysosporium</i> σε αναδεδυόμενες φιάλες (αριστερά) και μη αναδεδυόμενες φιάλες (δεξιά).....	83
Διάγραμμα 3.2.2.3: Η παραγωγή μυκηλίου σε g στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	83
Διάγραμμα 3.2.2.4: Η παραγωγή μυκηλίου σε g στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	84
Διάγραμμα 3.2.3.1: Ενεργότητα λακκάσης από το <i>A. biennis</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	84
Διάγραμμα 3.2.3.2: Ενεργότητα λακκάσης από το <i>A. biennis</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	85

Διάγραμμα 3.2.3.3: Ενεργότητα Μπ- υπεροξειδάσης από το <i>A. biennis</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	85
Διάγραμμα 3.2.3.4: Ενεργότητα Μπ- υπεροξειδάσης από το <i>A. biennis</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	86
Διάγραμμα 3.2.3.5: Ενεργότητα Μπ- υπεροξειδάσης από το <i>Ph. chrysosporium</i> στις αναδεδυόμενες φιάλες.....	87
Διάγραμμα 3.2.3.6: Ενεργότητα Μπ- Υπεροξειδάσης από το <i>Ph. chrysosporium</i> στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.....	87
Διάγραμμα 3.3.1.1: Επί τοις εκατό (%) μείωση των φαινολικών ουσιών σε σχέση με το αρχικό ανεπεξέργαστο ΥΑΕ σε καλλιέργειες <i>A. biennis</i> με διαφορετικές προσθήκες αζώτου.....	97
Διάγραμμα 3.3.1.2: Επί τοις εκατό (%) μείωση του χρώματος σε σχέση με το αρχικό ανεπεξέργαστο ΥΑΕ σε καλλιέργειες <i>A. biennis</i> με διαφορετικές προσθήκες αζώτου.....	97
Διάγραμμα 3.3.2.1.: Βάρος του παραγόμενου μυκηλίου του μύκητα <i>A. biennis</i> σε g.....	98
Διάγραμμα 3.3.3.1.: Ενεργότητα λακκάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης.....	99
Διάγραμμα 3.3.3.2: Ενεργότητα Μπ- Υπεροξειδάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης του μύκητα <i>A.biennis</i>	100
Διάγραμμα 3.3.3.3: Ενεργότητα λιγνίνης υπεροξειδάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης του μύκητα <i>A. biennis</i>	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1.1.1: Παραγωγή ελαιολάδου ανά χώρα για το έτος 2013/2014 και με εκτίμηση για το έτος 2014/2015(www.internationaloliveoil.org).....	17
Πίνακας 1.1.1.2: Ετήσια παραγωγή της Ελλάδας (FAO, 2010).....	18
Πίνακας 1.1.2.1: Νομοί της Ελλάδας με τον μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδεντρων (Γεν. Γραμμ. Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας Ελλάδος).....	20
Πίνακας 1.1.3.1. :Χαρακτηριστικά αποβλήτων ανάλογα την επεξεργασία (Bio-olea).....	24
Πίνακας 1.1.3.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Hafidi et al., 2005).....	25
Πίνακας 1.1.3.3. Συνοπτικά από διάφορες πηγές η σύσταση των Υ.Α.Ε.(Tsagaraki et al., 2007).....	26
Πίνακας 1.3.1.1. Ερμηνεία κορυφών στο IR που αφορούν το ΥΑΕ (Ait Baddi et al. 2004, El Hajjouji et al. 2007, Hafidi et al. 2005, Lguirati et al. 2005, Ouatmane (2000) and Smidt and Meissl 2006).....	46
Πίνακας 1.3.1.2. Ερμηνεία κορυφών στο IR πιο γενικευμένα (Smidt et al. 2008).....	47
Πίνακας 3.1.3.1. Ενεργότητες ενζύμων για το <i>Abortiporus biennis</i> σε U (μmol/min).....	68
Πίνακας 3.2.1.1. Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών σε <i>Abortiporus biennis</i> σε αναδεδυόμενες και μη φιάλες.....	71
Πίνακας 3.2.1.2: Η επί % μείωση του χρώματος του ΥΑΕ με <i>Abortiporus biennis</i> σε αναδεδυόμενες και μη φιάλες.....	73
Πίνακας 3.2.1.3: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με <i>Phanerochaete chrysosporium</i> σε αναδεδυόμενες και μη φιάλες.....	75
Πίνακας 3.2.1.4: Η επί % μείωση του χρώματος του ΥΑΕ με <i>Phanerochaete chrysosporium</i> σε αναδεδυόμενες και μη φιάλες.....	78
Πίνακας 3.3.2.1. Παραγωγή βιομάζας του μύκητα <i>A. biennis</i> σε g.....	98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΛΑΙΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1.1.1. Το ελαιόδεντρο στην Ευρώπη και το κόσμο

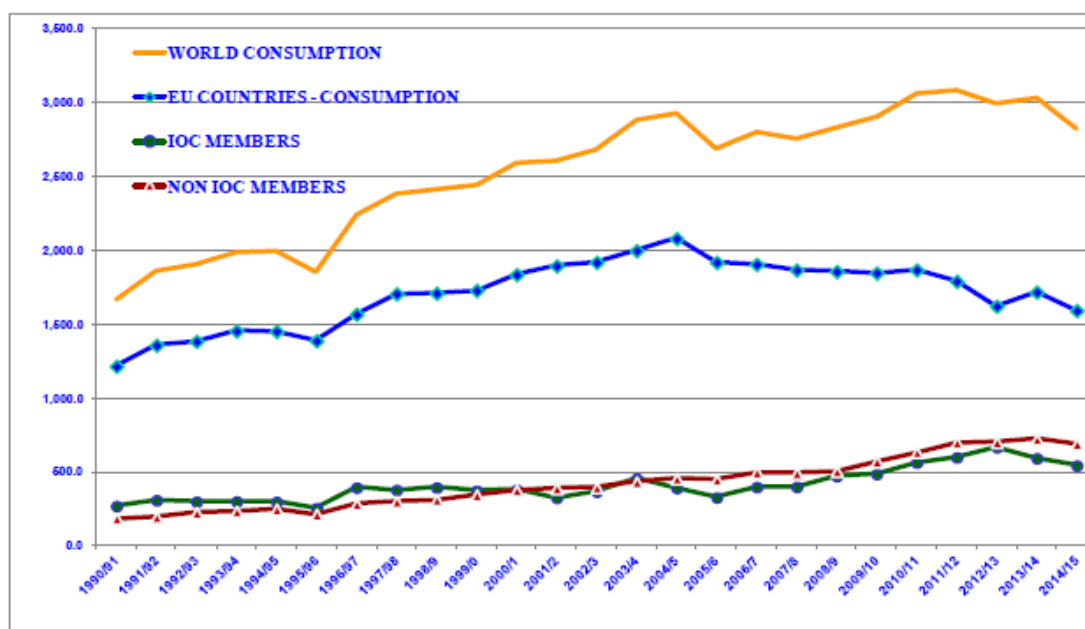
Η ελιά (*Olea europaea* L.) είναι ένα δέντρο που ανήκει στην οικογένεια Oleaceae και απαντάται σε εύκρατες και θερμές περιοχές. Είναι ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στο κόσμο με μεγάλη σημασία και αποτελεί σύμβολο τύχης, ευημερίας και σοφίας. Η καταγωγή του ελαιόδεντρου είναι αμφιλεγόμενη αλλά σε γενικές γραμμές είναι πιο αποδεκτή η θεωρία ότι προέρχεται από τη Μικρά Ασία, τη Συρία ή και Αίγυπτο (Θεριός, 2005, Μπαλατσούρας, 1997). Στη Μεσόγειο η καλλιέργεια του τοποθετείται περί τα 6000 χρόνια πίσω. Ανασκαφές υποδεικνύουν την εμπορική ύπαρξη του δένδρου στα Μυκηναϊκά και Μινωικά χρόνια (Fooks, 1995) Στην αρχαία Ελληνική λογοτεχνία αποκαλύπτεται η χρήση του καρπού και των παραγώγων του για την καλή υγεία του ανθρώπου. Η ελιά διηγείται στη Βίβλο αλλά και στην Παλαιά και Κενή Διαθήκη, δείχνοντας έτσι τη σημασία της και σε θρησκευτικές πεποιθήσεις (Ryan and Robards, 1998). Σήμερα καλλιεργείται και σε περιοχές όπως τη Νότια Αφρική, Ιαπωνία, Χιλή και Κίνα.

Βοτανολογικά μιλώντας, η ελιά ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, στο γένος *Olea* και στο είδος *europaea*. Είναι δέντρο αειθαλές, έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω. Τα άνθη της είναι λευκωπά, μονοπέταλα και πολύ μικρά, σχηματίζουν ταξιανθία βότρυος και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό. Η *Olea europaea* περιλαμβάνει αρκετές ποικιλίες και περίπου 30 από αυτές καλλιεργούνται στην Ελλάδα, όπως είναι η Κορωνέικη, η Καλαμών, το Μανάκι και η Λαδολιά.

Ο καρπός της ελιάς έχει ένα οβάλ σχήμα και διαθέτει ένα τυπικό μέγεθος 2-3εκ. (πλάτος και μήκος). Ο καρπός της ελιάς ουσιαστικά αποτελείται από 3 μέρη, το εξωτερικό στρώμα του περικαρπίου, το μεσοκάρπιο ή σάρκα και το ενδοκάρπιο ή πυρήνας. Κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης το χρώμα του φλοιού γίνεται από ανοιχτό πράσινο σε μωβ και καφέ ή μαύρο. Το μεσοκάρπιο, με μία μαλακή σάρκα, αντιπροσωπεύει το 84-90% της συνολικής μάζας του καρπού, ενώ ο πυρήνας που

περιέχει τον σπόρο μπορεί να διαφοροποιείται από το 13 έως το 30% του βάρους του καρπού. Ο πυρήνας περιέχει 2-4 g ελαίου / 100 g. Το βάρος μιας ελιάς μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως 12 γρ., αν και σε μερικές ποικιλίες μπορεί να ζυγίζει όσο 20 γρ. (Boskou et al., 2006, Niaounakis and Halvadakis, 2006).

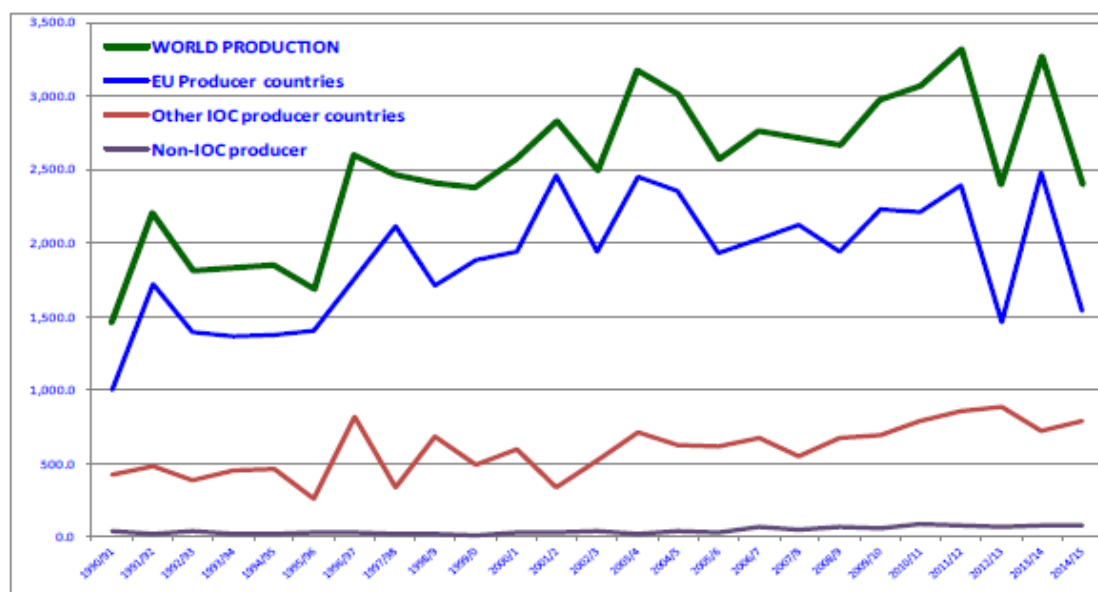
Από **στατιστικής άποψης**, η κατανάλωση του ελαιολάδου παγκοσμίως αυξήθηκε τα τελευταία χρόνια κατά 50% τουλάχιστον και στην Ευρώπη κατά 30% περίπου (Διάγραμμα 1.1.1.1) λόγω κυρίως των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του και της υψηλής διατροφικής του αξίας.



Διάγραμμα 1.1.1.1: Κατανάλωση ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (με μπλε) και παγκοσμίως (με πορτοκαλί) μέσα σε 25 χρόνια, 1990-2014 (www.internationaloliveoil.org).

Παρόμοιες αυξήσεις, αυτή τη φορά, στην παραγωγή ελαιολάδου παρατηρούμε σε παγκόσμια κλίμακα και σε βάθος 25ετίας (Διάγραμμα 1.1.1.2). Η Ευρωπαϊκή Ένωση παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες ελαιολάδου στο κόσμο κατέχοντας ποσοστό 75,7% επί της παγκόσμιας παραγωγής για το έτος 2013. Στον Πίνακα 1.1.1.1 βλέπουμε τις ποσότητες παραγωγής ελαιολάδου ανά χώρα για το 2013/2014 και τις εκτιμήσεις για το 2014/2015. Όποιες εμφανείς διαφοροποιήσεις παρατηρούνται από

τη μία χρονιά στην επόμενη, έχουν σχέση με τις καιρικές συνθήκες που επικρατήσανε ανά χώρα και ενδεχομένως δώσανε μειωμένη ή αυξημένη απόδοση (www.internationaloliveoil.org).



Διάγραμμα 1.1.1.2: Παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (με μπλε) και παγκοσμίως (με πράσινο) μέσα σε 25 χρόνια, 1990-2014 (www.internationaloliveoil.org).

Πίνακας 1.1.1.1: Παραγωγή ελαιολάδου ανά χώρα για το έτος 2013/2014 και με εκτίμηση για το έτος 2014/2015(www.internationaloliveoil.org).

ΧΩΡΕΣ	Παραγωγή 2013/2014 (σε τόνους)	Παραγωγή 2014/2015 (σε τόνους) (εκτίμηση)
Παγκόσμια	3.270.500	2.393.000
Ευρωπαϊκή Ένωση	2.476.500	1.532.000
Ισπανία	1.775.800	825.700
Ιταλία	461.200	302.500
Ελλάδα	131.900	300.000
Πορτογαλία	91.600	90.000
Κύπρος	5.600	<5.600
Κροατία	4.900	<4.900
Γαλλία	4.900	<4.900
Σλοβενία	600	<600
Τουρκία	190.000	190.000

Συρία	165.000	50.000
Μαρόκο	120.000	110.000
Τυνησία	70.000	260.000
Αλγερία	44.000	44.000
Αργεντινή	30.000	6.000
Ιορδανία	30.000	35.000
Λίβανο	20.500	16.500
Ισραήλ	15.000	17.500
Λιβύη	15.000	15.000
Αλβανία	10.500	12.000
Ιράν	5.000	9.000

Η Ελλάδα κρατάει την 3^η θέση στην ελαιοπαραγωγή παγκοσμίως μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Η ελαιοκαλλιέργεια για την Ελλάδα είναι μια παραδοσιακή καλλιέργεια και έρχεται πρώτη στη κατάταξη πάνω από τα σταφύλια και τις ντομάτες (Πίνακας 1.1.1.2).

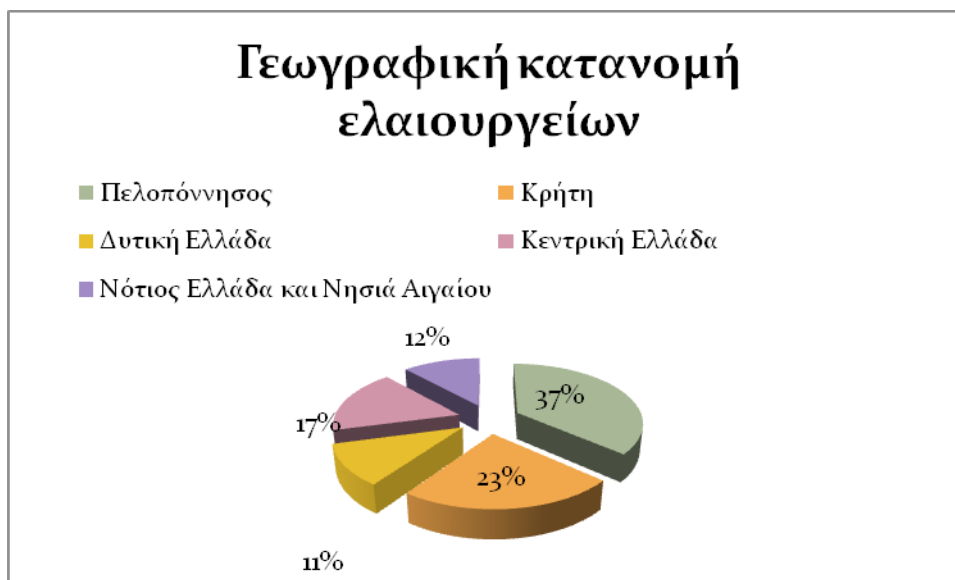
Πίνακας 1.1.1.2: Ετήσια παραγωγή της Ελλάδας (FAO, 2010).

Αύξων αριθμός (Α/α)	Προϊόν	Παραγωγή (σε \$1000)
1	Ελιές	1,449,112
2	Σταφύλια	573,275
3	Τομάτες	519,681
4	Ροδάκινα και νεκταρίνια	348,099
5	Σιτάρι	200,383
6	Πορτοκάλια	148,809
7	Πατάτες	104,391
8	Μήλα	97,854
9	Αμύγδαλα	97,087
10	Ακτινίδια	94,873

1.1.2. Ελαιουργεία

Η ετήσια παραγωγή ελαιοκάρπου στην Ελλάδα κυμαίνεται από 2.050.000 έως 2.646.000 τόνους (FAOSTAT, 2000-2007) και περίπου σε αυτά τα επίπεδα κυμάνθηκε η παραγωγή και τα επόμενα χρόνια. Η παραγωγή ελαιολάδου από την άλλη κυμαίνεται από 300.000 έως 360.000 τόνους, με μοναδική εξαίρεση τη χρονιά 2013/14 που λόγω κακών καιρικών συνθηκών η παραγωγή έπεσε κατά το ήμισυ (www.internationaloliveoil.org). Όλη αυτή η παραγωγή ελαιολάδου γίνεται από

ελαιουργεία σε όλη τη χώρα με τη Κρήτη και τη Πελοπόννησο να κρατάνε τα ηνία με το 60% της παραγωγής (Διάγραμμα 1.1.2.1, Πίνακας 1.1.2.1).



Διάγραμμα 1.1.2.1: Ποσοστό % της κατανομής ελαιουργείων στην Ελλάδα.

1.1.2.1. Γενική περιγραφή διαδικασίας παραγωγής ελαιολάδου

Παραλαβή καρπού: Μετά τη συγκομιδή οι ελιές παραδίδονται στις μεταποιητικές μονάδες για να διαχωριστούν αρχικά ανάλογα με τη ποικιλία, τον τρόπο συγκομιδής και την κατάσταση τους (υγιείς ή προσβεβλημένες από δάκο). Η μεταφορά γίνεται άμεσα σε πλαστικά τελάρα με οπές για αερισμό ή πλαστικούς σάκους.

Αποφύλλωση, απομάκρυνση ξένων υλών και πλύσιμο: Στη χοάνη παραλαβής ελαιοκάρπου απομακρύνονται τα ξένα σώματα, τα οποία αν τυχόν αλεστούν μαζί με τις ελιές θα αλλάξουν την οξύτητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Έπειτα ακολουθεί πλύσιμο των καρπών για απομάκρυνση χωμάτων και σκόνης.

Πίνακας 1.1.2.1: Νομοί της Ελλάδας με τον μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδεντρων (Γεν. Γραμμ. Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας Ελλάδος)

Νομοί	Αριθμός Ελαιόδεντρων
Μεσσηνίας	13.545.000
Ηρακλείου	13.378.000
Λακωνίας	10.936.000
Λέσβου	7.321.000
Χανίων	6.914.000
Ηλείας	6.382.000
Φθιώτιδας	5.530.000
Ευβοίας	5.106.000
Μαγνησίας	4.627.000
Αιτωλοακαρνανίας	3.718.000
Κέρκυρας	3.718.000
Αχαΐας	3.338.000

Σπάσιμο- άλεση του ελαιοκάρπου: Στα παραδοσιακά ελαιουργεία γίνεται με κυλινδρικές μυλόπετρες ενώ στα σύγχρονα ελαιουργεία η άλεση γίνεται σε μεταλλικούς μύλους, σφυρόμυλους και σπαστήρες με αντίθετα περιστρεφόμενους οδοντωτούς δίσκους ή κυλινδροσπαστήρες.

Μάλαξη της ελαιοζύμης: Βασικό στάδιο επεξεργασίας, όπου μετά την άλεση η ελαιοζύμη αναμιγνύεται στον μαλακτήρα για περίπου 30 λεπτά τόσο ώστε να συνενωθούν τα μικρά σωματίδια ελαίου με τις μεγάλες σταγόνες λαδιού. Ο μαλακτήρας αποτελείται από ανοξείδωτες δεξαμενές με διπλά τοιχώματα που θερμαίνονται από τη κυκλοφορία νερού θερμοκρασίας όχι πάνω από 25° C.

Αραίωση της ελαιοζύμης με νερό θερμοκρασίας μέχρι 30° C και σε ποσότητα μέχρι και το 100% της ποσότητας ανάλογα την ωριμότητα του καρπού.

Εξαγωγή ελαιολάδου: Η παραλαβή του ελαιολάδου γίνεται με επιλογή από τρεις μεθόδους επεξεργασίας. Την παραδοσιακή μέθοδο, τη 2-φασική και την 3-φασική διαδικασία. Οι δύο τελευταίες διαδικασίες γίνονται με χρήση φυγοκεντρικών διαχωριστών (Εικόνα 1.1.1).

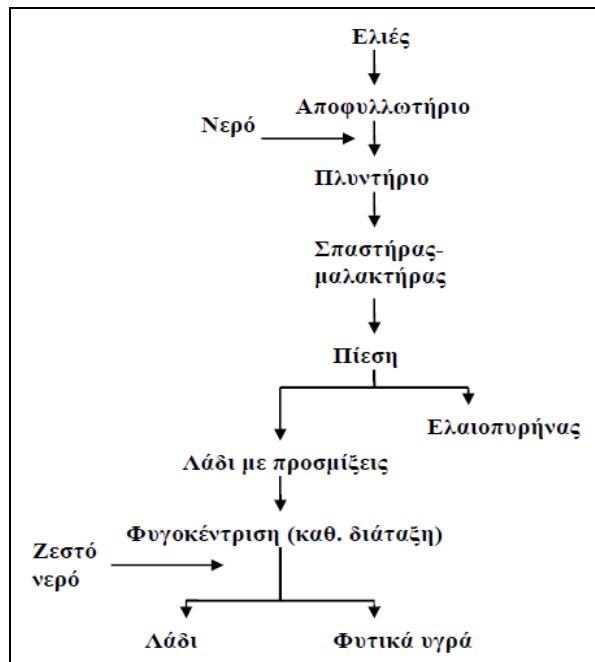
Τέλος, ο **καθαρισμός ελαιολάδου** από στερεά σωματίδια (φλοιός, τμήματα σάρκας και θραύσματα πυρήνα) με χρήση παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων. Και τελικά ο αποχωρισμός του ελαιολάδου από φυτικά υγρά μέσω φυγοκεντρικών διαχωριστών. (www.prosodol.gr)



Εικόνα 1.1.2.1: Φυγοκεντρικός διαχωριστής για την εξαγωγή του ελαιολάδου
(www.prosodol.gr)

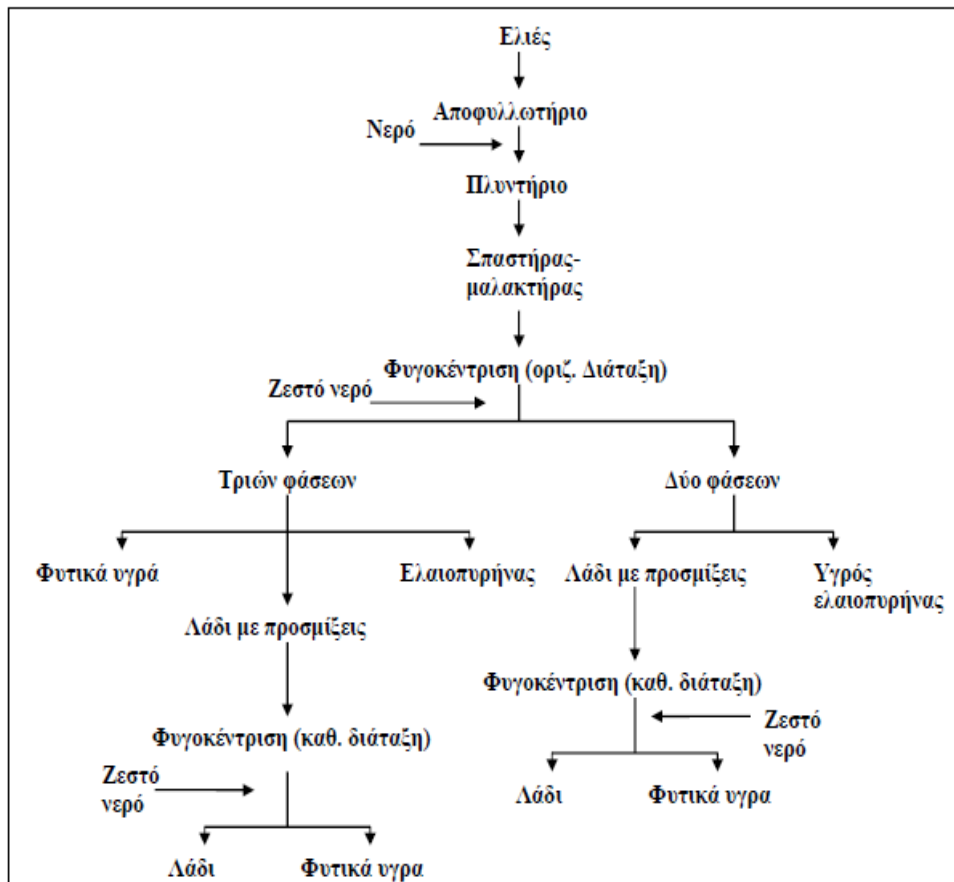
1.1.2.2. Τύποι ελαιουργείων

- Με κλασσικό ή παραδοσιακό σύστημα (πίεσης): με χρήση υδραυλικών πιεστηρίων. Λόγω άσκησης πίεσης γίνεται διαχωρισμός της στερεάς από την υγρή φάση. Η υγρή φάση διέρχεται από ελαιόπανα και μετά από τον διαχωριστήρα όπου και γίνεται η παραλαβή του ελαιολάδου. Ασυνεχής διεργασία, μη συμφέρουσα και γι' αυτό δεν προτιμάται παρ' όλο που το 20% των σημερινών ελαιουργείων στην Ελλάδα το χρησιμοποιεί ακόμα. (Σχήμα 1.1.2.1)



Σχήμα 1.1.2.1. Γραμμή παραγωγής κλασσικού τύπου ελαιουργείου

- Με φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων (συνεχές σύστημα): είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη σήμερα μέθοδος για την εξαγωγή ελαιολάδου, προς αντικατάσταση της επίπονης παραδοσιακής και χρονολογείται από το 1960. Εδώ χρησιμοποιείται η διαφορά του ειδικού βάρους του νερού και του ελαιολάδου. Όπως βλέπουμε και στην *Εικόνα 1.1.1*, ένας φυγοκεντρικός διαχωριστής αποτελείται από ένα οριζόντιο άξονα και οριζόντιο τύμπανο και έναν εξωθητικό κοχλία, που περιστρέφεται με ελαφρά λιγότερες στροφές, αλλά πάντα με την ίδια φορά με το τύμπανο ώστε να μετατοπίζονται συνεχώς οι στερεές ύλες προς το άκρο του τυμπάνου. Είναι συνεχούς λειτουργίας και χωρίζει την ελαιοζύμη σε τρεις φάσεις, την ελαιοπυρήνα, το ελαιόλαδο και τα φυτικά υγρά και νερά. Η ελαιοπυρήνα ωθείται συνεχώς έξω από τον ελαιοδιαχωριστή. Υπάρχει πλήρως αυτοματοποιημένη λειτουργία με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται συνεχής ροή του υλικού έως τα τελικά προϊόντα. Η ελαιοπυρήνα είναι αξιοποιήσιμη και οδηγείται στα πυρηνελαιουργεία. Βέβαια, παρ' ότι πιο απλή και αυτοματοποιημένη μέθοδος σε σχέση με την παραδοσιακή, ωστόσο οι ποσότητες ελαιολάδου που παράγονται δεν είναι σημαντικά μεγαλύτερες και λόγω της χρήσης μεγάλης ποσότητας νερού, παράγονται πολλά υγρά απόβλητα. (Σχήμα 1.1.2.2.)



Σχήμα 1.1.2.2. Γραμμή παραγωγής φυγοκεντρικών συστημάτων.

- Με φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων (επίσης συνεχές σύστημα): ο φυγοκεντρικός διαχωριστήρας δύο φάσεων δημιουργεί μεν λιγότερα υγρά απόβλητα αλλά δημιουργεί και ελαιοπυρήνα με πολύ υγρασία (55-70% σε αντίθεση με το 40-45% του τριφασικού συστήματος) (Tsagaraki et al., Olive mill wastewater treatment) και η οποία δεν είναι εύκολα διαχειρίσιμη από τα υπάρχοντα πυρηνελαιουργεία. Έχει βέβαια το πλεονέκτημα ότι η κατασκευή του κυλίνδρου φυγοκέντρωσης είναι λιγότερο πολύπλοκη, πιο αξιόπιστη και λιγότερο ακριβή σε σχέση με τον αντίστοιχο των τριών φάσεων. Επιπλέον η κατανάλωση ενέργειας και νερού είναι πολύ μικρότερη καθιστώντας πιο οικονομική τη παραγωγή. Τέλος το παραγόμενο ελαιόλαδο είναι περισσότερο και καλύτερο ποιοτικά, με μεγαλύτερη αντοχή στην οξείδωση και καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Ντόλια, 2006). (Σχήμα 1.1.2.2.)

1.1.3. Υποπροϊόντα- Απόβλητα ελαιουργείων

Με βάση όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το διφασικό σύστημα έχει το πλεονέκτημα των κατά πολύ μειωμένων υγρών αποβλήτων και την ύπαρξη κυρίως στερεών αποβλήτων μεν αλλά με αρκετή υγρασία δε. Το τριφασικό σύστημα έχει μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων και αρκετή ποσότητα στερεών με λιγότερη υγρασία, κάτι που φαίνεται στον Πίνακα 1.1.3.1. Δυστυχώς οι ποσότητες και η σύνθεση των αποβλήτων είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν διότι εμπλέκονται παράγοντες όπως (Κυριακόπουλος, 2005, Niaounakis and Halvadakis, 2006):

- ο η ποικιλία της ελιάς και ο χρόνος αποθήκευσης πριν την επεξεργασία
- ο η χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων
- ο το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, ο χρόνος συγκομιδής και το κλίμα
- ο το χρησιμοποιούμενο νερό, το είδος της επεξεργασίας και η διάρκεια αυτής

Πίνακας 1.1.3.1. :Χαρακτηριστικά αποβλήτων ανάλογα την επεξεργασία (Bio-olea).

	Παραδοσιακή	3 Φάσεων	2 Φάσεων
Στερεό υπόλειμμα (kg/tn καρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα (l/tn καρπού)	600	1200	250
Φυτικό νερό των υγρών αποβλήτων (%)	94	90	99
BOD ₅ υγρών αποβλήτων (g/l)	100	80	10
Πολυφαινόλες στα υγρά απόβλητα (mg/l)	203	164	200

- ❖ Στερεά απόβλητα: Ουσιαστικά αναφερόμαστε στο πιο σημαντικό παραπροϊόν, την ελαιοπυρήνα η οποία αποτελείται από νερό (25-27%), κυτταρίνη και ημικυτταρίνη (35-36%), υπολειμματικό έλαιο (6-9%) και ανόργανα στερεά (2-2,5%) (Niaounakis et al., 2004). Τα στερεά υποπροϊόντα είναι πλούσια σε κάλιο, αρκετό οργανικό άζωτο, και φτωχά σε φώσφορο και μικροστοιχεία (Alburquerque et al., 2004).

Η ελαιοπυρήνα μπορεί να μεταφερθεί στα πυρηνελαιουργεία για επεξεργασία για παραγωγή πυρηνελαίου και καύσιμης ύλης.

- ❖ Αέρια απόβλητα: Τα μοναδικά αέρια που παράγονται κατά την παραγωγική διαδικασία των ελαιουργείων είναι τα μηχανήματα εσωτερικής καύσης και τα καυσαέρια καύσης του ελαιοπυρήνα. Το γεγονός ότι συνήθως τα ελαιουργεία είναι εκτός αστικών περιοχών, δεν υπάρχει επιβάρυνση για τις κατοικημένες περιοχές. Συγκεκριμένα θεωρείται αμελητέα αν το ελέγξουμε σε σχέση με τον όγκο του ατμοσφαιρικού αποδέκτη.

Πίνακας 1.1.3.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Hafidi et al., 2005).

Principal physico-chemical characteristics of the raw olive mill wastewater	
Parameters	Values
pH	4.7
Electric conductivity (ms/cm)	16.2
Dry matter (g/L)	85.9
Ash (g/L)	16.6
Chemical oxygen demand (g of O ₂ /L)	161 ± 5
Organic carbon (% M.S.)	47 ± 0.27
Total phenols (g/L) ^a	4 ± 0.01
Total Kjeldahl Nitrogen (mg/L)	588 ± 0.04
Ratio C/N	67.4
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	108
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	126
Total phosphorus (mg/L)	110

^a Phenols are expressed as catechin.

- ❖ Υγρά απόβλητα: τα απόβλητα αυτά (Υ.Α.Ε.) ή αλλιώς κασίγαρος είναι τα πιο σημαντικά αφού οι ποσότητες είναι τεράστιες και το οργανικό φορτίο και όχι μόνο μεγάλο. Όπως βλέπουμε στον Πίνακα 1.1.3.2. το pH των Υ.Α.Ε. είναι αρκετά όξινο, το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο σε σημαντική ποσότητα, οι φαινολικές ενώσεις εμφανείς, το άζωτο (οργανικό και μη) εξίσου εμφανές. Στον Πίνακα 1.1.3.3. συνοψίζεται από διάφορες πηγές η σύσταση των Υ.Α.Ε. και παρατηρούμε τα προαναφερθέντα μαζί με ιχνοστοιχεία όπως κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο και φώσφορος. Συμπεραίνουμε ότι απόβλητο με το επιβαρυσμένο αυτό φορτίο δεν μπορεί να διατεθεί στο περιβάλλον χωρίς κάποια επεξεργασία.

Πίνακας 1.1.3.3. Συνοπτικά από διάφορες πηγές η σύσταση των Υ.Α.Ε.(Tsagaraki et al., 2007).

Property	Reference							
	Azbar et al. (2004)	Niaounakis and Halvadakis (2004)	Borsani and Ferrando (1996)	Paredes et al. (1999)	Sierra et al. (2001)	Galiatsatou et al. (2002)	Eroglu et al. (2004)	Al-Malah et al. (2000)
pH	3-5.9	4-6		4.8-5.5	4.5-6	4.9-6.5	4.86	4.52
Water (%)			83					
BOD (g/L)	23-100	35-110			35-100	15-120	17.88	13.2
COD (g/L)	40-220	40-220			40-195	30-150	72.20	320
Carbohydrates (%)			2-8	3.37-32.91		2-8		
Polyphenols (g/L)	0.002-80	0.5-24		1.32-3.99%	3-24	1.5-2.4	0.13	3.12
Fats, oils (g/L)	1-23		0.03-1%	0.55-11.37%	0.3-23	1.3		
Pectins (%)			1-1.5			1-1.5		
VOC (g/L)		25-45						
TS (g/L)	1-102.5						42.24	
SS (g/L)							3.48	2.17
N (g/L)	0.3-1.2			0.58-1.13%	5-15	0.5-2%		
K (g/L)		4	0.87% K ₂ O	3.30-6.94%	2.7-7.2		7.81	
P (g/L)			0.22% P ₂ O ₅	0.06-0.32%	0.3-1.1			
Ca (g/L)				0.32-0.53%	0.12-0.75		0.55	
Na (g/L)				0.04-0.48%	0.04-0.90		0.41	
Mg (g/L)				0.06-0.22%	0.10-0.40		0.28	

Περιβαλλοντικές επιπτώσεις των Υ.Α.Ε.:

Εκτός από την παρουσία των τοξικών πολυφαινολών, τα υγρά απόβλητα μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα, ιδίως στα ύδατα, λόγω των χαμηλών τιμών pH

που έχουν και την υψηλή περιεκτικότητά τους σε άλατα, οργανική ύλη και οργανικών οξέων (D'Annibale et al., 2003). Από μικροβιολογική άποψη, τα υγρά απόβλητα περιέχουν κυρίως βακτήρια, αλλά και ζύμες και μύκητες, ενώ δεν υπάρχουν σε αυτά παθογόνοι μικροοργανισμοί. Γενικά η διάθεση των αποβλήτων μπορεί να καταστρέψει την ικανότητα αυτοκαθαρισμού των συστημάτων και να δημιουργήσει μια σειρά από προβλήματα όπως:

- ο Οπτική ρύπανση και προβλήματα δυσοσμίας και Επιπτώσεις στα ύδατα και τους υδρόβιους οργανισμούς.
- ο Προβλήματα ευτροφισμού.
- ο Δημιουργία ανοξικών συνθηκών.
- ο Αδιαπέραστο φιλμ (συσσωρευμένα λίπη στην επιφάνεια των υδάτων που εμποδίζουν τις ακτίνες του ήλιου να εισχωρήσουν στην υδάτινη στήλη) (Kapellakis et al., 2007).
- ο Χρωματισμό φυσικών υδάτων (λόγω της οξειδωσης και του πολυμερισμού των ταννινών) (Kapellakis et al., 2007).

Επίσης θα έχει επιπτώσεις στο έδαφος με αλλαγές στο πορώδες του εδάφους (Niaounnakis and Halvadakis, 2006), με μικροβιοστατική και μικροβιοκτόνο δράση (Gonzalez et al, 1990) και φυτοτοξική δράση (D'Annibale et al., 2003).

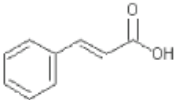
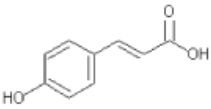
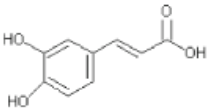
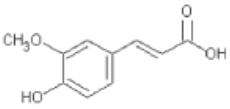
Φαινολικές ενώσεις στα Υ.Α.Ε.:

Οι ελιές είναι πλούσιες σε απλές και σύνθετες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι ενώσεις του δευτερεύοντος μεταβολισμού του φυτού και στις οποίες αποδίδονται αρκετές αντιοξειδωτικές και έναντι των ελευθέρων ριζών ιδιότητες. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης του ελαιολάδου, λόγω των χημικών χαρακτηριστικών των πολυφαινολών που είναι υδατοδιαλυτές, το μεγαλύτερο μέρος αυτών πάει στην υδατική φάση δηλαδή στα Υ.Α.Ε. Το φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, τόσο από ποιοτική και ποσοτική άποψη, ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως το είδος της ελιάς, το στάδιο της ωριμότητας, και το πιο σημαντικό, το είδος της διαδικασίας παραγωγής. Το σύστημα εξαγωγής δεν φαίνεται

να μεταβάλλει ποιοτικά την φαινολική σύνθεση του ελαιολάδου, αλλά επηρεάζει τη συγκέντρωσή του, με το υγρό απόβλητο του διφασικού συστήματος να είναι το πιο πλούσιο σε ποσότητα (Lesage-Meesen et al., 2001).

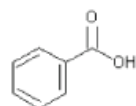
Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα διακρίνονται, α) στις απλές φαινολικές ενώσεις, που περιλαμβάνουν ταννίνες μικρού μοριακού βάρους και φλαβονοειδή και β) στις πολυφαινόλες οι οποίες περιλαμβάνουν σκούρου χρώματος πολυμερή και προκύπτουν σαν αποτέλεσμα του πολυμερισμού και της οξείδωσης των απλών φαινολικών ενώσεων (Hamdi, 1992). Στο παρακάτω Σχήμα 1.1.3.1. παρουσιάζονται οι φαινολικές ενώσεις που έχουν παρατηρηθεί περισσότερο στα υγρά απόβλητα. (Justino et al., 2012, El-Abbassi et al., 2012).

Σχήμα 1.1.3.1.: Οι φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί σε αφθονία στα Υ.Α.Ε. με το κατά IUPAC όνομα τους, το μοριακό βάρος και τη δομή τους (Justino et al., 2012).

Cinnamic acid and derivatives		
(E)-3-phenylprop-2-enoic acid (148.17) C ₉ H ₈ O ₂		
<u>p-Coumaric acid</u> 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid (164.16) C ₉ H ₈ O ₃	<u>Caffeic acid</u> 3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid (180.16) C ₉ H ₈ O ₄	<u>Ferulic acid</u> (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (194.18) C ₁₀ H ₁₀ O ₄
		

Benzoic acid and derivatives

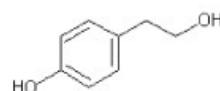
Benzoic acid (122.12)
C₇H₆O₂



<p><u>Vanillic acid</u></p> <p>4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (168.15) C₈H₈O₄</p>	<p><u>Gallic acid</u></p> <p>3,4,5-trihydroxybenzoic acid (170.12) C₇H₆O₅</p>	<p><u>Veratric acid</u></p> <p>3,4-dimethoxybenzoic acid (182.17) C₉H₁₀O₄</p>
<p><u>Syringic acid</u></p> <p>4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (198.17) C₉H₁₀O₅</p>	<p><u>Protocatechuic acid</u></p> <p>3,4-dihydroxybenzoic acid (154.12) C₇H₆O₄</p>	<p><u>Hydroxybenzoic acid</u></p> <p>4-hydroxybenzoic acid (138.12) C₇H₆O₃</p>

Tyrosol and derivatives

4-(2-hydroxyethyl)phenol (138.16)
C₈H₁₀O₂



<p><u>Hydroxytyrosol</u></p> <p>4-(2-hydroxyethyl)-1,2-benzenediol (154.16) C₈H₁₀O₃</p>	<p><u>4-Hydroxyphenylacetic acid</u></p> <p>2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid (152.15) C₈H₈O₃</p>
--	---

1.1.4. Τεχνολογίες για την διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείου

➤ Φυσικοχημικές μέθοδοι:

1. Εξουδετέρωση, καθίζηση: Προσθήκη χημικών με σκοπό τη δημιουργία στερεού κλάσματος. Με την αφαίρεσή του επιτυγχάνεται μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, των λιπών και των αιωρούμενων στερεών (Tsagaraki et al., 2006).
2. Οξείδωση: Κυρίως με τη χρήση όζοντος και υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς επιτυγχάνεται υψηλός βαθμός οξείδωσης σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία περιβάλλοντος (Paraskeva and Diamantopoulos, 2006).

3. Θερμικές μέθοδοι: Η εφαρμογή τους γίνεται είτε με τεχνητά μέσα, με σημαντικότερες μεθόδους την αεριοποίηση, τη καύση και τη πυρόλυση, είτε με φυσικό τρόπο (αέρα, ήλιο) σε λίμνες εξάτμισης (Paraskeva and Diamantopoulos, 2006).
 4. Χρήση επιλεγμένων μεμβρανών: Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει του διαφορετικού ρυθμού ροής κάθε είδους μέσα από την μεμβράνη (Paraskeva et al., 2006).
 5. Φυγοκέντριση: Διαχωρισμός σε φάσεις και ανάκτηση λαδιού (Mitrakas et al., 1996).
 6. Φωτοκατάλυση: Δράση κυρίως υδροξυλίων που παράγονται κατά τη διεργασία, με αποτέλεσμα οξείδωση της οργανικής ύλης και καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών (Azabou et al., 2007).
- Απευθείας διάθεση στο έδαφος: Βασίζεται στη θεωρία ότι το έδαφος έχει τη δυνατότητα βιοαποδόμησης μέρους του οργανικού φορτίου των αποβλήτων, ενώ λόγω της ρυθμιστικής του ικανότητας δεν επηρεάζεται πολύ από το όξινο pH και την ηλεκτρική αγωγιμότητα του αποβλήτου. Με τη λογική σαφώς ότι δεν υπάρχουν φυτά στη περιοχή που θα επηρεαστούν και δεν θα μολυνθούν οι υπόγειοι υδροφορείς.
- Βιολογικές: είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον και μέσω αυτής της επεξεργασίας απομακρύνεται η οργανική ύλη και τα ανόργανα συστατικά (Paraskeva and Diamantopoulos, 2006).
1. Αναερόβια: Αναερόβια χώνευση χαρακτηρίζεται η βιολογική διεργασία κατά την οποία οργανική ύλη μετατρέπεται κυρίως σε μεθάνιο (CH₄) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) με τη συνδυασμένη δράση μεικτού μικροβιακού πληθυσμού, υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Η αναερόβια επεξεργασία αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου από ιδιαίτερα ρυπασμένα υγρά απόβλητα (Gray, 2004). Η αναερόβια αποδόμηση πραγματοποιείται σε αεροστεγή δοχεία από βακτήρια τα οποία δεν απαιτούν οξυγόνο για να αποσυνθέσουν οργανικές ενώσεις και επιτρέπει την ανάκτηση ενός σημαντικού κλάσματος, χημικής ενέργειας καθώς και μεθανίου και παράγει σημαντικά μικρότερες ποσότητες ιλύος σε σχέση με τις αερόβιες

διαδικασίες. Η αναερόβια επεξεργασία γίνεται όμως με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με την αερόβια, επειδή αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν χαμηλότερη μεταβολική δραστηριότητα.

2. Αερόβια: Χρήση αερόβιων μικροοργανισμών και μυκήτων [Αντικείμενο με το οποίο θα ασχοληθώ εκτενώς στα επόμενα κεφάλαια] για την αποδόμηση της οργανικής ύλης. Εναλλακτικά χρησιμοποίηση αποβλήτων και μικροοργανισμών για τη παραγωγή βιολιπάσματος (Balis & al. 1996, Piperidou & al. 2000) και compost (Roig & al. 2001).

1.2. ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες αναγνωρίζονται ως ξεχωριστό βασίλειο έμβιων οργανισμών το οποίο περιλαμβάνει ευκαρυωτικούς μη φωτοσυνθέτοντες, εννοώντας ετερότροφους οργανισμούς, οι οποίοι καλύπτουν τις ανάγκες τους σε άνθρακα μέσω άλλων οργανισμών και ανάλογα με ποιο τρόπο το κάνουν ονομάζονται σαπροτροφικά, βιοτροφικά ή συμβιωτικά. Η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους ποικίλει σημαντικά αλλά στην πλειονότητα τους περιέχουν χιτίνη και γλυκάνες και στερούνται οργανιδίων κίνησης. Κάποιοι από αυτούς είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, αλλά οι περισσότεροι σχηματίζουν υφές οι οποίες συγκροτούν το βλαστικό μυκήλιο επί του οποίου συνήθως παράγονται σπόρια, εγγενώς ή αγενώς ελεύθερα επί υφών ή εντός πολύπλοκων μορφολογικά ευδιάκριτων αναπαραγωγικών δομών (Μπαλής, 1993, Ζερβάκης, 2011)

Θαλλός ονομάζεται το βλαστικό σώμα των πολυκύτταρων μυκήτων και αποτελείται από υφές, διακλαδιζόμενα προς όλες τις κατευθύνσεις δηλαδή σωληνοειδή νημάτια, το σύνολο των οποίων καλείται μυκήλιο. Οι υφές μπορεί να είναι πολυκύτταρες και να φέρουν εγκάρσια διαφράγματα, τα λεγόμενα σέπτα, τα οποία κυρίως απαντώνται στους Ασκομύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Κοινοκυτταρικές υφές, δηλαδή χωρίς

σέπτα συναντάμε κυρίως στους Ζυγομύκητες και στους Χυτριομύκητες (Ζερβάκης, 2011).

Οι μύκητες με βάση τις τροφικές τους απαιτήσεις χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Σαπροτροφικοί ονομάζονται αυτοί που αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ύλη και αποτελούν σημαντικοί παράγοντες αποσύνθεσης της ύλης στη φύση.
2. Παρασιτικοί είναι αυτοί που αναπτύσσονται σε βάρος του ξενιστή τους και μπορεί να επιφέρουν μέχρι και το θάνατο στον οργανισμό που παρασιτούν.
3. Συμβιωτικοί είναι όσοι αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με άλλους οργανισμούς. Μια τέτοια σχέση ανάμεσα σε μύκητα και ριζικό σύστημα φυτού ονομάζεται μυκόρριζα ενώ η συμβίωση με φύκη δημιουργούν τις λειχήνες.

Η εγγενής αναπαραγωγή των μυκήτων διέπεται από μία αλληλουχία φάσεων, την πλασμογαμία, καρυογαμία και τη μείωση, ενώ τα σπόρια που παράγονται φέρουν το όνομα της κατηγορίας των μυκήτων που ανήκουν.

Είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί εκτός από μερικές εξαιρέσεις προαιρετικά αναερόβιων (ζύμες) και κάποια είδη Χυτριομυκήτων που είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι.

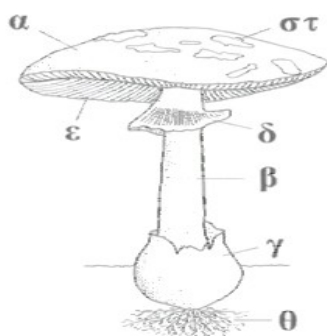
Η οικολογική προσφορά των μυκήτων εκφράζεται μέσω : της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης, της συμμετοχής τους στη δέσμευση του αζώτου και του άνθρακα, της σύνθεσης χουμικών ενώσεων, της δημιουργίας ωφέλιμων για το φυτό συμβιωτικών σχέσεων (μυκόρριζες), της αποτοξικοποίησης του εδάφους, αποτελώντας δείκτες φυσικής κατάστασης βιοτόπων και τέλος ώντας τροφή για άλλους οργανισμούς.

Αναφορικά με την οικονομική τους σημασία οι μύκητες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αντιβιοτικών, αμινοξέων, τυριών, ενζύμων (όπως αμυλάσες, χιτινάσες, λιγνινάσες, λιπάσες, υπεροξειδάσες και φαινολοξειδάσες), μανιταριών, εναλλακτικών καυσίμων (αιθανόλη, βιοαέριο), βιταμινών, ενώ συμβάλλουν στην βιοαποικοδόμηση

τοξικών αποβλήτων και στη βιομετατροπή υπολειμμάτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Ζερβάκης, 1998).

1.2.1. Βασιδιομύκητες

Η συστηματική ταξινόμηση των μυκήτων ακολουθεί την εξής ταξινομική βαθμίδα: Βασίλειο → Φύλο → Κλάση → Τάξη → Οικογένεια → Γένος → Είδος. Οι βασιδιομύκητες αποτελούν ένα φύλο του βασιλείου των μυκήτων, που περιλαμβάνει περίπου το 25% του συνόλου των μυκήτων. Οι Kirk & Farrell το 1987 είπαν ότι οι πιο αποδοτικοί αποδομητές της ομάδας των μυκηλιακών μυκήτων είναι οι βασιδιομύκητες. Υπάρχουν τρεις τύποι μυκήτων που ζουν πάνω σε οργανική ύλη (ξύλο) που αποσυντίθεται και αποδομούν ένα ή περισσότερα συστατικά της: οι μύκητες ελαφριάς σήψης, οι μύκητες καστανόχρωμης σήψης και οι μύκητες λευκής σήψης.



Εικόνα 1.2.1.1: Σχηματική αναπαράσταση βασιδιοκαρπίου: α. Πίλος, β. Στύπος, γ. Βόλβα, δ. Δακτύλιος, ε. Ελάσματα, στ. Υπολείμματα καθολικού πέπλου.

1.2.2. Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης είναι νηματοειδείς μύκητες οι οποίοι ζουν και αναπτύσσονται πάνω σε οργανική ύλη (ξύλο κ.α.) που βρίσκεται σε κατάσταση αποσύνθεσης. Ανήκουν στους ανώτερους μύκητες και συγκεκριμένα στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των μυκήτων είναι η

ικανότητά τους να αποδομούν τη λιγνίνη, τη δεύτερη πιο άφθονη οργανική ουσία πάνω στη γη μετά την κυτταρίνη (Hatakka 2001, Hofrichter, 2002). Η αποδόμηση της λιγνίνης ξεκινάει στο τέλος της πρωτογενούς ανάπτυξης κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό ελλείπει θρεπτικών συστατικών όπως το άζωτο, το θείο ή ο άνθρακας. Ονομάζονται μύκητες λευκής σήψης, λόγω του λευκού και ινώδους υπολείμματος που απομένει πάνω στην αποσυνθεμένη οργανική ύλη μετά τη δράση τους. Το ιδιαίτερο λιγνινολυτικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία επίμονων και τοξικών ενώσεων. Η μυκητιακή προσβολή είναι μια οξειδωτική και μη εξειδικευμένη διεργασία, κατά την οποία διασπώνται αρωματικοί δακτύλιοι, δημιουργούνται νέες καρβονυλικές ομάδες και ελαττώνεται το ποσοστό των μεθοξυ, φαινολικών και αλειφατικών ομάδων της λιγνίνης. Οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνίνης αλλά εκκρίνουν και κυτταρινάσες, ξυλανάσες και άλλες ημικυτταρινάσες.

1.2.2.1. *Abortiporus biennis*

Αυτός ο μύκητας λευκής σήψης ανήκει στην κλάση Agaricomycetes, στην τάξη Polyporales, στην οικογένεια Meruliaceae, στο γένος *Abortiporus* και τέλος στο είδος *Biennis*.

Μορφολογικά, ο πύλος συχνά καλύπτεται από την πορώδη επιφάνεια, αλλά όταν είναι προσδιορίσιμος έχει διάμετρο έως και 20 cm, σε σχήμα νεφρού, με ημικυκλικό ή ακανόνιστο σχήμα, χρώμα υπόλευκο έως ανοιχτό καφέ ή κοκκινωπό καφέ και υφή βελούδινη ή αρκετά ομαλή. Η πορώδης επιφάνεια είναι υπόλευκη, με αποχρώσεις του καφέ. Οι πόροι είναι δαιδαλώδεις ή ακονόστοι με διάμετρο 1-4 mm. Οι σωλήνες έχουν βάθος έως 6 mm. Ο στύπος συχνά απουσιάζει ή είναι ακαθόριστος αλλά όταν υπέρχει είναι έως 6 cm. Η σάρκα είναι λευκή έως ροδόχρουν καφέ και σκληρή.

Ανήκει σε μια εξαιρετικά εξειδικευμένη ομάδα μικροοργανισμών. Είναι ένας από τους πιο γνωστούς παραγωγούς ειδικών λιγνινο-τροποποιητικών ενζύμων όπως είναι η λακκάση, η υπεροξειδάση μαγγανίου και η λιγνίνη υπεροξειδάση. Αυτά τα ένζυμα, όπως θα πούμε και παρακάτω, εκτός από τη δυνατότητα αποδόμησης που έχουν, έχουν και πολλές χρήσιμες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

1.2.2.2. Phanerochaete Chrysosporium

Αυτός ο μύκητας λευκής σήψης ανήκει στην κλάση Agaricomycetes, στην τάξη Polyporales, στην οικογένεια Phanerochaetaceae, στο γένος Phanerochaete και τέλος στο είδος Chrysosporium.

Μορφολογικά είναι ένας μύκητας με σκληρό σώμα και υφή κρούστας. Το δίκτυο υφών έχει κάποια διακλάδωση, με διαμέτρους που κυμαίνονται από 3-9 μm. Στα άκρα των υφών στηρίζονται χλαμυδοσπόρια, σπόρια με παχιά τοιχώματα κυμαινόμενα από 50-60 μm.

Phanerochaete chrysosporium είναι ένα πολύ καλό μοντέλο μύκητα λευκής σήψης, λόγω της εξειδικευμένης ικανότητά του να αποικοδομεί την άφθονη αρωματική πολυμερή λιγνίνη, ενώ αφήνει την κυτταρίνη σχεδόν άθικτη. Το Phanerochaete chrysosporium απελευθερώνει εξωκυτταρικά ενζύμα για να διαλύσει τη περίπλοκη τρισδιάστατη δομή της λιγνίνης σε συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον μεταβολισμό της. Λόγω των εξειδικευμένων ικανοτήτων βιοαποδόμησης του Phanerochaete chrysosporium, γίνεται εκτεταμένη έρευνα για να κατανοήσουμε το μηχανισμό, προκειμένου να ενισχυθεί η βιοαποκατάσταση ενός ευρέως φάσματος ρύπων. Ως εκ τούτου, Phanerochaete chrysosporium είναι το πρώτο μέλος από τους Βασιδιομύκητες του οποίου το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχηθεί.

Η βιωσιμότητα του μύκητα αυτού είναι σε μέτριες προς υψηλές θερμοκρασίες, συγκεκριμένα 40 °C, χαρακτηριστικό το οποίο είναι πολύ χρήσιμο από βιοτεχνολογικής άποψης.

1.2.2.3. Ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι η δεύτερη σε αφθονία οργανική ένωση μετά την κυτταρίνη στη φύση. Είναι ένα τρισδιάστατο, σφαιρικό, ακανόνιστο, αδιάλυτο, υψηλού μοριακού βάρους (>10000) πολυμερές, αποτελούμενο από υπομονάδες φαινυλοπροπανίου, χωρίς αλυσίδες κανονικά επαναλαμβανόμενων μονάδων, ή κάποιους δεσμούς που μπορούν να υδρολύονται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά. Οι βασικές πύοδρομες

μονομερείς μονάδες της λιγνίνης έχουν κοινή τη δομή τύπου φαινυλοπροπανίου και διαφέρουν ως προς τον αριθμό των μεθοξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου. Στα φυτά η λιγνίνη συνδέεται με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη σχηματίζοντας μία φυσική ασπίδα για το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Η λιγνίνη είναι υπεύθυνη για την ακαμψία των φυτών και την ανθεκτικότητά τους σε μηχανικές πιέσεις και μικροβιακές επιθέσεις (Ταούκης κ.α., 2009).

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίαρχα υπεύθυνοι για την αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης είναι οι μύκητες και οι πιο ισχυροί αποικοδομητές αυτής της κατηγορίας είναι οι βασιδιομύκητες. Οι μύκητες έχουν δύο είδη εξωκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων: α) ένα υδρολυτικό σύστημα, που παράγει υδρολάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση των πολυσακχαριτών και β) ένα οξειδωτικό σύστημα, που αποδομεί τη λιγνίνη και διανοίγει τους φαινολικούς δακτυλίους (Sánchez, 2009). Αυτά τα ένζυμα λέγονται και λιγνινάσες. Οι λιγνινάσες μπορούν να χωριστούν σε α)φαινολικές οξειδάσες, στις οποίες ανήκει η λακκάση (Lac) και β)υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) (Van Aken and Agathos, 2001).

1.2.2.4. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων

Η εφαρμογή των λιγνινολυτικών ενζύμων στη βιομηχανία και στη βιοτεχνολογία είναι ολοένα αυξανόμενη λόγω της χρήσης τους σε μία μεγάλη ποικιλία διεργασιών. Τα λιγνινολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν δυνατότητες εφαρμογής σε πάρα πολλούς τομείς, μεταξύ των οποίων τα τρόφιμα, τα καύσιμα, η γεωργία κ.α. Το λιγνινολυτικό σύστημα των μυκητών λευκής σήψης παρουσιάζει πλεονέκτημα έναντι των φυσικών και χημικών μεθόδων επεξεργασίας καθώς τα λιγνινολυτικά ένζυμα είναι βιοδιασπώμενοι καταλύτες και οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ήπιες συνθήκες.

✓ Βιομηχανία τροφίμων

Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες διεργασίες που ενισχύουν ή τροποποιούν το χρώμα των τροφίμων και των ποτών, μέσω της εξάλειψης των ανεπιθύμητων φαινολικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για την αμαύρωση και τη θολερότητα σε μπίρα, κρασί και χυμό φρούτων (Maciel et al., 2010).

✓ Βιομηχανία υφασμάτων/χρωστικών

Οι υπάρχουσες διεργασίες επεξεργασίας των αποβλήτων από τις βιομηχανίες χρωστικών δεν είναι αποτελεσματικές και οικονομικές. Για αυτό το λόγο, η ανάπτυξη των διεργασιών που βασίζονται στη λακκάση αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη λύση, λόγω της δυνατότητας αποδόμησης χρωστικών με ποικιλία χημικής δομής συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στη βιομηχανία. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης έχει επίσης αξιολογηθεί στον αποχρωματισμό διάφορων συνθετικών βαφών. Τέλος, η υπεροξειδάση του μαγγανίου μπορεί εξ' ίσου να αποδομήσει χρωστικές ουσίες (Maciel et al., 2010).

✓ Βιομηχανία χαρτιού

Η παρασκευή χαρτιού περιλαμβάνει τη πολτοποίηση και τη λεύκανση. Στην πολτοποίηση, οι πρώτες ύλες μετατρέπονται σε ίνες με μηχανικές και χημικές μεθόδους. Ακολουθεί η διαδικασία της λεύκανσης με κατανάλωση τεράστιων ποσοτήτων χημικών, τα οποία αποτελούν πηγή μόλυνσης για το περιβάλλον. Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιο-πολτοποιητικό μέσο στην επεξεργασία του ξύλου καθώς μπορεί να αποικοδομήσει μερικώς τη λιγνίνη. Η λακκάση που παράγεται από τον *Trametes versicolor* έχει μελετηθεί ευρέως για χρήση στη βιομηχανία χαρτιού (Agora and Sharma, 2010).

✓ Βιοεξυγίανση

Η λακκάση συμμετέχει στη βιοεξυγίανση ρυπασμένων περιοχών. Η βιοεξυγίανση είναι μια τεχνική εξυγίανσης, που χρησιμοποιεί βιολογικές διεργασίες για να καταστρέψει ή να μετατρέψει τους ρύπους. Η λακκάση μπορεί να αποδομήσει τις ξενοβιοτικές ενώσεις, που αποτελούν μία μεγάλη πηγή μόλυνσης του εδάφους. Επιπλέον, οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) αποδομούνται από τη λακκάση και αυτοί ανήκουν στην κατηγορία των επίμονων τοξικών ενώσεων και έχουν σοβαρές επιπτώσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον λόγω των μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους. Σημαντικότερη πηγή ρύπανσης από PAHs είναι η βιομηχανία πετρελαίου (Maciel et al., 2010).

✓ Οργανικές, ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές

Ο ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση λακκάσης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον αφού η λακκάση έχει την ικανότητα να παράγει κατευθείαν πολυμερή που είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω συμβατικών χημικών συνθέσεων. Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές στην οργανική σύνθεση, όπως η οξείδωση λειτουργικών ομάδων, η σύζευξη των φαινολών και των στεροειδών, ως ιατρικοί παράγοντες (αναισθητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά και ηρεμιστικά), στην δημιουργία δεσμών άνθρακα-αζώτου, στη σύνθεση περίπλοκων φυσικών προϊόντων και στις βιομηχανίες καλλυντικών (Maciel et al., 2010)

1.3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Η φασματοσκοπία είναι ένας γενικός όρος για την περιοχή της επιστήμης, η οποία ασχολείται με την επίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Αρχικά ενδιέφερε η επίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη, αλλά σήμερα η έννοια της φασματοσκοπίας έχει διευρυνθεί και περιλαμβάνει φαινόμενα αλληλεπίδρασης της ύλης και με άλλες μορφές ενέργειας.

Απορρόφηση ακτινοβολίας: Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται μέσα από ένα στρώμα στερεού, υγρού ή αερίου, είναι δυνατόν να απομακρυνθούν εκλεκτικά με απορρόφηση μερικές συχνότητες ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας στα άτομα, τα ιόντα ή τα μόρια, τα οποία συνθέτουν το δείγμα. Η απορρόφηση προάγει αυτά τα σωματίδια από τις κανονικές ή βασικές καταστάσεις τους σε μία ή περισσότερες διεγερμένες καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας. Σύμφωνα με τη κβαντική θεωρία, τα άτομα, μόρια ή ιόντα έχουν περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών επιπέδων και έτσι για να απορροφηθεί ακτινοβολία πρέπει το φωτόνιο το οποίο θα προκαλέσει τη διέγερση, να έχει ακριβώς την ενέργεια που αντιστοιχεί στη διαφορά ενεργειών της βασικής και μιας διεγερμένης κατάστασης του σωματιδίου που το απορροφά. Επειδή αυτές οι διαφορές ενεργειών είναι μοναδικές για κάθε σωματίδιο, η μελέτη των συχνοτήτων της απορροφούμενης ακτινοβολίας παρέχει ένα μέσο για το χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος μιας ουσίας. Έτσι παρέχονται χαρακτηριστικά φάσματα της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα για την ουσία.

1.3.1. Φαματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

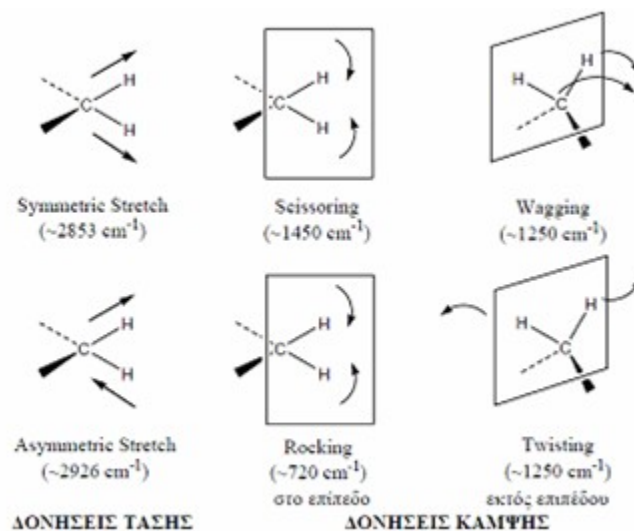
Η υπέρυθη περιοχή του φάματος περιλαμβάνει ακτινοβολίες, των οποίων οι κυματαριθμοί κυμαίνονται από 12800 έως 10 cm^{-1} ή τα μήκη κύματος τους από 0,78 έως 1000 μm . Από τη πλευρά τόσο των εφαρμογών όσο και της οργανολογία, το φάσμα υπέρυθρου χωρίζεται σε εγγύς ($12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), μέσο ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) και άπω υπέρυθρο ($200\text{-}10\text{ cm}^{-1}$). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι αυτή των $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

Ένα μόριο, για να απορροφήσει υπέρυθη ακτινοβολία, πρέπει να υποστεί μεταβολή της διπολικής του ροπής ως αποτέλεσμα της δονητικής ή της περιστροφικής κίνησης του. Μόνο κάτω από αυτές τις συνθήκες, το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μόριο και να προκαλέσει αλλαγές στο μέγεθος κάποιων από τις κινήσεις του. Όταν δονούνται ή περιστρέφονται ομοπυρηνικά διατομικά μόρια όπως τα O_2 , N_2 , Cl_2 , δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή. Κατά συνέπεια τέτοιου είδους μόρια δεν απορροφούν στην υπέρυθη περιοχή του φάματος. Με εξαίρεση λίγων μορίων αυτού του είδους, όλα τα άλλα μόρια απορροφούν υπέρυθη ακτινοβολία.

Δονήσεις μορίων: Οι σχετικές θέσεις των ατόμων σε ένα μόριο δεν είναι απόλυτα καθορισμένες, αλλά κυμαίνονται συνεχώς ως συνέπεια των πολλών διαφορετικών ειδών δονήσεων και περιστροφών γύρω από τους δεσμούς τους με το μόριο.

Υπάρχουν δύο βασικές μορφές δονήσεων:

- Δονήσεις έκτασης (stretching): χαρακτηρίζονται από μία συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων, κατά μήκος του δεσμού τους χωρίς να αλλάζουν κατεύθυνση ή γωνία. Σε αυτές τις δονήσεις διακρίνουμε τις μεμονωμένες και τις συζευγμένες.
- Δονήσεις κάμψης (bending): χαρακτηρίζονται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ των δύο δεσμών. Αυτές οι δονήσεις διακρίνονται σε εκείνες που γίνονται εντός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από τρία άτομα και τους δεσμούς τους (ψαλιδοειδής, λικνιζόμενη) και εκείνες που γίνονται εκτός του επιπέδου ισορροπίας (παλλόμενη, συστροφική). Για ένα μόριο που αποτελείται από περισσότερα από δύο άτομα είναι πιθανά όλα τα είδη δονήσεων (Εικόνα 1.3.1.1.).



Εικόνα 1.3.1.1. Μορφές δονήσεων μορίων

Πηγές και μεταλλάκτες ακτινοβολίας:

Οι πηγές υπέρυθρου αποτελούνται από ένα αδρανές στερεό σώμα, το οποίο όταν θερμανθεί ηλεκτρικά σε μία θερμοκρασία μεταξύ 1500 και 2200 K, έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή συνεχούς ακτινοβολίας που προσεγγίζει αυτή του μέλανος σώματος. Σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, η ένταση μειώνεται ομαλά ώσπου να φτάσει στο 1% περίπου της μέγιστης τιμής της (στα 670 cm^{-1}). Τέτοιες πηγές υπέρυθρου είναι:

- Πυρακτωτής Nerst: λειτουργεί όταν θερμανθεί σε θερμοκρασίες από 1200 έως 2200 K. Παρουσιάζει όμως υψηλό συντελεστή ηλεκτρικής αντίστασης, πράγμα που συνεπάγεται την ανάγκη εξωτερικής θέρμανσής του σε βαθμό ερυθροπυράκτωσης.
- Πηγή Globar: λειτουργεί όταν θερμανθεί ηλεκτρικά στους 1300 έως 1500 K. Πλεονεκτεί έναντι του Nerst στο ότι παρουσιάζει θετικό συντελεστή ηλεκτρικής αντίστασης, καθώς και στο ότι παρέχει σημαντικά εντονότερη ακτινοβολία σε μήκη κύματος κάτω από τα 5 μm . Όμως απαιτείται ψύξη των ηλεκτρικών επαφών με νερό για να αποφευχθεί η δημιουργία ηλεκτρικού τόξου.

- Πηγή πυρακτωμένου σύρματος: λειτουργεί όταν θερμανθεί με ηλεκτρικό ρεύμα στους 1100 K και πλεονεκτεί έναντι των Globar και Nerst στο ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, αλλά με κάπως μικρότερη ένταση. Τόξο υδραργύρου : χρησιμοποιείται για την περιοχή του άπω υπερύθρου (με μήκος κύματος δηλαδή μεγαλύτερο από 50 μm) καθώς μπορεί να παρέχει ικανοποιητική ισχύς ακτινοβολίας (που δεν παρέχει καμία από τις τρεις προηγούμενες πηγές).
- Λυχνία νήματος βολφραμίου: αποτελεί την καταλληλότερη πηγή για την περιοχή του εγγύς υπερύθρου.
- Πηγή Laser διοξειδίου του άνθρακα: η πηγή αυτή παράγει μια ζώνη ακτινοβολίας μεταξύ 900 και 1100 cm^{-1} , και είναι χρήσιμη για το ποσοτικό προσδιορισμό πολλών ουσιών ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (π.χ. αμμωνία, βενζόλιο, αιθανόλη κ.α.). Οι μεταλλάκτες υπερύθρου διακρίνονται σε τρεις γενικούς τύπους:
 - Θερμικοί μεταλλάκτες: η απόκρισή τους βασίζεται στο θερμικό αποτέλεσμα από την απορρόφηση της ακτινοβολίας και χρησιμοποιείται σε όλες τις περιοχές υπερύθρου, εκτός από εκείνες με τα μικρότερα μήκη κύματος. Έτσι η ακτινοβολία απορροφάται από ένα μικρό μέλαν σώμα και μετριέται η προκαλούμενη αύξηση της θερμοκρασίας. Το σημαντικότερο πρόβλημα των συγκεκριμένων μεταλλακτών είναι ο θερμικός θόρυβος από το περιβάλλον που αντιμετωπίζεται με την τοποθέτησή τους σε κενό.
 - Πυροηλεκτρικοί μεταλλάκτες: κατασκευάζονται από κρυσταλλικούς δίσκους πυροηλεκτρικών υλικών, τα οποία είναι μονωτές με ιδιάζουσες θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες. Το σημαντικότερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο πυροηλεκτρικό υλικό που χρησιμοποιείται στη κατασκευή οργάνων ανίχνευσης υπερύθρου είναι η θειική τριγλυκίνη $[(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3\text{H}_2\text{SO}_4]$, η οποία είναι συνήθως δευτεριωμένη ή προκύπτει με μερική αντικατάσταση της γλυκίνης από την αλανίνη. Εμφανίζουν πολύ μικρούς χρόνους απόκρισης, καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση θερμοκρασιακών μεταβολών στους χαμηλούς χρόνους που απαιτεί ένα συμβολόμετρο.
 - Φωτοαγώγιμοι μεταλλάκτες: αποτελούνται από ένα λεπτό φιλμ ημιαγώγιμου υλικού (όπως ο θειούχος μόλυβδος, PbS), τα τελλουρίδια υδραργύρου/καδμίου (HgTe/CdTe) ή το αντιμονίδιο του ινδίου (InSb), που τοποθετείται σε μια μη αγώγιμη υάλινη επιφάνεια. Ο φωτοαγώγιμος μεταλλάκτης θειούχου μόλυβδου είναι ο ευρύτερα

χρησιμοποιούμενος για την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, ενώ ο μεταλλάκτης τελλουριδίων υδραργύρου/καδμίου, για την περιοχή του μέσου και άπω υπέρυθρου.

Όργανα Υπέρυθρου:

Τα όργανα για τη μέτρηση της απορρόφησης υπέρυθρου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Όργανα διασποράς, τα οποία διαθέτουν ένα φράγμα διασποράς της ακτινοβολίας και χρησιμοποιούνται κυρίως σε ποιοτικές μετρήσεις.
2. Πολυπλεκτικά όργανα μετασχηματισμού κατά Fourier, τα οποία χρησιμοποιούνται τόσο για ποιοτικές όσο και για ποσοτικές μετρήσεις.
3. Μη διασπείροντα φωτόμετρα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα με φασματοσκοπία απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης. Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '80, η λειτουργία των περισσότερων οργάνων για τη μέση υπέρυθρη περιοχή του φάσματος βασιζόταν στη χρήση φραγμάτων περίθλασης. Από τότε όμως έχουν πραγματοποιηθεί δραματικές αλλαγές και έτσι πλέον η πλειονότητα των οργάνων βασίζεται στο μετασχηματισμό Fourier. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου χρησιμοποιείται ευρύτατα, ενώ βρίσκει σημαντική εφαρμογή στον προσδιορισμό της δομής διαφόρων ενώσεων, στην ταυτοποίησή τους καθώς και στην ποσοτική ανάλυση (Skoog, 2002).

Φασματοσκοπία Υπέρυθρου-Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR):

Η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1950, από τους αστρονόμους, προκειμένου να γίνει μελέτη των φασμάτων υπέρυθρου των απομακρυσμένων αστερών, με σκοπό να απομονωθούν τα πολύ ασθενή σήματα αυτών των πηγών από τον θόρυβο. Η πρώτη χημική εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier έγινε 10 χρόνια μετά και πραγματοποιήθηκε στην ενεργειακά φτωχή περιοχή του άπω υπέρυθρου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 εμφανίστηκαν στο εμπόριο όργανα αυτού του τύπου που αποσκοπούσαν στη χημική μελέτη τόσο της άπω υπέρυθρης, όσο και της υπέρυθρης περιοχής.

Όταν τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου-μετασχηματισμού Fourier εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην αγορά, ήταν ογκώδη, υψηλού κόστους και απαιτούσαν συχνές μηχανικές ρυθμίσεις. Έτσι η χρήση τους περιοριζόταν σε ειδικές εφαρμογές όπου τα

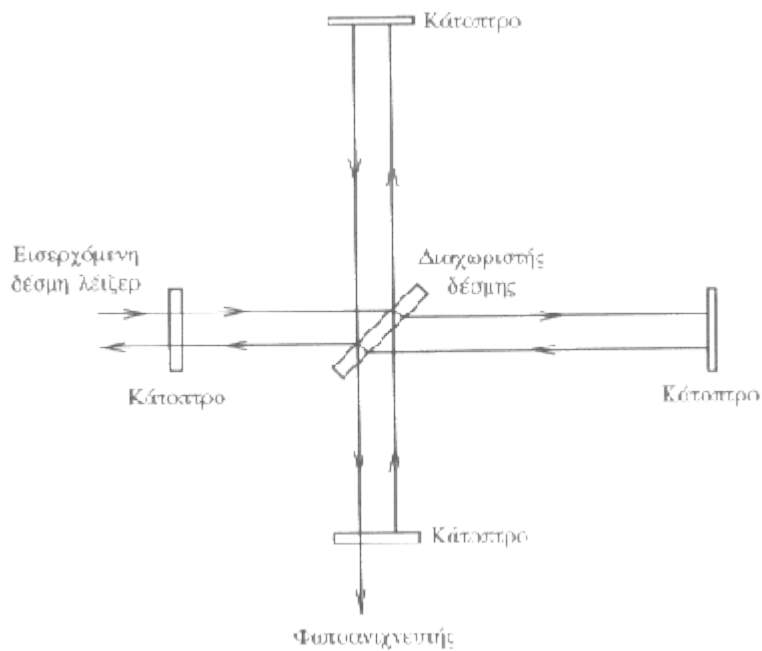
εξαιρετικά χαρακτηριστικά τους (ταχύτητα, υψηλή σταθερότητα, ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια) ήταν απολύτων απαραίτητα. Σήμερα όμως, τα φασματοφωτόμετρα FT-IR έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα, για πολλά χρόνια, πιο προσιτά όργανα διασποράς ακτινοβολίας, καθώς είναι πλέον πιο μικρά σε μέγεθος, οικονομικά και αξιόπιστα, ενώ επίσης συντηρούνται αρκετά πιο εύκολα. Η κωδικοποίηση επιτυγχάνεται με διαμοιρασμό της ακτινοβολίας της πηγής σε δύο δέσμες, των οποίων το μήκος της οπτικής διαδρομής μπορεί να μεταβάλλεται περιοδικά, για να παραχθεί το συμβολόγραμμα. Στη συνέχεια η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιείται με το μετασχηματισμό Fourier. Η ανάλυση Fourier είναι μια διεργασία κατά την οποία κάθε καμπύλη διαιρείται σε ένα άθροισμα σειρών ημιτονίων και συνημιτονίων, οι οποίες καλούνται σειρές Fourier.

Τμήματα ενός οργάνου μετασχηματισμού Fourier:

Το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier είναι το συμβολόμετρο το οποίο σχεδιάστηκε από το Albert Michelson το 1891.

Ένα συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από:

1. Την πηγή ακτινοβολίας
2. Το διαχωριστή δέσμης
3. Ένα σταθερό κάτοπτρο
4. Ένα κινητό κάτοπτρο με μηχανισμό κίνησης
5. Τον ανιχνευτή
6. Τον υποδοχέα του δείγματος ανάμεσα στο συμβολόμετρο και τον ανιχνευτή



Εικόνα 1.3.1.2. Συμβολόμετρο του Albert Michelson

Όταν η φωτεινή δέσμη της πηγής ακτινοβολίας προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης, ένα μέρος της ανακλάται στο κινητό κάτοπτρο και ένα μέρος της μεταδίδεται στο σταθερό κάτοπτρο. Κατόπιν οι ακτίνες που ανακλώνται από τα κάτοπτρα επανέρχονται στο διαχωριστή, στον οποίο το μισό κάθε ακτίνας μεταδίδεται και το υπόλοιπο μισό ανακλάται. Έτσι μια επανενωμένη δέσμη διέρχεται στη διεύθυνση του ανιχνευτή και μια άλλη επανέρχεται πίσω στη πηγή.

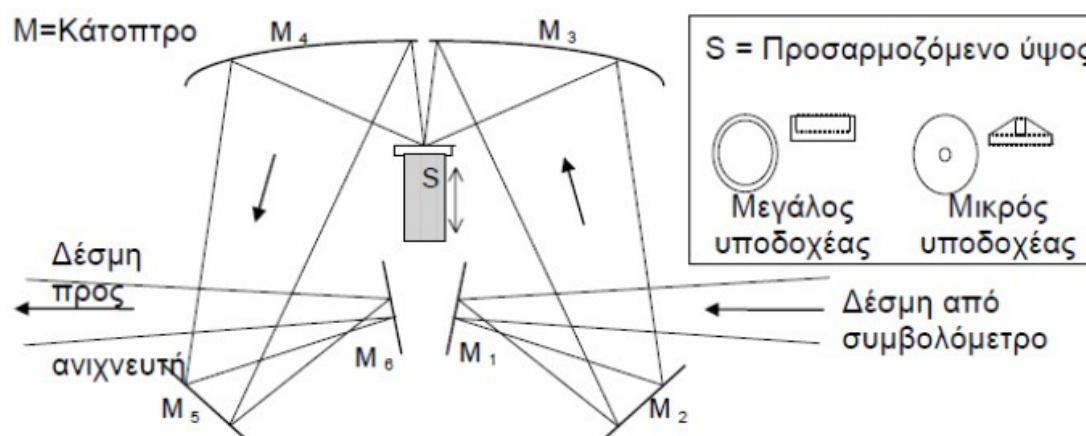
Οι διαχωριστές δέσμης κατασκευάζονται από διαφανή υλικά με κατάλληλα επιλεγμένους δείκτες διάθλασης, ώστε περίπου το 50% της ακτινοβολίας να ανακλάται και το υπόλοιπο 50% να τους διαπερνά. Υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι: λεπτά φιλμ από Mylar για την υπέρυθη περιοχή, ή φιλμ γερμανίου που έχουν αποτεθεί σε βρωμιούχο κάλιο για την μέση υπέρυθη περιοχή, ή μια επίστρωση οξειδίου του σιδήρου σε φθοριούχο ασβέστιο για την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου. Ο ανιχνευτής αντιλαμβάνεται την υπέρυθη ακτινοβολία που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτή είναι αυτοί που χρησιμοποιούν δευτεριωμένη θεική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Η λειτουργία αυτού του τύπου ανιχνευτών στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, που προκαλείται από την πρόσπτωση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η οποία έχει προηγουμένως διέλθει από το δείγμα. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης θερμοκρασίας είναι η δημιουργία μιας διαφοράς δυναμικού. Η

επανενωμένη δέσμη, που δημιουργείται τελικά από το διαχωριστή, περνά από το δείγμα, όπου πραγματοποιείται μερική ή ολική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων της δέσμης. Κατόπιν η δέσμη κινείται προς τον ανιχνευτή όπου προκαλεί μεταβολή της διαφοράς δυναμικού. Τέλος γίνεται μετατροπή του αναλογικού αυτού σήματος σε ψηφιακό και εισέρχεται σε υπολογιστή, όπου με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Αυτό, μετά από μετασχηματισμό κατά Fourier παίρνει τη μορφή του τυπικού φάσματος υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Skoog, 2002).

Διάχυτη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (DRIFTS):

Αποτελεί πλέον μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για την λήψη φασμάτων από στερεά δείγματα. Αυτό το οφείλει στην μεγάλη ευκολία προετοιμασίας του δείγματος, καθώς δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του για την τοποθέτηση του στο μηχάνημα εκτός τις λυοτρίβισης και της τυχόν ανάμειξής του με KBr. Έτσι η τεχνική αυτή είναι απλή και πολύ γρήγορη.

Αφού το στερεό δείγμα μετατραπεί σε πολύ ψιλή σκόνη (πούδρα), ελάχιστη ποσότητα τοποθετείται στον ειδικό υποδοχέα.



Εικόνα 1.3.1.3: Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος για τη λήψη φάσματος με τη τεχνική DRIFTS.

Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier:

Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα τα σημαντικότερα των οποίων είναι:

- ικανότητα μέτρησης πολύ ασθενών σημάτων λόγω του ότι αποτελούνται από λίγα μόνο οπτικά στοιχεία, ενώ καμία σχισμή δεν εξασθενεί την ακτινοβολία. Έτσι τα οπτικά τους συστήματα εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση σε σχέση με τα όργανα διασποράς
- ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι μεγαλύτερος, κατά τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους σε σχέση με τα καλής ποιότητα φασματοφωτόμετρα διασποράς
- εμφανίζουν υψηλή διακριτική ισχύ ($0,1 \text{ cm}^{-1}$) και συνεπώς μεγάλη ακρίβεια αλλά και επαναληψιμότητα
- όλη η πληροφορία που βρίσκεται στην ακτινοβολία φθάνει συγχρόνως στον ανιχνευτή και έτσι εξασφαλίζεται συλλογή των δεδομένων για ολόκληρο το φάσμα σε ελάχιστο χρόνο, πολλές φορές και λιγότερο του δευτερολέπτου. (Skoog, 2002)

Ερμηνεία φασμάτων

Σ' ένα υπέρυθρο φάσμα διακρίνονται οι περιοχές:

- των χαρακτηριστικών ομάδων
- του δακτυλικού αποτυπώματος

Η περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων εντοπίζεται σε κυματάρθμους από 4000 έως 1400 cm^{-1} .

Σ' αυτή τη περιοχή η απορρόφηση οφείλεται στη δόνηση των διατομικών ομάδων με συχνότητα χαρακτηριστική των μαζών και της σταθεράς δύναμης που τα συνδέει, ενώ επηρεάζονται ελάχιστα από τη δόνηση του υπόλοιπου μορίου. Η περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος εκτείνεται από τα 1400 έως τα 600 cm^{-1} .

Εδώ η απορρόφηση σχετίζεται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου και κάθε άτομο επιδρά στα υπόλοιπα άτομα και στη συνολική δόνηση του μορίου. Η πληροφορία που λαμβάνεται από αυτή την περιοχή είναι μοναδική για κάθε μόριο και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή του κατά τη σύγκρισή του με φάσματα αναφοράς. Παρακάτω δίνονται δύο Πίνακες με χαρακτηριστικές κορυφές και την ερμηνεία τους.

Πίνακας 1.3.1.1. Ερμηνεία κορυφών στο IR που αφορούν το YAE (Ait Baddi et al. 2004, El Hajjouji et al. 2007, Hafidi et al. 2005, Lguirati et al. 2005, Ouatmane (2000) and Smidt and Meissl 2006).

Table 3

Absorbance bands from the IR spectra of the treated olive mill waste water

Wavelength(cm^{-1})	Attribution
3400 cm^{-1}	-OH (phenols, alcohols and carboxylic groups)
2925 cm^{-1}	C-H stretching vibration in aliphatic structures (fatty acids, waxes and various aliphatics)
2840 cm^{-1}	Symmetrical CH stretching vibrations in $-\text{CH}_2$ (fatty acids and alkanes)
$1716\text{-}1740 \text{ cm}^{-1}$	C=O stretching vibrations in esters, carboxyl COOH and ketone groups
$1620\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$	C=O stretching vibrations in primary amides
	C=O stretching vibrations from conjugated ketones, acids and/or quinones. Aromatic C=C stretching vibrations
$1550\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$	C=O stretching vibrations in COO^- (with a weaker bond around 1400 cm^{-1})
$1540\text{-}1570 \text{ cm}^{-1}$	N-H vibrations in secondary amides
1525 cm^{-1}	Aromatic C=C stretching vibrations
$1450\text{-}1460 \text{ cm}^{-1}$	Aliphatic C-H stretching vibrations
1384 cm^{-1}	Symmetrical $-\text{CH}_3$ stretching vibrations
$900\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$	Vibrations of C-H and deformation of OH functions, carboxyls, C-O of ethers on aromatic rings and N-H of secondary amides
$700 \text{ and } 900 \text{ cm}^{-1}$	Aromatic groups

Πίνακας 1.3.1.2. Ερμηνεία κορυφών στο IR πιο γενικευμένα (Smidt et al. 2008).

Table 2
Selected infrared indicator bands in waste materials

Wavenumber (cm ⁻¹)	Vibration	Functional group or compound	References
3400	O-H stretching	Bonded and non bonded hydroxyl groups and water	Smith (1999)
2920	Asym. C-H stretch.	Aliphatic methylene group	Smith (1999)
2850	Sym. C-H stretch.	Aliphatic methylene group	Smith (1999)
2520		Carbonate	Reig et al. (2002)
1800-1780		Carbonate	Reig et al. (2002)
1740-1720	C=O stretching	Aldehyde, ketone, carboxylic acids, esters	Ouatmane et al. (2000), Smith (1999), Tan (2003)
1640	C=O stretching	Amide I, carboxylates	Haberhauer et al. (1998)
	C=C stretching	Aromatic ring modes, alkenes	Ouatmane et al. (2000), Smith (1999), Chen et al. (1996)
1635	O-H bending	Absorbed water	Socrates (2001)
1580-1540	N-H in plane	Amides II	Ouatmane et al. (2000), Grube et al. (1999), Smith (1999)
1515-1505	Aromatic skeletal	Lignin	Ouatmane et al. (2000)
1425	COO ⁻ stretching	Carboxylic acids	Smith (1999)
	C-O stretching	Carbonate	Hesse et al. (1995)
1384	N-O stretching	Nitrate	Smidt et al. (2002), Smith (1999), Zaccheo et al. (2002)
1320	C-N stretching	Aromatic primary and secondary amines	Smith (1999)
1260-1240	C-O C-N	Carboxylic acids Amide III	Smith (1999)
1250-900	C-O-C, C-O, C-O-P	Polysaccharides, Phosphodiester	Grube et al. (1999), Naumann et al. (1996)
1080	Asym. Si-O-Si stretching	Quartz	Reig et al. (2002)
1030	Si-O stretching	Clay minerals	Madejova (2003)
	Si-O-Si	Silica	Smith (1999)
875	C-O out of plane	Carbonate	Reig et al. (2002)
510	Si-O-Si bending	Quartz	Smith (1999)

Με βάση τους δύο παραπάνω Πίνακες μπορούμε να εξαγάγουμε ορισμένα σέτ κορυφών που να ανταποκρίνονται σε φαινολικές ουσίες και αυτές είναι οι εξής:

- ✓ 1525 cm⁻¹.
- ✓ 1515-1505 cm⁻¹.
- ✓ 1640 cm⁻¹.
- ✓ 1300-900 cm⁻¹.

Και επίσης εκτός των πινάκων:

- ✓ 1618 cm⁻¹. (Schulz & Baranska, 2007)
- ✓ 1712-14 cm⁻¹. (Tarantilis et al., 2008)
- ✓ 1609-1608 cm⁻¹. (Tarantilis et al., 2008)
- ✓ 1519-1516 cm⁻¹. (Tarantilis et al., 2008)
- ✓ 1281-1278 cm⁻¹. (Tarantilis et al., 2008)

Εφαρμογές φασματοσκοπίας FT-IR:

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει πλέον αρχίσει να χρησιμοποιείται πάρα πολύ αφού είναι σε θέση να προσδιορίσει και να μετρήσει τις συγκεντρώσεις πολλών χημικών στοιχείων μέσω μέτρησης των φασμάτων τους και με χαμηλό έως μηδενικό κόστος λειτουργίας. Βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς, από τη βαριά βιομηχανία μέχρι τα τρόφιμα και τους μικροοργανισμούς.

Ενδεικτικά:

Οι Hofman et al.(1996) χρησιμοποίησαν την FT-IR για αποδείξουν την αύξηση της ανθεκτικότητας των επικαλύψεων SiO₂ σε κράματα μετάλλων, όταν αυτές γίνονται σε περιβάλλοντα με υψηλότερη υγρασία, μέσω αύξησης των ομάδων σιλανόλης. Η Coricova et al.(2001) επέτυχε τον ποιοτικό προσδιορισμό των υδροκολλοειδών σε τρόφιμα και γλυκά μέσω της φασματοσκοπίας μέσου υπέρυθρου. Απέδειξε ότι μπορεί επάξια να αντικαταστήσει τη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό καθώς η φασματοσκοπία αποτελεί μια ευκολότερη μέθοδο, λόγω του ότι δεν υπάρχει ανάγκη υδρόλυσης των απομονωμένων υδροκολλοειδών για την ταυτοποίησή τους.

Μια άλλη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η χρήση της στην ταυτοποίηση γύρης (Pappas et al., 2003), γάλακτος (Pappas et al., 2008) καθώς και κρασιού (Tarantilis et al., 2008). Στις συγκεκριμένες εργασίες λήφθηκαν τα φάσματα από γνωστά δείγματα και δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων από αυτά. Κατόπιν εισάγοντας άγνωστα δείγματα στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων, πραγματοποιούσαν την ταυτοποίησή τους.

Παρόμοια εργασία έχει πραγματοποιηθεί και για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό μοσχαρίσιου κρέατος με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR (Argyri et al., 2010). Εκτός όμως από τα τρόφιμα και τη βιομηχανία, σημαντική δουλειά έχει γίνει με την φασματοσκοπία FT-IR και σε επίπεδο μικροοργανισμών. Οι Mohacek-Grosev et al.(2001) έκαναν διάκριση ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων με βάση την ταυτοποίηση των α-και β-γλουκανών από τα φάσματα που λήφθηκαν από σπόρια και καρποφορίες 70 διαφορετικών ειδών και 37 γενών.

Παρόμοιες εργασίες στον τομέα της ταυτοποίησης μυκήτων πραγματοποιήθηκαν και από τους Fischer et al.(2005), Liker and Tsror, (2008), Naumann (2008), Salman et al. (2010) και Santos et al.(2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.1.1. Σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA- Conda): Προστέθηκαν 39 g PDA σε 1L απιονισμένο νερό υπό θέρμανση και ανάδευση προς διάλυση του θρεπτικού υλικού. Η αποστείρωση του υγρού θρεπτικού υλικού έγινε στους 121° C, 1,2 atm για 20min σε αυτόκαυστο. Μετά την αποστείρωση, αφέθηκε να κρυώσει και αμέσως μετά χρησιμοποιήθηκε για τη πλήρωση τρυβλίων (περίπου 15 mL ανά τρυβλίο).

Εντός του θαλάμου νηματικής ροής έγινε εμβολιασμός του στερεού πια θρεπτικού υλικού μέσω δισκίου-εμβολίου των επιθυμητών μυκήτων (που παραλήφθηκε από μητρική καλλιέργεια) και το οποίο τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου.

Τα εμβολιασμένα τρυβλία ακολούθως τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι για περίπου 10-15 ημέρες μέχρι να καλυφθούν από μυκήλιο τα 2/3 της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο.

2.1.2. Σε υγρό απόβλητο μαζί με άγαρ: Σε επεξεργασμένο απόβλητο (η οποία διαδικασία αναλύεται ακολούθως) προστίθεται ποσότητα από συμβατικό υπόστρωμα άγαρ προς διάλυση και κατόπιν προς αποστείρωση στους 121° C, 1,2 atm για 40min σε αυτόκαυστο. Όπως και παραπάνω, μετά την αποστείρωση και αφού ήρθε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έγινε πλήρωση τρυβλίων με χρήση φλόγας και ασηπτικών συνθηκών σε θάλαμο νηματικής ροής.

Για να αποφασιστεί σε ποια συγκέντρωση αποβλήτου έχουμε καλύτερη ανάπτυξη μυκηλίου χρησιμοποιήθηκαν 3 συγκεντρώσεις ΥΑΕ: 25%, 50% και 100%. Συνεπώς, παραλάβαμε 6 τρυβλία, από κάθε συγκέντρωση, στερεών θρεπτικών μέσων με ΥΑΕ.

Ακολούθως, έγινε εντός θαλάμου νηματικής ροής εμβολιασμός από τα ανεπτυγμένα μυκήλια σε PDA μέσω δισκίου-εμβολίου των επιθυμητών στελεχών στο κέντρο των τρυβλίων με ΥΑΕ. Τα εμβολιασμένα τρυβλία ακολούθως τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι μέχρι να πάρουμε μυκήλια που να καλύπτουν όλο το τρυβλίο και ακριβώς αυτή τη συγκέντρωση αποφασίζουμε να

χρησιμοποιήσουμε στα πειράματα μας. Την καλύτερη και γρηγορότερη απόδοση μυκηλίων είχε η συγκέντρωση 50% ΥΑΕ και συνεπώς αυτή τη συγκέντρωση ΥΑΕ θα χρησιμοποιήσουμε για τις υγρές καλλιέργειες στα πειράματα μας.

2.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Χρησιμοποιήσαμε υγρό απόβλητο ελαιουργείων (ΥΑΕ) που προήλθε από τριφασικό ελαιουργείο στη περιοχή της Κρήτης και για τις στερεές καλλιέργειες που περιγράφηκαν παραπάνω και για το υγρό υπόστρωμα του αυτού καθ' αυτού πειράματος. Αρχικά το απόβλητο ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε το pH= 5,2 και διορθώθηκε το pH στο 6 με χρήση διαλύματος NaOH 0,5M. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 min στους 4° C στην φυγόκεντρο Biofuge Stratos. Το παραγόμενο υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό με χρήση χαρτιού Whatmann No 4. Η παραγόμενη ποσότητα ΥΑΕ είναι μετά από αυτή την επεξεργασία κατάλληλη για υγρή καλλιέργεια με μύκητες.

2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΩΝ

Διάλυμα ABTS 1,5mM : Ζυγίζουμε 0,082305g ABTS σε ζυγό ακριβείας και διαλύουμε σε 100ml απιονισμένου νερού.

Διάλυμα τρυγικού νατρίου 0,1M με pH = 3: Ζυγίζουμε 2,3g τρυγικού νατρίου, διαλύουμε σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, και αφού ρυθμίσουμε το pH= 3 με προσθήκη τρυγικού οξέος 2M, συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 100ml.

Διάλυμα τρυγικού νατρίου 0,1M με pH = 4,5: Ζυγίζουμε 2,3g τρυγικού νατρίου, διαλύουμε σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, και αφού ρυθμίσουμε το pH= 4,5 με προσθήκη τρυγικού οξέος 2M, συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 100ml.

Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος-γαλακτικού νατρίου 0,1M: Ζυγίζουμε 1,180g ηλεκτρικού οξέος, διαλύουμε σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, και αφού ρυθμίσουμε το pH= 4,5 με προσθήκη γαλακτικού νατρίου, συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 100ml.

Διάλυμα DMAB 25mM: Διαλύουμε 0,4130g DMAB υπό ανάδευση και θέρμανση σε 100ml απιονισμένο νερό.

Διάλυμα MBTH 1mM: Ζυγίζουμε 0,02157g MBTH σε ζυγό ακριβείας και διαλύουμε σε 100ml απιονισμένου νερού.

Διάλυμα 20mM MnSO₄: Ζυγίζουμε 0,146g MnSO₄ σε ζυγό ακριβείας και διαλύουμε σε 100ml απιονισμένου νερού.

Διάλυμα 20mM βερατρυλικής αλκοόλης: Λαμβάνουμε 285,7μl με χρήση πιπέτας και προσθέτουμε σε 50ml απιονισμένου νερού.

Διάλυμα 20mM H₂O₂: Προσθέτουμε 10,288μl H₂O₂ 30% σε 10 ml απιονισμένου νερού.

Διάλυμα 54mM H₂O₂: Προσθέτουμε 55,2μl H₂O₂ 30% σε 10 ml απιονισμένου νερού.

2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΥΓΡΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Για τα υγρά υποστρώματα, αραιώθηκε η επεξεργασμένη ποσότητα ΥΑΕ κατά το ήμισυ με απιονισμένο νερό και μοιράστηκε ανά 100 ml σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml οι οποίες πωματίστηκαν με βαμβάκι. Ανάλογα με τη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε έγιναν δύο επεξεργασίες. Μία είναι η αποστείρωση στους 121° C, 1,2 atm για 20min σε αυτόκαυστο και η δεύτερη είναι η παστερίωση, όπου οι πληρωμένες φιάλες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρα στους 60° C για 2 hr. Σημείωση για τη διαδικασία της παστερίωσης, πριν πληρώσουμε τις φιάλες με υγρό υπόστρωμα αποστειρώσαμε τις άδειες φιάλες στο θάλαμο νηματικής ροής με UV για 10min. Επίσης ανάλογα με το πείραμα, έγιναν προσθήκες μικρών ποσοτήτων μετάλλων και αζώτου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε ποσότητες 0,2mM-0,4mM MnSO₄, 0,2mM CuSO₄ και συνδυασμοί τους και 0,2g/L- 0,4g/L- 0,8g/L (NH₄)₂SO₄.

2.5. ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

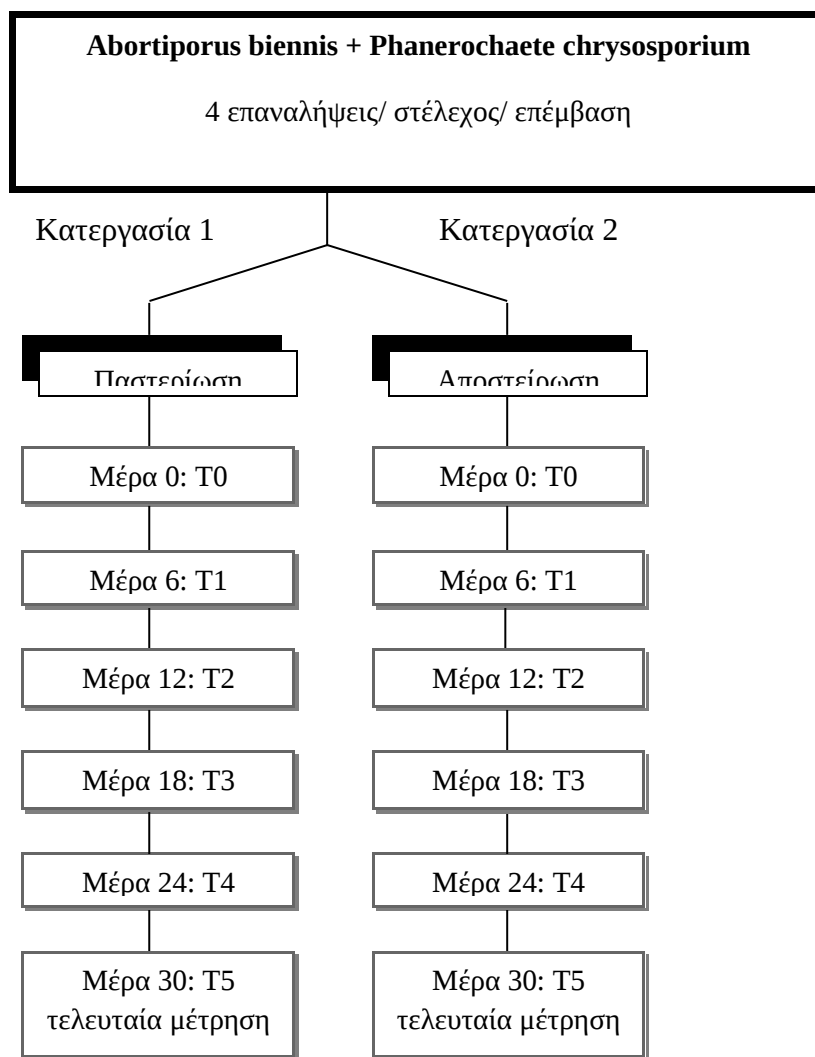
Τα δείγματα λαμβάνονταν στους χρόνους που ήταν προγραμματισμένοι για κάθε πείραμα σε ασηπτικές συνθήκες, από κάθε επανάληψη και για κάθε επεξεργασία, με χρήση πιπέτας και τοποθετούνταν ποσότητα 2ml από κάθε φιάλη (και τον μάρτυρα) σε erpendorf για μέτρηση.

2.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Έγιναν τρία διαφορετικά πειράματα και με διαφορετικές παραμέτρους το καθένα. Παρακάτω περιγράφονται οι διαδικασίες και οι υποπεριπτώσεις όλων των πειραμάτων, αλλά για πιο ξεκάθαρη εικόνα αυτών ακολουθούν τα διαγράμματα πειραματικών διαδικασιών (Σχήματα 2.6.1, 2.6.2, 2.6.3).

Κάθε ένα από τα επιλεγμένα στελέχη μυκήτων, τα οποία είναι το *Abortiporus biennis* ABL436 και το *Phanerochaete chrysosporium* PHL322, εμβολιάστηκε σε 100ml ΥΑΕ συγκεντρώσεως 50% v/v που περιέχονταν σε κωνική φιάλη Erlenmeyer των 250 ml. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε επιλεγμένο στέλεχος και μάρτυρα. Επιπλέον γινόταν προσθήκη μικρής ποσότητας μετάλλων και αζώτου ανάλογα με το πείραμα. Κατά τον εμβολιασμό προστέθηκε ασηπτικά ένα εμβόλιο από κάθε στέλεχος μύκητα σε μορφή δίσκου διαμέτρου 0,8cm που παραλήφθηκαν από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η επώαση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες στατικής ή αναδευόμενης καλλιέργειας στους 32 °C (η οποία είναι η πιο κατάλληλη θερμοκρασία για τους δύο υπό εξέταση μύκητες) επί 21 ή 25 ή 30 ημέρες. Στις στατικές καλλιέργειες οι φιάλες αναδευόνταν με το χέρι δύο φορές ημερησίως. Σε κάθε λήψη δείγματος που γινόταν (ανάλογες μέρες αντίστοιχα με τη διάρκεια του κάθε πειράματος) προσδιορίστηκε για κάθε επιλεγμένο στέλεχος και κάθε επανάληψη, το ολικό φαινολικό φορτίο και ο βαθμός αποχρωματισμού των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων καθώς και προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση (μη εξαρτημένη του Mn), Mn-υπεροξειδάση, λιγνίνη-υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης. Επιπλέον, κατά τη τελευταία χρονικά μέτρηση, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της μυκηλιακής βιομάζας που παράχθηκε στη διάρκεια της επώασης.

Οι περισσευόμενες ποσότητες δειγμάτων, με το πέρας των ανωτέρων αναλύσεων, λυοφιλιώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων FT-IR.

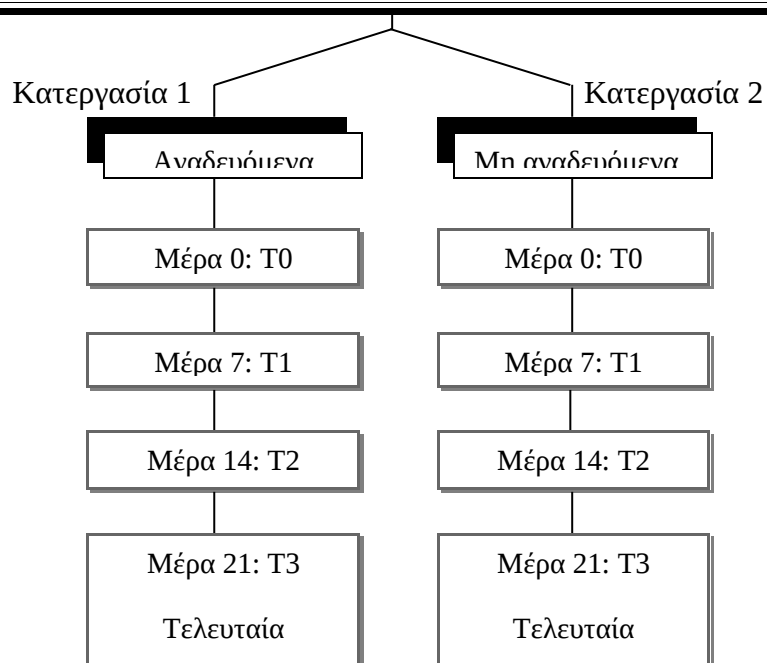


Σχήμα 2.6.1. Πειραματική διαδικασία Νο1

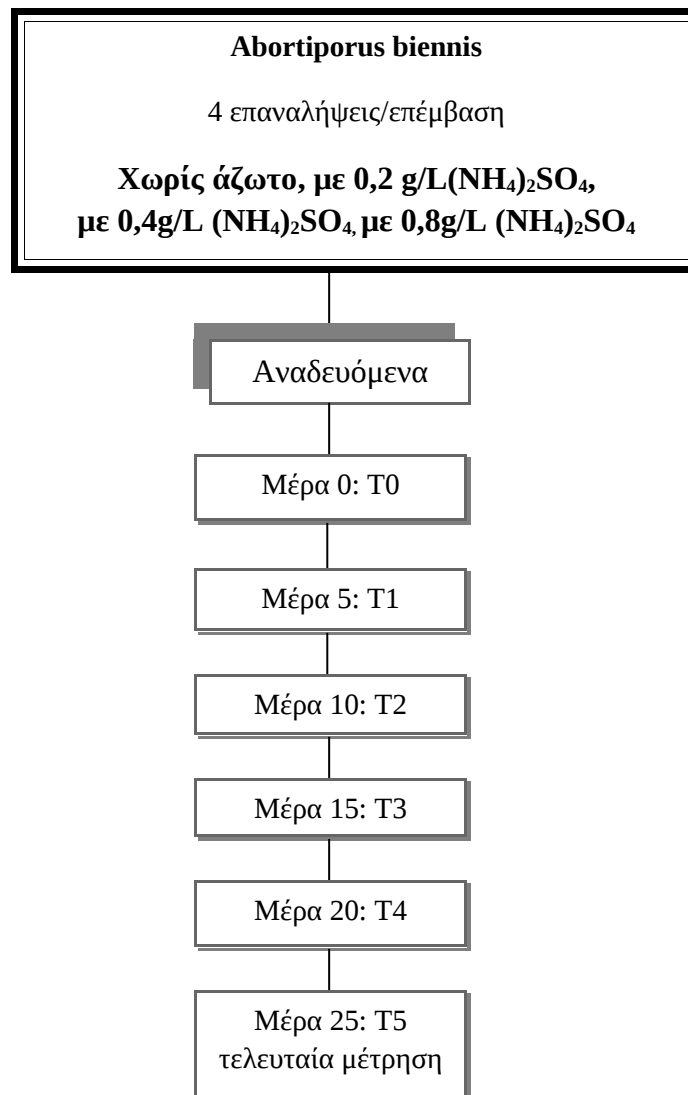
Abortiporus biennis + Phanerochaete chrysosporium

4 επαναλήψεις/ στέλεχος/ επέμβαση

Χωρίς μέταλλα, με 0,2mM MnSO₄, με 0,2mM CuSO₄, με 0,4mM MnSO₄, με 0,2mM MnSO₄+ 0,2mM CuSO₄, με 0,4mM MnSO₄+0,2mM CuSO₄



Σχήμα 2.6.2. Πειραματική διαδικασία Νο2

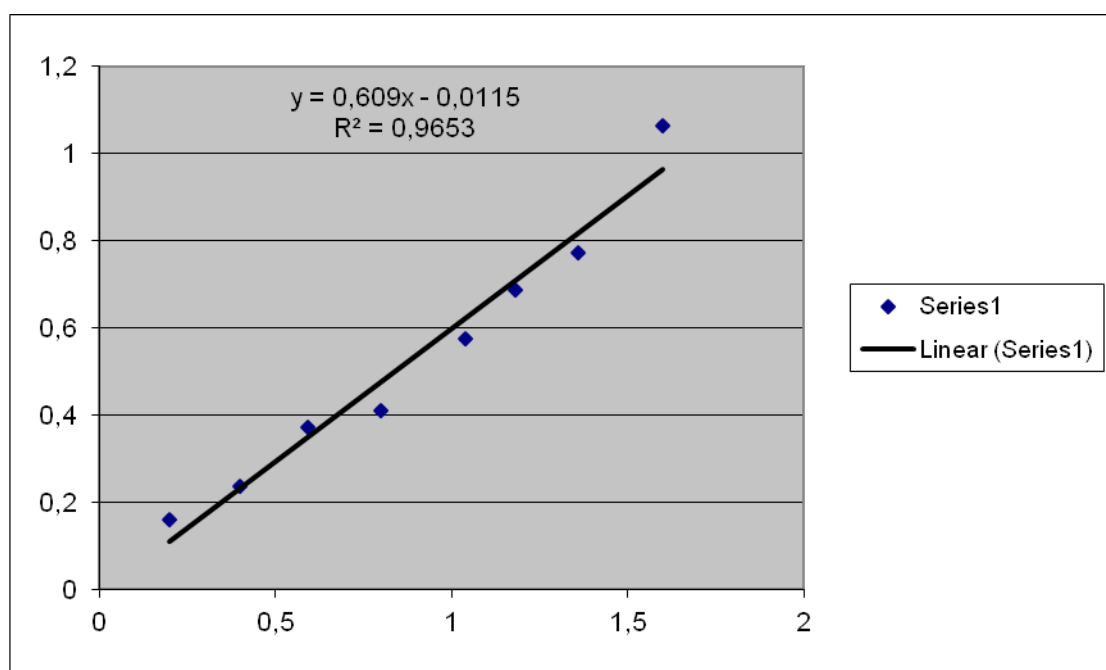


Σχήμα 2.6.3. Πειραματική διαδικασία Νο3

2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

Ο προσδιορισμός του φαινολικού φορτίου των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Weaver *et al.* 1994), η οποία βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών σε αλκαλικό περιβάλλον. Σε κάθε χρονική στιγμή στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και στο μάρτυρα, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 v/v ΥΑΕ:H₂O. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 20ml απιονισμένου νερού, 250μl του προς ανάλυση δείγματος, 1,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (μείγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος) (MERCK). Μετά από 1min προσθήκη 3,75 ml διαλύματος άνυδρου ανθρακικού

νατρίου συγκεντρώσεως 20%w/v και ανάδευση του δείγματος. Μετά αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2hr και κατόπιν πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA) στα 760nm. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα συριγγικού οξέος γνωστής συγκεντρώσεως (οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ήταν 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 και 1,6 g συριγγικού οξέος/ml) με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της ποσότητας φαινολικών στα προς ανάλυση δείγματα.



Διάγραμμα 2.7.1: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των φαινολικών.

2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΥ

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα και στο μάρτυρα στις χρονικές στιγμές T0, T1, T2, T3 και T4 και T5(ανάλογα το πείραμα), πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 v/v ΥΑΕ:H₂O ή 1:50 v/v ΥΑΕ:H₂O (ανάλογα το πείραμα). Με προσθήκη ποσότητας δείγματος και μάρτυρα (απιονισμένο νερό) σε κυψελίδα μετρήσαμε τη απορρόφηση στα 525nm (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA).

2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

2.9.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου Λακκάση

Η ενεργότητα της λακκάσης υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Bourbonnais et al. (1990). Βασίζεται στην οξείδωση του υποστρώματος ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)).

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα 0,4 ml δείγματος και 0,6 ml τρυγικό νάτριο συγκέντρωσης 0,1 M (pH 4,5). Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,2 ml ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) συγκεντρώσεως 1,5 mM. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα 425 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer). Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

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

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

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

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

Ο προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,1 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM και 0,05 ml διαλύματος MBTH(3-methyl-2-

benzothiazolinon–hydrazon–hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0,33 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως. Για τον υπολογισμό της παρεμβολής του υποστρώματος χρησιμοποιούμε τον κάτωθι τύπο:

Background activity = $d(A_{590 \text{ nm}})/dt(\text{min}) \times E \text{ (l/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)}/V_{\text{sample}}(\text{ml})$ όπου $E \text{ (l/mol.cm)}=32,9 \text{ l/mol.cm}$.

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

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,1 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0,05 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM και 0,33 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιολιτριβείων. Ακολούθησε προσθήκη 0,01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως. Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: AP = Independent peroxidase activity + Background activity = $d(A_{590 \text{ nm}})/dt(\text{min}) \times E \text{ (l/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)}/V_{\text{sample}}(\text{ml})$ όπου $E \text{ (l/mol.cm)}=32,9 \text{ l/mol.cm}$. Η ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity).

Επομένως: Independent peroxidase activity = AP - Background activity

2.9.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος ηλεκτρικού-

γαλακτικού (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,1 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0,05 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM, 0,33 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και 0,005 ml διαλύματος MnSO₄ συγκέντρωσης 20 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0,005 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντιδράσεως.

Ο υπολογισμός της δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: $AR = \text{Mn-peroxidase activity} + \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = d(A_{590 \text{ nm}})/dt(\text{min}) \times E \text{ (l/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}}(\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$ όπου $E \text{ (l/mol.cm)} = 32,9 \text{ lt/mol.cm}$.

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

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

2.9.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,4 ml τρυγικού νάτριου (pH 3) συγκεντρώσεως 0,1 M και 0,2 ml διηθημένου δείγματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Ακολούθησε προσθήκη 0,035 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

Ο υπολογισμός της δράσης του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

$V_{\text{Oxactivity}} = dA(310\text{nm})/dt * E(\text{lt/mol*cm}) * V_{\text{reaction}}(\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$

2.9.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση

Η ενεργότητα της LiP μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Tien & Kirk (1988). Η μετρούμενη αύξηση της απορρόφησης στα 310 nm οφείλεται στην οξείδωση της βερατρυλικής αλκοόλης σε βερατρυλική αλδεΐδη.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,4ml τρυγικού νάτριου (pH 3) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,2 ml διηθημένου δείγματος ΥΑΕ και 0,035 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0,015 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 54 mM και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec.

Ο υπολογισμός της δράσης του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

$$\text{LiP activity} = \frac{dA(310\text{nm})}{dt} \cdot E(\text{lt/mol} \cdot \text{cm}) \cdot V_{\text{reaction}}(\text{ml}) / V_{\text{sample}}(\text{ml})$$

2.10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η μέτρηση του ξηρού βάρους του μυκηλίου των επιλεγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε με το πέρας της επώασης, την τελευταία μέτρηση, όπου το εμβολιασμένο υγρό απόβλητο διηθήθηκε και το μυκήλιο τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 50°C για διάστημα δύο ημερών. Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης ζυγίστηκε στο ζυγό ακριβείας, η δε ποσότητα του ξηρού βάρους του μυκηλίου υπολογίστηκε με αφαίρεση του βάρους του διηθητικού χαρτιού από την ένδειξη της ζυγαριάς.

2.11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 20. 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

παραπάνω από δύο επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ANOVA και το κριτήριο Gabriel όταν υπήρχαν ίσες διασπορές μεταξύ των πληθυσμών. Για να συγκρίνουμε την ομοιογένεια των μεταβλητών χρησιμοποιήσαμε τον έλεγχο Homogeneity of variances.

2.12. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ FT-IR

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης των υγρών δειγμάτων μας με FT-IR χρειάστηκε πρώτα η μετατροπή των υγρών σε σκόνη. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της λυοφιλίωσης όπου ουσιαστικά είναι μια μέθοδος συντήρησης τροφίμων αλλά και φυτικού υλικού. Η λυοφιλίωση είναι η πιο ήπια μέθοδος συντήρησης καθώς δε καταστρέφει το προς εξέταση δείγμα. Κατά τη τεχνική αυτή ο δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή που λειτουργεί υπό κενό, η επιφάνεια της οποίας διατηρεί πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-60°C) μετατρέποντας το νερό από την υγρή φάση στη στερεή. Στη συνέχεια, ο πάγος εξαχνώνεται και οι υδρατμοί από το κατεψυγμένο υλικό μεταφέρονται γρήγορα στη ψυχρή επιφάνεια (Ταραντίλης, 2008). Τα δείγματα μας τοποθετούνται στη συσκευή με σημαντικά 2 στοιχεία. Ένα, να είναι ήδη παγωμένο το υλικό μας, έτσι ώστε να γίνει καλή λυοφιλίωση, και δύο, να είναι ανοιχτά τα δοχεία των δειγμάτων αλλά με μια μεμβράνη αντί για πώμα, με τρύπες στην επιφάνεια της έτσι ώστε να εξαχνωθεί ο πάγος χωρίς να φεύγει το δείγμα από το δοχείο που το έχουμε. Μετά από 24 ώρες τα δείγματα μας είναι έτοιμα προς χρήση, αλλά κλείνουμε αμέσως τα δοχεία για να μη μαζέψουν υγρασία.

2.13. ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ FT-IR

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700 (Εικόνα 2.13.1) και το πρόγραμμα λειτουργίας του ήταν το Omnic 7.3. Η μέθοδος που υιοθετήθηκε για τη μέτρηση ήταν η DRIFTS (Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform).



Εικόνα 2.13.1: Όργανο μέτρησης απορρόφησης υπεριώθρου ακτινοβολίας

Πριν από τη λήψη του φάσματος δείγματος έγινε η λήψη του υποβάθρου background με KBr. Έτσι προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του χώρου σε υγρασία και CO₂, ώστε να αφαιρεθεί αργότερα από το δείγμα μέσω του προγράμματος. Background μέτρηση λαμβάναμε ανά 3 δείγματα προς αποφυγή διαφοροποίησης συνθηκών (π.χ. ξαφνική αυξημένη υγρασία χώρου ή πολύ διοξείδιο του άνθρακα), έτσι ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε τα φάσματα στην ανάλυση αποτελεσμάτων.

Τα δείγματα μας όντας λυοφιλωμένα, ήταν στη κατάλληλη μορφή (σχεδόν πούδρα) για τον υποδοχέα του φασματοφωτομέτρου. Και έτσι τοποθετώντας επαρκή ποσότητα στον υποδοχέα, λαμβάναμε τα φάσματα. Οι σχετικές παράμετροι πριν τη λήψη του φάσματος είναι οι εξής: Αριθμός φασμάτων= 32 (όπου βγαίνει αυτόματα ο μέσος όρος αυτών και ένα τελικό φάσμα εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή) και Ανάλυση= 4 cm⁻¹.

Η επεξεργασία των φασμάτων που λήφθηκαν έγινε με το πρόγραμμα Omnic 7.3. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θορύβου του αρχικού φάσματος που προκαλείται από την υγρασία, μέσω της εντολής automatic smooth. Μετά έγινε

διόρθωση της βασικής γραμμής με την εντολή automatic baseline correct του προγράμματος.

Σε κάθε περιοχή στην οποία επικεντρωθήκαμε, έγινε αρχικά μια διόρθωση της βασικής γραμμής, που είχε ως σκοπό, η κορυφή που θέλαμε να συγκρίνουμε και να αξιολογήσουμε, να κατέβει στη βασική γραμμή για να αποφευχθούν λάθη από τυχόν μετατόπιση ολόκληρου του φάσματος προς τα πάνω ή λόγω ποσοτικών διαφορών του δείγματος.

Αφού συγκεντρώσαμε όλα τα φάσματα, επιλέγουμε ένα ή δύο φάσματα ανά πείραμα και ανά επέμβαση τα οποία θα θεωρήσουμε πρότυπα. Τα κριτήρια, για να θεωρηθούν πρότυπα, είναι αφενός η ομοιογένεια του δείγματος και αφετέρου ο χρόνος λήψης του δείγματος δηλαδή να είναι σε αρχική μέτρηση του πειράματος T0 ή T1, ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε αρχικά δείγματα με τελικά.

Μετά την επιλογή των «προτύπων» φασμάτων ανά πείραμα, τα τοποθετούμε στο ίδιο με το υπό εξέταση φάσμα και εξετάζουμε τοπικές αλλαγές στις κορυφές που σηματοδοτούν τις οργανικές ενώσεις με τις οποίες ασχολούμαστε, τα φαινολικά οξέα. Μέσω του library setup του OMNIC προγράμματος, τοποθετούμε στη λίστα με τις βιβλιοθήκες τα πρότυπα, οπότε μπορούμε με αυτό τον τρόπο να συγκρίνουμε ολόκληρο ή μέρος ενός φάσματος με το αντίστοιχο πρότυπο και να ελέγξουμε το βαθμό ομοιότητας τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΠΡΩΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση θερμικής προεπεξεργασίας δειγμάτων (αποστείρωσης ή παστερίωσης)

Σκοπός του πρώτου πειράματος, αποτελεί η σύγκριση δύο πολύ κοινών μεθόδων προεπεξεργασίας των αποβλήτων των ελαιουργείων, με σκοπό πάντα την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους, και αυτές είναι η παστερίωση και η αποστείρωση. Είναι γνωστό ότι η παστερίωση είναι πιο ήπια διεργασία αναφορικά με τη δράση της στους μικροοργανισμούς ενώ η αποστείρωση θανατώνει ακόμα και τους πιο ανθεκτικούς οργανισμούς.

Χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες λευκής σήψης *Abortiporus biennis* και το *Phanerochaete chrysosporium*, γνωστοί για τις λιγνινολυτικές τους ιδιότητες, όπως αναλύθηκε παραπάνω.

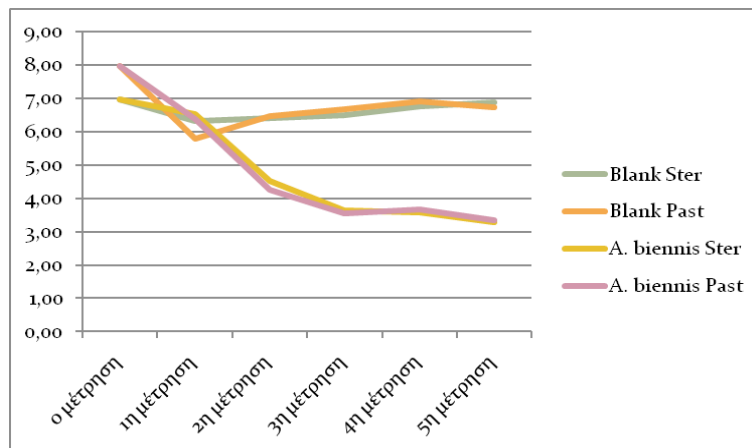
Η επώαση τους με ΥΑΕ θα μας εκφράσει επιπλέον τη δυναμική τους για πιθανή αποδόμηση των πολύ τοξικών για το οικοσύστημα φαινολικών ουσιών που περιέχονται στα υγρά απόβλητα. Ποια είναι πιο συμφέρουσα λοιπόν διεργασία για την υποβοήθηση των μυκήτων, η αποστείρωση ή η παστερίωση είναι το ερώτημα που θέτουμε.

3.1.1. Μετρήσεις Φαινολικών και αποχρωματισμού

Παρατηρώντας το παρακάτω διάγραμμα μείωσης των φαινολικών ουσιών στο *Abortiporus biennis* βλέπουμε ότι σαν τελικό αποτέλεσμα τα φαινολικά μειώθηκαν και φτάσανε στην ίδια τιμή, ή ήταν το αποστειρωμένο είτε το παστεριωμένο. Καλύτερη απόδοση φαίνεται να υπάρχει στην παστερίωση (Διάγραμμα 3.1.1.1). Παρατηρώντας το αντίστοιχο διάγραμμα για το *Phanerochaete chrysosporium* βλέπουμε σαφώς μικρότερη μείωση φαινολικών ουσιών και όπως και στο *A. biennis*, μια σχετικά καλύτερη απόδοση στην παστερίωση (Διάγραμμα 3.1.1.2).

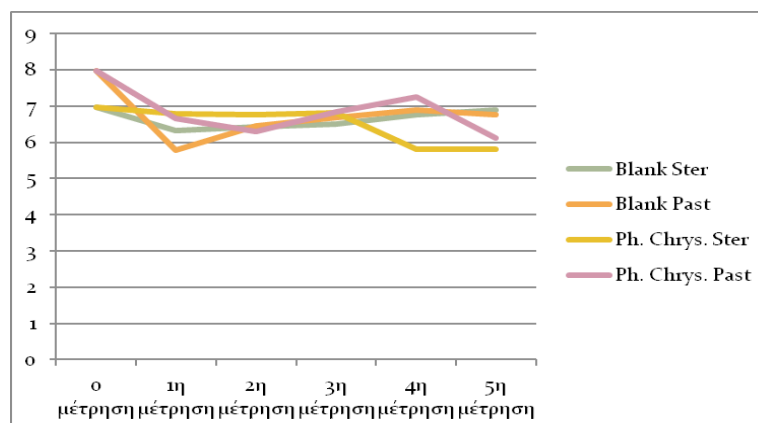
Συγκεκριμένα, σε αρχική μέτρηση (T0) για παστερίωση έχουμε τιμή 7,97 g/L φαινολικών ουσιών και σαν τελική μέτρηση (T5) για το *A. biennis* πήραμε τιμή 3,35 g/L, σχεδόν 5 g/L πτώση, κάτι αρκετά ενθαρρυντικό. Για το *Ph. chrysosporium* πήραμε τιμή 6,12 g/L σχεδόν κατά το ήμισυ την μείωση που έκανε το *A. biennis*.

Από την άλλη, σε αρχική μέτρηση (T0) για αποστείρωση έχουμε τιμή 6,98 g/L φαινολικών ουσιών και σαν τελική μέτρηση (T5) για το *A. biennis* πήραμε τιμή 3,27 g/L, κάτι πολύ παρεμφερές με την παστερίωση. Για το *Ph. chrysosporium* πήραμε τιμή 5,81 g/L δηλαδή μικρότερη μείωση φαινολικών από την παστερίωση.



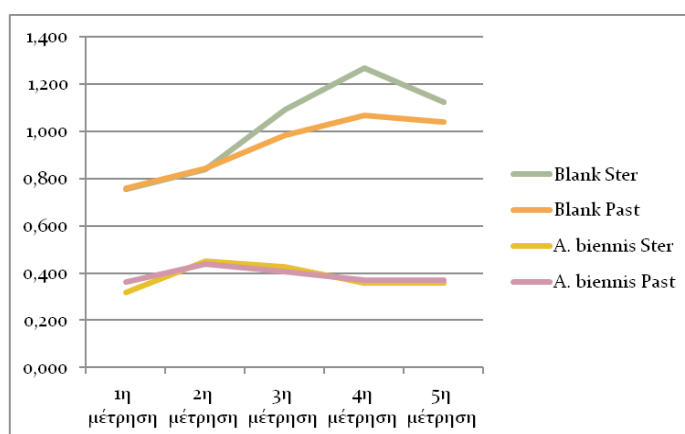
Διάγραμμα 3.1.1.1. Πορεία των **φαινολικών ουσιών** στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για το *Abortiporus biennis*.

Διάγραμμα
Πορεία των
φαινολικών
ουσιών
στη
διάρκεια
των 30
ημερών για το *Phanerochaete chrysosporium*.

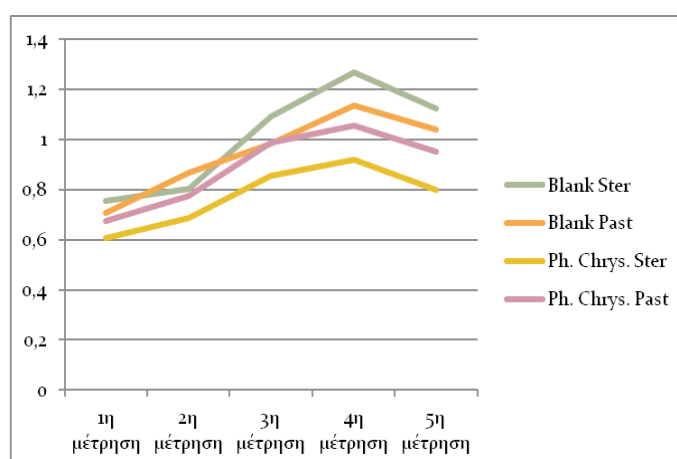


3.1.1.2.
ουσιών
διάρκεια
των 30

Στο θέμα του αποχρωματισμού του αποβλήτου, από τα δύο επόμενα διαγράμματα παρατηρούμε ότι το *A. biennis* έχει περίπου 50% μείωση του χρώματος και στις δύο περιπτώσεις κάτι που συνάδει και από την αντίστοιχη μείωση των φαινολικών ουσιών. Σε αντίθεση, το *Ph. chrysosporium* έχει αύξηση του χρώματος με το πέρασμα των ημερών και στις δυο επεξεργασίες, και με τον ίδιο ρυθμό κάτι που ενδεχομένως εξηγείται από την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού του μύκητα που επιδρούν στη καθαρότητα του υγρού μέσου.



Διάγραμμα 3.1.1.3. Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για το *Abortiporus biennis*.

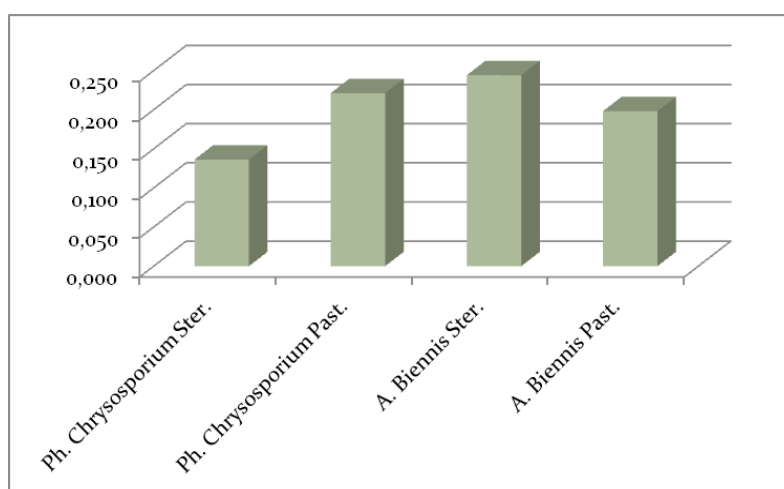


Διάγραμμα 3.1.1.4. Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών για τη *Phanerochaete chrysosporium*.

3.1.2. Παραγωγή βιομάζας

Παρατηρούμε στο διάγραμμα που ακολουθεί μια αντίθετη συμπεριφορά σε ό,τι αφορά την τελική παραγωγή βιομάζας από τα δύο αυτά στελέχη.

Το *A. biennis* απέδωσε μεγαλύτερη βιομάζα στο αποστειρωμένο μέσο, ενώ στο *Ph. chrysosporium* υπερέτησε σε βιομάζα στο παστεριωμένο μέσο, με μεγαλύτερη τελική μάζα στην ομάδα των αποστειρωμένων να έχει το *A. biennis* και στα παστεριωμένα το *Ph. chrysosporium*.



Διάγραμμα 3.1.2.1. Παραγωγή βιομάζας (σε g) *Abortiporus biennis* και *Phanerochaete chrysosporium*.

3.1.3. Ενεργότητα ενζύμων

Για το *Abortiporus biennis* ακολουθεί λεπτομερής πίνακας (Πίνακας 3.1.1) με τις ενεργότητες των ενζύμων που καταγράφηκαν.

Σε αυτόν παρατηρούμε τα εξής:

- Η λακκάση καθυστέρησε να ενεργοποιηθεί στο παστεριωμένο υλικό, αλλά τελικά παστεριωμένο-αποστειρωμένο κυμαίνονται σε παρόμοια ενεργότητα.

- Στην υπεροξειδάση την εξαρτημένη του Mn, βλέπουμε ενεργότητα μόνο στο παστεριωμένο υλικό και κάποια ενεργότητα εμφανίζεται στο αποστειρωμένο την 18^η μέρα.
- Η λιγνίνη υπεροξειδάση ενεργοποιήθηκε σίγουρα μετά τη 12^η μέρα πειράματος και έδωσε μεγάλες τιμές και σε παστεριωμένο υλικό αλλά πολύ περισσότερο στο αποστειρωμένο υλικό.

Πίνακας 3.1.3.1. Ενεργότητες ενζύμων για το *Abortiporus biennis* σε U (μmol/min).

<i>Abortiporus biennis</i>	Επέμβαση	1η μέτρηση	2η μέτρηση	3η μέτρηση	4η μέτρηση	5η μέτρηση
Laccase	Αποστείρωση	0	43,33± 9,64	188,6± 9,11	222,52± 9,77	222,12± 25,93
	Παστερίωση	0,19± 0,109	139,75± 18,09	197,96± 7,86	246,19± 9,52	243,32± 15,1
Mn-peroxidase	Αποστείρωση	0	0	0	12,39± 4	11,56± 2,82
	Παστερίωση	3,26± 1,66	5,93± 0,92	7,36± 0,67	12,82± 2,42	17,76± 3,85
Lignin Peroxidase	Αποστείρωση	0	0	177,69± 14,84	729,78± 11,38	464,82± 15,8
	Παστερίωση	0	0	133,45± 53,09	162,88± 71	184,54± 65,26

Για το *Phanerochaete chrysosporium*, δεν ανιχνεύτηκε λακκάση κάτι που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Η υπεροξειδάση δείχνει μια

ενεργότητα για το παστεριωμένο αλλά είναι μικρή. Στο αποστειρωμένο υλικό ανιχνεύτηκε λιγνίνη υπεροξειδάση αλλά και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης στα ίδια επίπεδα.

3.2. ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση της ανάδευσης των καλλιιεργειών και της προσθήκης μετάλλων (συνενζύμων)

Στο πρώτο πείραμα αναζητήσαμε την καλύτερη προεργασία για το απόβλητο και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *A. biennis* έχει καλύτερη ανταπόκριση σε αποστειρωμένο υλικό με υψηλότερη παραγωγή βιομάζας, και περισσότερη δραστηριότητα του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση, αν και με παρόμοια αποτελέσματα σε φαινολικά και χρώμα ενώ οι δείκτες για το *Ph. chrysosporium* είναι παρεμφερείς και για τις δύο προεργασίες. Δε πήραμε κάποιο σαφές αποτέλεσμα ότι η παστερίωση είναι καλύτερη προεργασία, πόσο μάλλον μετά τα αποτελέσματα της αύξησης του χρώματος του ΥΑΕ με το *Ph. chrysosporium*.

Συμπερασματικά, επιλέγουμε την αποστείρωση για το επόμενο πείραμα.

Σκοπός του δεύτερου πειράματος είναι η εύρεση της καλύτερης συνθήκης για την αποδόμηση των φαινολικών ουσιών με επιλογή από αναδέυση του υπό επώαση διαλύματος, για καλύτερο αερισμό του συστήματος, ή μη και την επιλογή για προσθήκη μικροποσοτήτων μετάλλων χαλκού και μαγγανίου σε συνδυασμούς, για επιπλέον θρεπτικά υλικά για τους μύκητες, ή μη. Όπως αναλύσαμε παραπάνω επιλέγουμε την αποστείρωση για προεργασία στα ΥΑΕ.

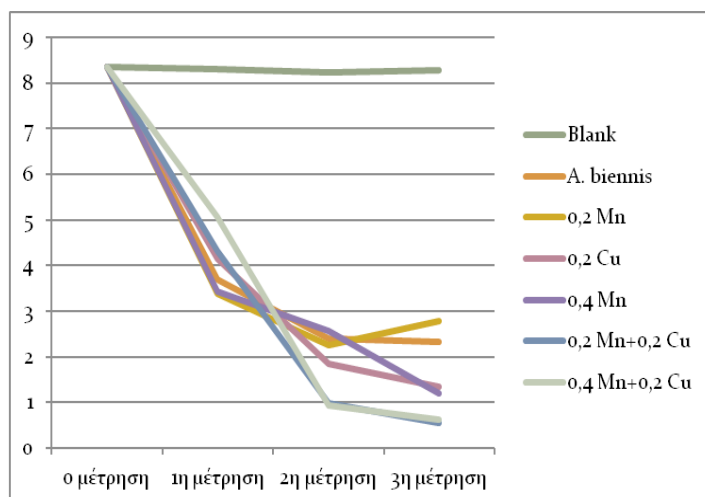
Οι φιάλες με τις υγρές καλλιέργειες με το μύκητα περιήχαν: απόβλητο χωρίς προσθήκες και με προσθήκες μετάλλων: 0,2mM MnSO₄, με 0,2mM CuSO₄, με 0,4mM MnSO₄, με 0,2mM MnSO₄+ 0,2mM CuSO₄ και με 0,4mM MnSO₄+0,2mM CuSO₄.

3.2.1. Μετρήσεις Φαινολικών και Αποχρωματισμού

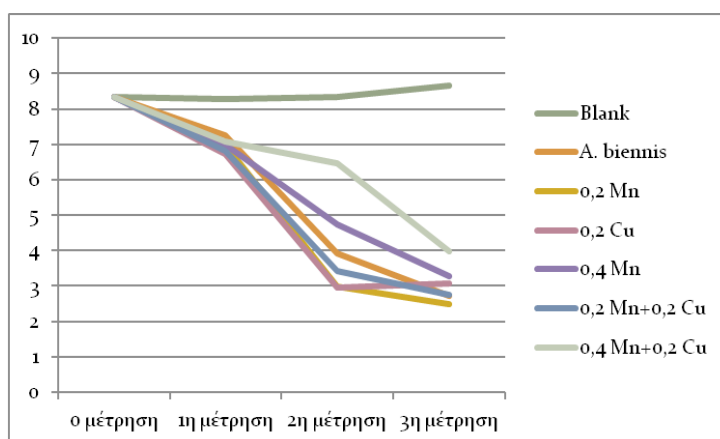
Abortiporus biennis

Φαινολικά: Η μείωση των φαινολικών ουσιών των ΥΑΕ παρουσία αυτού του μύκητα ήταν μεγάλη για τις μη αναδευόμενες φιάλες αλλά ακόμη μεγαλύτερη για τις

αναδευόμενες φιάλες. Είναι εντυπωσιακά τα νούμερα: 93% μείωση φαινολικών για το *A. biennis* με προσθήκη 0,2mM MnSO₄+ 0,2mM CuSO₄ σε αναδευόμενες φιάλες και 67% οι μη αναδευόμενες. Αναλυτικές τιμές και διαγράμματα παρακάτω.



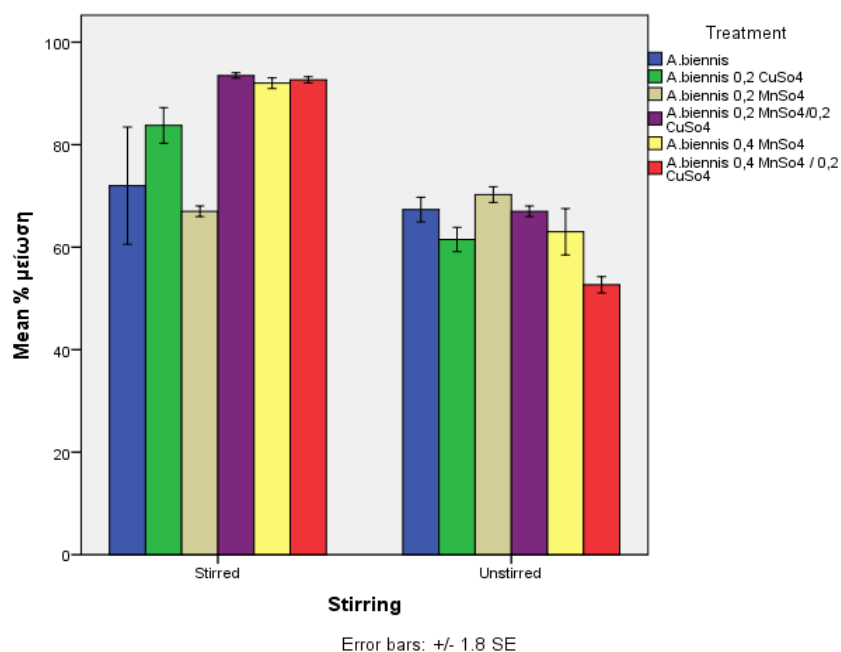
Διάγραμμα 3.2.1.1: Πορεία των **φαινολικών ουσιών** στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Abortiporus biennis* στις **αναδευόμενες φιάλες**.



Διάγραμμα 3.2.1.2: Πορεία των **φαινολικών ουσιών** στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Abortiporus biennis* στις **μη αναδευόμενες φιάλες**.

Πίνακας 3.2.1.1. Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών σε *Abortiporus biennis* σε αναδευόμενες και μη φιάλες.

Abortiporus biennis: % μείωση φαινολικών ουσιών		
	ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ	ΜΗ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ
Χωρίς προσθήκη μετάλλων	72,1	67,4
Με 0,2mM MnSO ₄	66,8	70,3
Με 0,2mM CuSO ₄	84,0	61,4
Με 0,4mM MnSO ₄	91,9	63,4
Με 0,2mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	93,4	67,1
Με 0,4mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	92,5	52,4

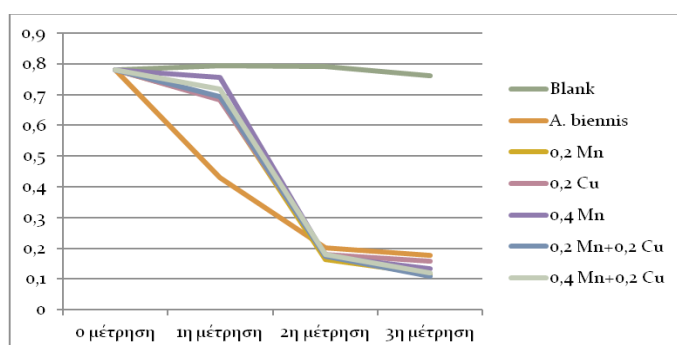


Διάγραμμα 3.2.1.3.: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών σε αναδευόμενες (αριστερά) και μη αναδευόμενες (δεξιά) φιάλες για το *Abortiporus biennis*.

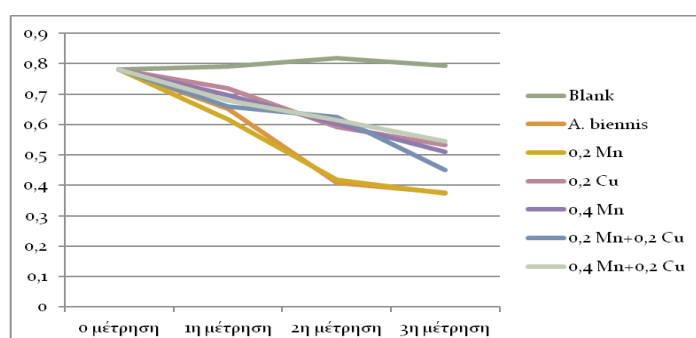
Στις αναδευόμενες φιάλες τις καλύτερες αποδόσεις τις έχουν το 0,2Mn+0,2Cu, το 0,4Mn+0,2Cu και το 0,4Mn, ενώ την χειρότερη αναλογικά απόδοση έχει το *A.biennis*

0,2Mn. Σε αντίθεση, για τις **μη αναδευόμενες φιάλες** την καλύτερη απόδοση έχει το 0,2Mn με το 0,2Mn+0,2Cu και η επέμβαση χωρίς προσθήκη μετάλλων να ακολουθούν. Σαν μέσος όρος, η % μείωση φαινολικών στις αναδευόμενες φιάλες είναι περίπου 25% περισσότερη σε σχέση με τις μη αναδευόμενες φιάλες.

Αποχρωματισμός: Ο αποχρωματισμός του ΥΑΕ στις αναδευόμενες φιάλες είναι της τάξης του 80% ενώ στις μη αναδευόμενες φιάλες της τάξης του 40%. Τον μεγαλύτερο αποχρωματισμό είχαν οι φιάλες με προσθήκη 0,2mM MnSO₄+ 0,2mM CuSO₄, κάτι που συμπίπτει και με τη μεγαλύτερη μείωση στις φαινολικές ουσίες. Τον μικρότερο αποχρωματισμό έκαναν οι φιάλες χωρίς μέταλλα και κυμάνθηκε στο 51%.



Διάγραμμα 3.2.1.4: Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Abortiporus biennis* στις **αναδευόμενες φιάλες**.

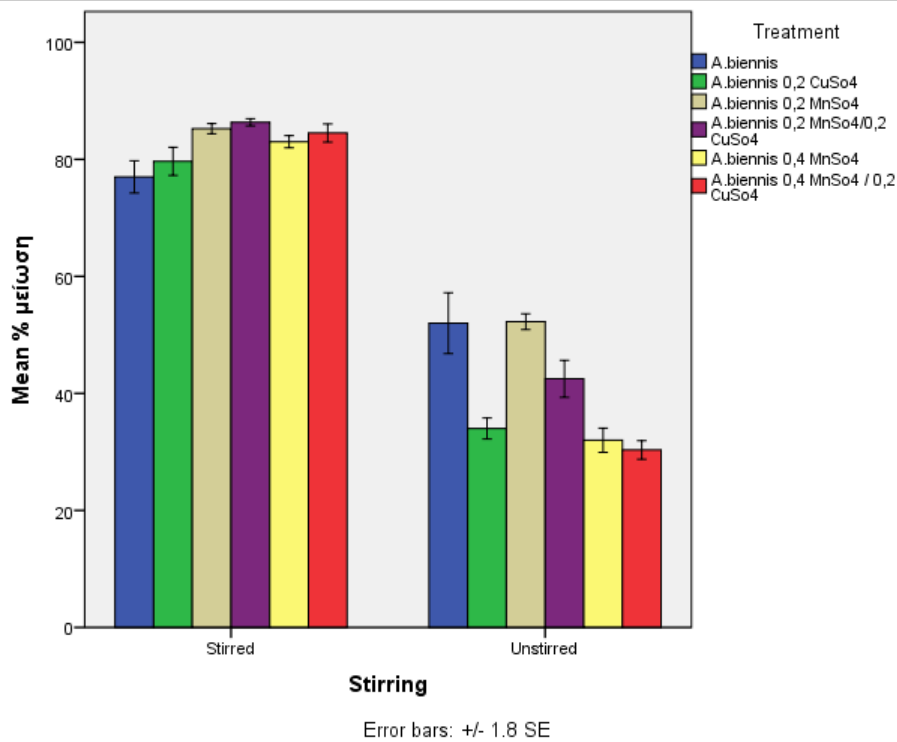


Διάγραμμα 3.2.1.5: Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Abortiporus biennis* στις **μη Αναδευόμενες φιάλες**.

Πίνακας 3.2.1.2: Η επί % **μείωση του χρώματος** του ΥΑΕ με *Abortiporus biennis* σε αναδευόμενες και μη φιάλες.

Abortiporus biennis: % μείωση χρώματος ΥΑΕ.

	ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ	ΜΗ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ
Χωρίς προσθήκη μετάλλων	77,2	51,9
Με 0,2mM MnSO ₄	85,1	52,3
Με 0,2mM CuSO ₄	79,8	33,9
Με 0,4mM MnSO ₄	83,0	32,0
Με 0,2mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	86,1	42,4
Με 0,4mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	84,5	30,4



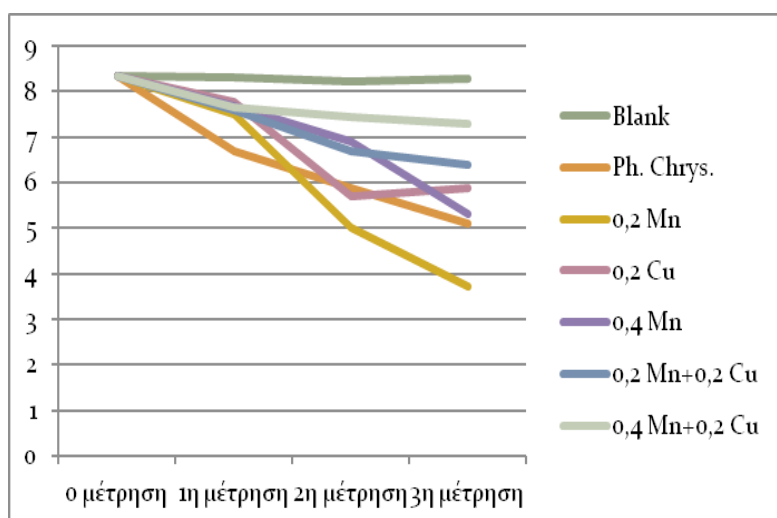
Διάγραμμα 3.2.1.6: Η επί % μείωση του χρώματος σε αναδευόμενες(αριστερά) και μη αναδευόμενες(δεξιά) φιάλες για το *Abortiporus biennis*.

Παρατηρούμε ότι για τις **αναδευόμενες φιάλες** τις τρεις καλύτερες αποδόσεις με πολύ μικρή διαφορά μεταξύ τους τις έχουν το 0,2 mM Mn+0,2 mM Cu, το 0,4 mM Mn+0,2 mM Cu και το 0,2 mM Mn, ενώ τη χειρότερη αναλογικά απόδοση έχει η επέμβαση χωρίς μέταλλα. Σε αντίθεση, για τις **μη αναδευόμενες φιάλες** την

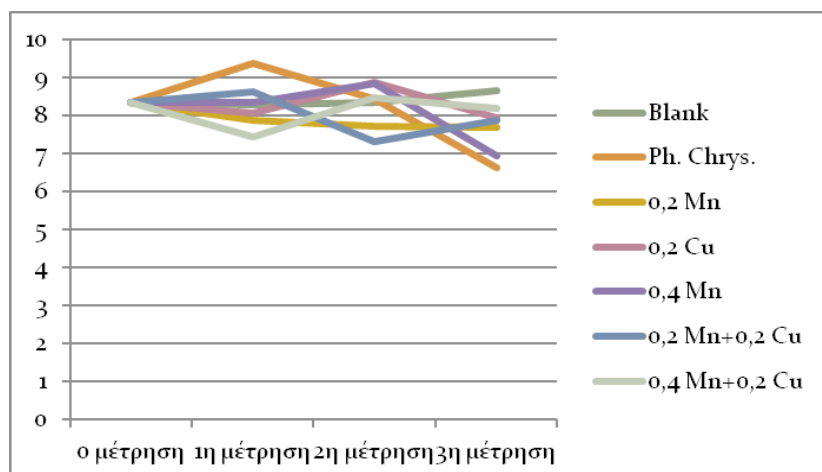
καλύτερη απόδοση έχει το 0,2Mn με την επέμβαση χωρίς προσθήκη μετάλλων και το 0,2 mM Mn+0,2 mM Cu να ακολουθούν. Οι μετρήσεις του αποχρωματισμού παρατηρούμε ότι έρχονται σε αρκετά καλή συμφωνία με τις αντίστοιχες μετρήσεις των φαινολικών ουσιών.

Phanerochaete chrysosporium:

Φαινολικά: Η μείωση των φαινολικών ουσιών των ΥΑΕ παρουσία αυτού του μύκητα ήταν μικρότερη σε σχέση με το *A. biennis* αλλά μεγαλύτερη για τις αναδευόμενες φιάλες αλλά αρκετά μικρότερη για τις μη αναδευόμενες φιάλες. Ενδεικτικά: 55,6% μείωση φαινολικών για το *Ph. chrysosporium* με προσθήκη 0,2mM MnSO₄ σε αναδευόμενες φιάλες και το εντυπωσιακά μικρότερο 7% στις μη αναδευόμενες φιάλες. Στις μη αναδευόμενες φιάλες τη μεγαλύτερη μείωση τη μετρήσαμε στα δείγματα με *Ph. chrysosporium* χωρίς προσθήκη μετάλλων. Αναλυτικές τιμές και διαγράμματα παρακάτω.



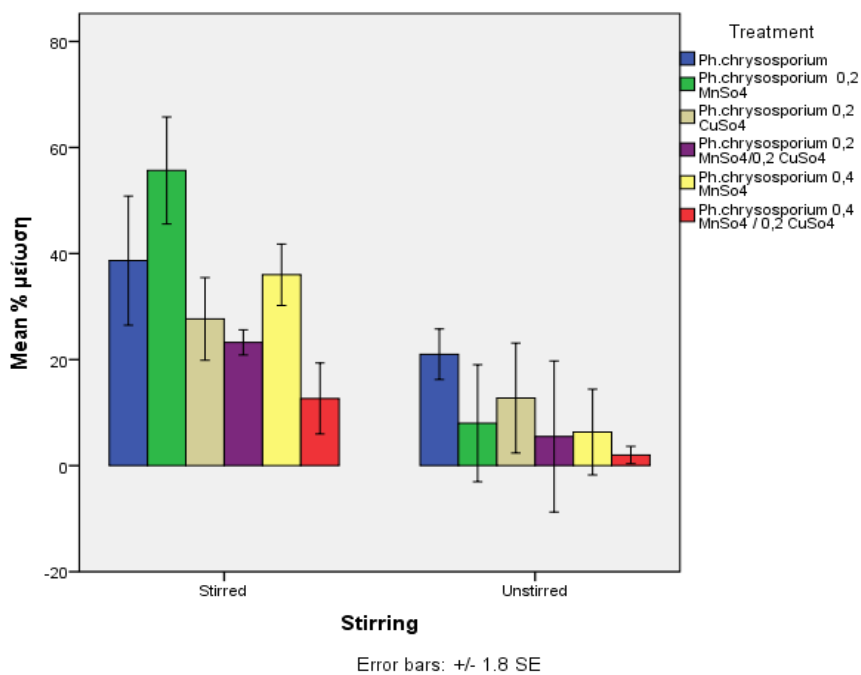
Διάγραμμα 3.2.1.7: Πορεία των φαινολικών ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Phanerochaete chrysosporium* στις αναδευόμενες φιάλες.



Διάγραμμα 3.2.1.8: Πορεία των **φαινολικών** ουσιών στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Phanerochaete chrysosporium* στις **μη αναδευόμενες** φιάλες.

Πίνακας 3.2.1.3: Η επί % **μείωση** των **φαινολικών ουσιών** με *Phanerochaete chrysosporium* σε αναδευόμενες και μη φιάλες.

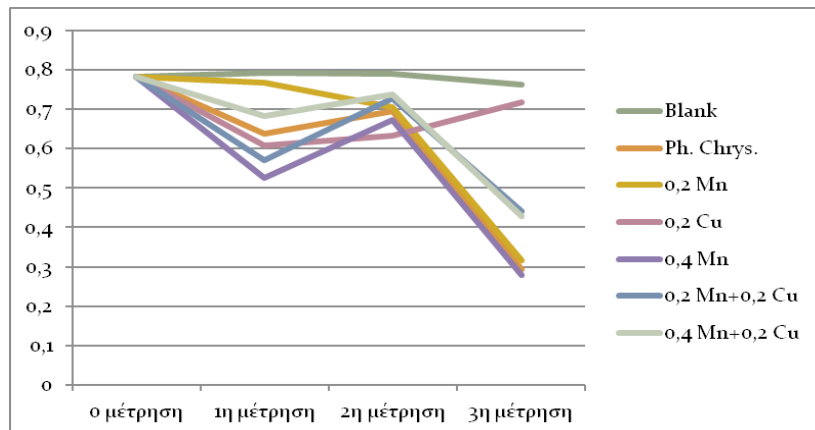
Phanerochaete chrysosporium: % μείωση φαινολικών ουσιών		
	ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ	ΜΗ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ
Χωρίς προσθήκη μετάλλων	39,0	20,8
Με 0,2mM MnSO ₄	55,6	7,9
Με 0,2mM CuSO ₄	27,7	12,8
Με 0,4mM MnSO ₄	36,4	6,3
Με 0,2mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	23,5	5,7
Με 0,4mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	12,6	1,9



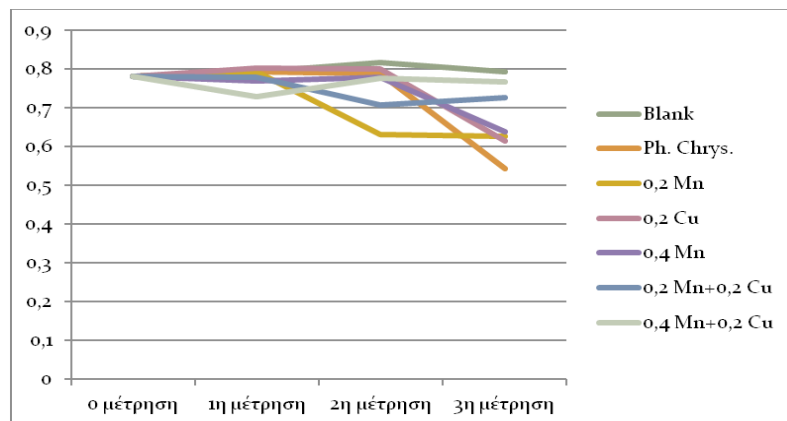
Διάγραμμα 3.2.1.9: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με *Phanerochaete chrysosporium* σε αναδευόμενες (αριστερά) και μη αναδευόμενες (δεξιά) φιάλες.

Παρατηρούμε ότι για τις αναδευόμενες φιάλες τις τρεις καλύτερες αποδόσεις τις έχουν τα 0,2 mM Mn, 0,4 mM Mn και η επέμβαση χωρίς προσθήκη μετάλλων. Τη χειρότερη αναλογικά απόδοση έχει η επέμβαση 0,4 mM Mn+0,2 mM Cu. Αντίθετα, για τις μη αναδευόμενες φιάλες την καλύτερη απόδοση έχει η επέμβαση χωρίς μέταλλα, και ακολουθούν οι 0,2 mM Cu και 0,2 mM Mn. Σαν μέσος όρος, η % μείωση των φαινολικών στις αναδευόμενες φιάλες είναι πάνω από 100% περισσότερη σε σχέση με τις μη αναδευόμενες φιάλες.

Αποχρωματισμός: Ο αποχρωματισμός του ΥΑΕ στις αναδευόμενες φιάλες είναι της τάξης του 60% στις μισές και του 35% στις άλλες μισές ενώ στις μη αναδευόμενες φιάλες της τάξης του 20%. Τον μεγαλύτερο αποχρωματισμό είχαν οι φιάλες με προσθήκη 0,4mM MnSO₄ και αμέσως μετά οι φιάλες 0,2mM MnSO₄ στις αναδευόμενες φιάλες, κάτι που συμφωνεί αρκετά με τις αντίστοιχες μειώσεις στις φαινολικές ουσίες. Τον μικρότερο αποχρωματισμό έκαναν οι αναδευόμενες φιάλες με προσθήκη 0,2mM CuSO₄ και 0,4 mM Mn+0,2 mM Cu σε μη αναδευόμενες φιάλες.



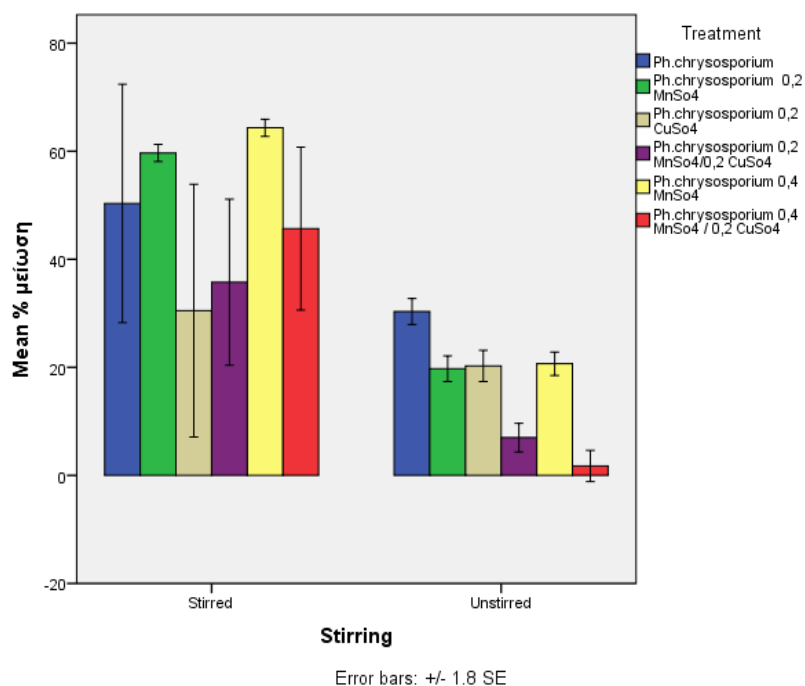
Διάγραμμα 3.2.1.10: Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Phanerochaete chrysosporium* στις **αναδεδυόμενες** φιάλες.



Διάγραμμα 3.2.1.11: Πορεία του **χρώματος** του ΥΑΕ στη διάρκεια της επώασης των 21 ημερών για το *Phanerochaete chrysosporium* στις **μη αναδεδυόμενες** φιάλες.

Πίνακας 3.2.1.4: Η επί % μείωση του χρώματος του ΥΑΕ με *Phanerochaete chrysosporium* σε αναδευόμενες και μη φιάλες.

Phanerochaete chrysosporium: % μείωση χρώματος ΥΑΕ.		
	ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ	ΜΗ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ
Χωρίς προσθήκη μετάλλων	50,4	30,5
Με 0,2mM MnSO ₄	59,6	19,9
Με 0,2mM CuSO ₄	30,5	20,2
Με 0,4mM MnSO ₄	60,4	20,9
Με 0,2mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	35,8	7,1
Με 0,4mM MnSO ₄ + 0,2mM CuSO ₄	45,3	1,8

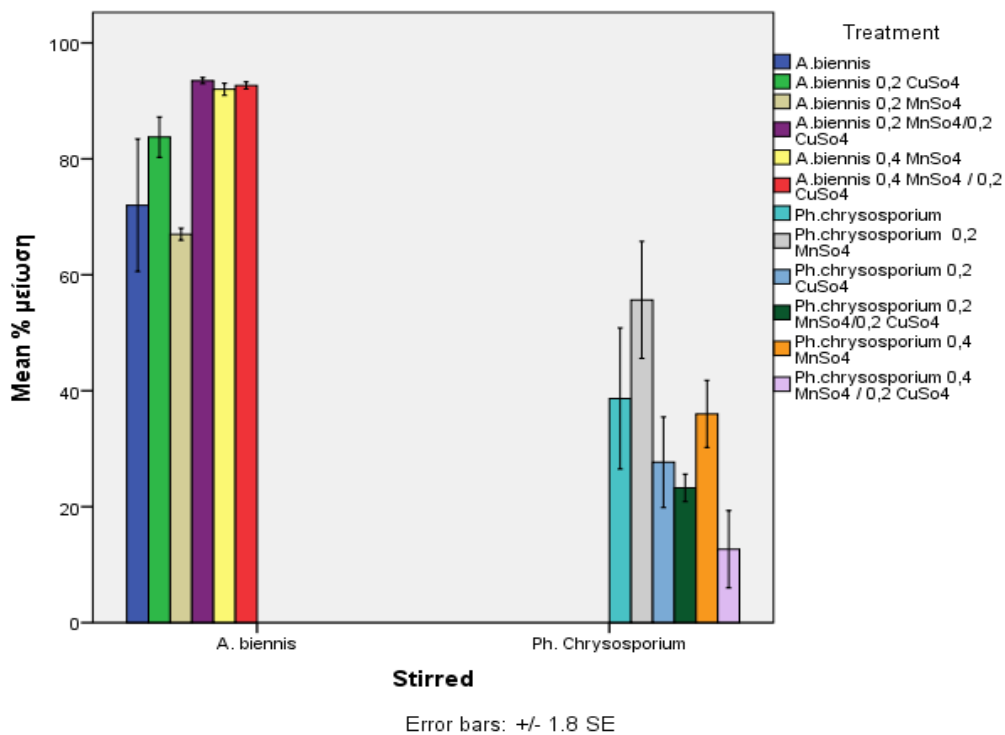


Διάγραμμα 3.2.1.12: Η επί % μείωση του χρώματος σε αναδευόμενες (αριστερά) και μη αναδευόμενες (δεξιά) φιάλες για το *Phanerochaete chrysosporium*.

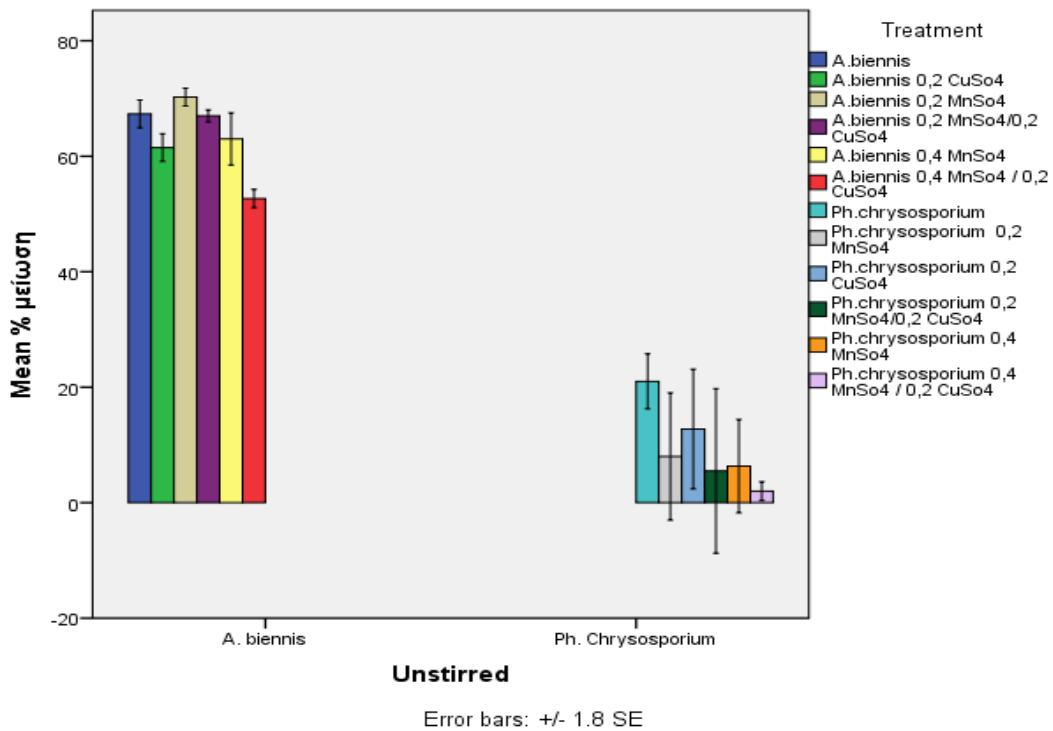
Παρατηρούμε ότι για τις αναδευόμενες φιάλες τις τρεις καλύτερες αποδόσεις τις έχουν οι επεμβάσεις 0,4 mM Mn, 0,2 mM Mn και εκείνη χωρίς μέταλλα, ενώ την χειρότερη αναλογικά απόδοση έχει η 0,2 mM Cu. Οι μη αναδευόμενες φιάλες έχουν

τη καλύτερη απόδοση τους στην επέμβαση χωρίς μέταλλα, με τις 0,4 mM Mn και 0,2 mM Mn να ακολουθούν. Οι μετρήσεις του αποχρωματισμού είναι σε πολύ καλή συμφωνία με τις αντίστοιχες μετρήσεις των φαινολικών ουσιών.

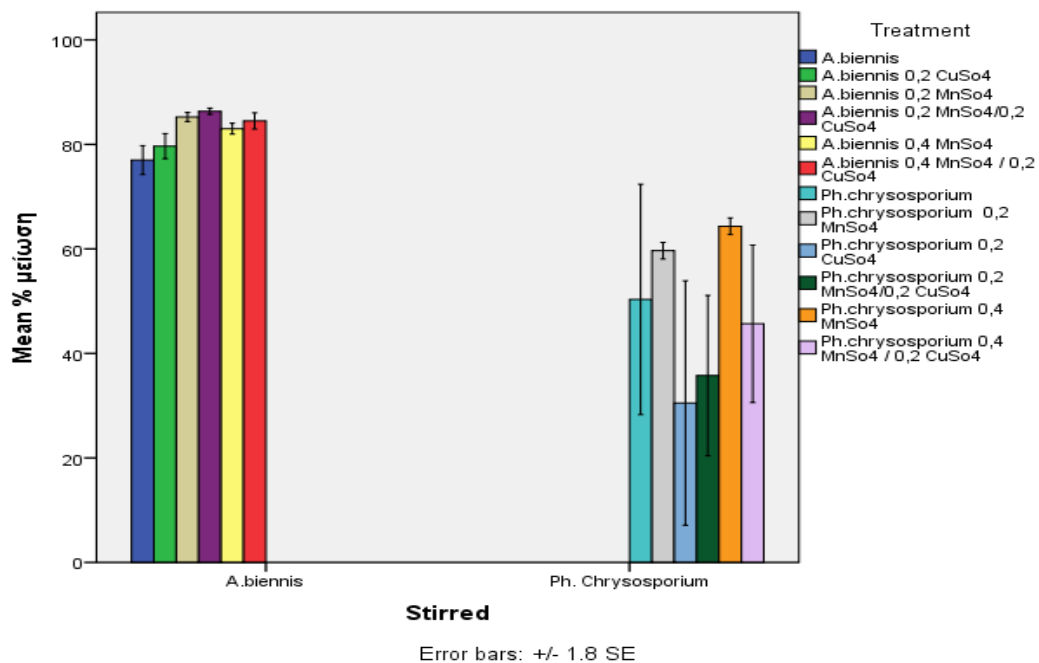
Ακολουθούν τέσσερα συγκεντρωτικά διαγράμματα που αφορούν με σύγκριση μεταξύ των δύο στελέχων μυκήτων *A. biennis* και *Ph. chrysosporium*. Είναι σαφές ότι ο πρώτος υπερτερεί αρκετά σε απόδοση βιοαποδόμησης φαινολικών ουσιών και αποχρωματισμού στα ΥΑΕ σε σχέση με τον δεύτερο.



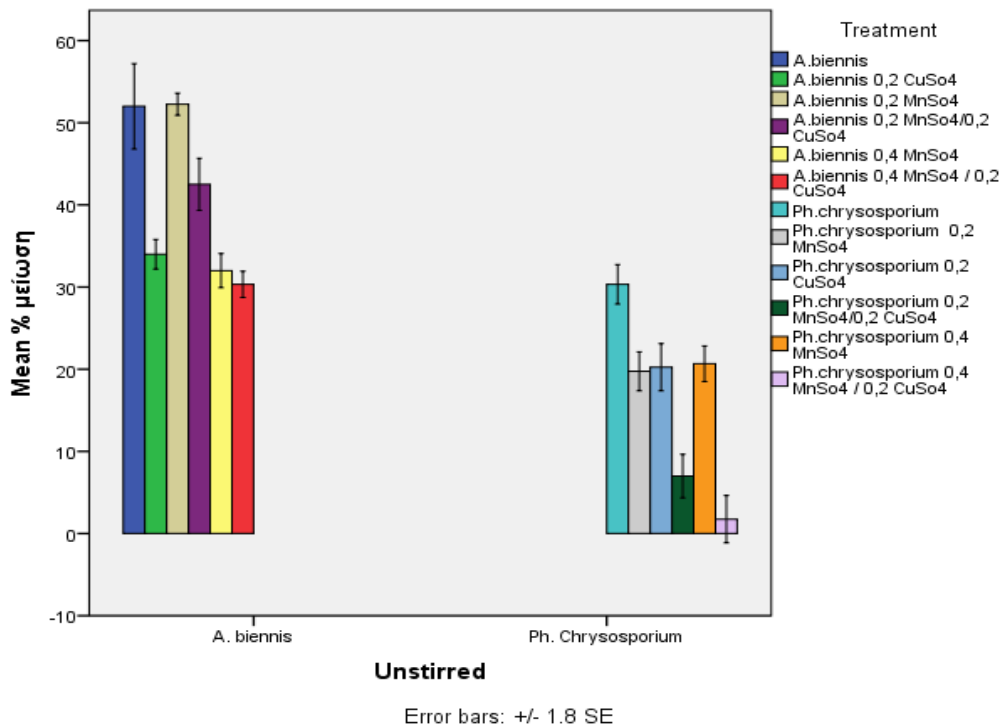
Διάγραμμα 3.2.1.13: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με *Abortiporus biennis* (αριστερά) και *Phanerochaete chrysosporium* (δεξιά) σε αναδεδυόμενες φιάλες.



Διάγραμμα 3.2.1.14: Η επί % μείωση των φαινολικών ουσιών με *Abortiporus biennis* (αριστερά) και *Phanerochaete chrysosporium* (δεξιά) σε Μη αναδευόμενες φιάλες.



Διάγραμμα 3.2.1.15: Η επί % μείωση του χρώματος με *Abortiporus biennis* (αριστερά) και *Phanerochaete chrysosporium* (δεξιά) σε αναδευόμενες φιάλες.

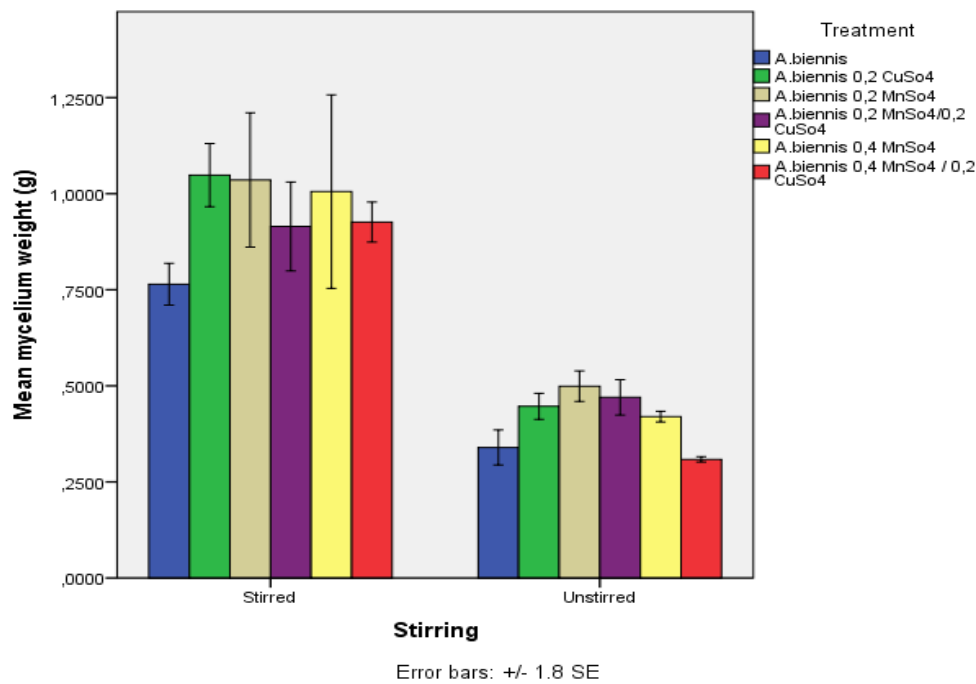


Διάγραμμα 3.2.1.16: Η επί % μείωση του χρώματος με *Abortiporus biennis* (αριστερά) και *Phanerochaete chrysosporium* (δεξιά) σε μη Αναδευόμενες φιάλες.

3.2.2. Παραγωγή βιομάζας

Abortiporus biennis

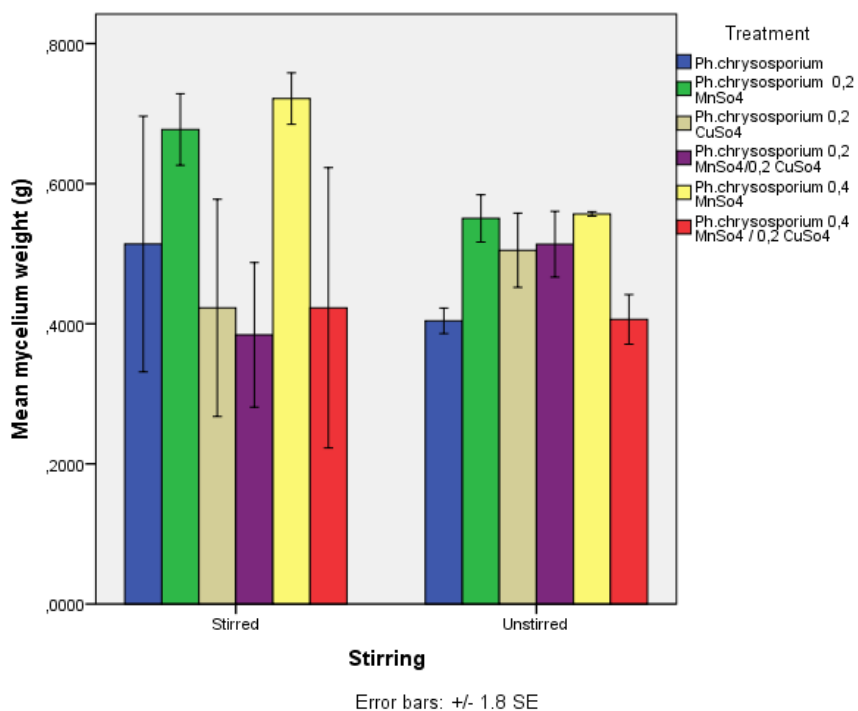
Η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας *A. biennis* παρατηρήθηκε στις αναδευόμενες φιάλες στο ΥΑΕ με 0,2mM CuSO₄ ακολουθούμενο από τα 0,2mM MnSO₄ και 0,4mM MnSO₄ και η παραγωγή σε αυτά κυμάνθηκε περί το 1g. Στις μη αναδευόμενες φιάλες τα τρία καλύτερα αποτελέσματα τα είχαν οι φιάλες με 0,2mM MnSO₄, 0,2mM MnSO₄+0,2mM CuSO₄ και 0,2mM CuSO₄ και η παραγωγή ήταν περί το 0,5g.



Διάγραμμα 3.2.2.1: Η παραγωγή μυκηλίου σε g *Abortiporus biennis* σε αναδευόμενες φιάλες (αριστερά) και μη αναδευόμενες φιάλες (δεξιά).

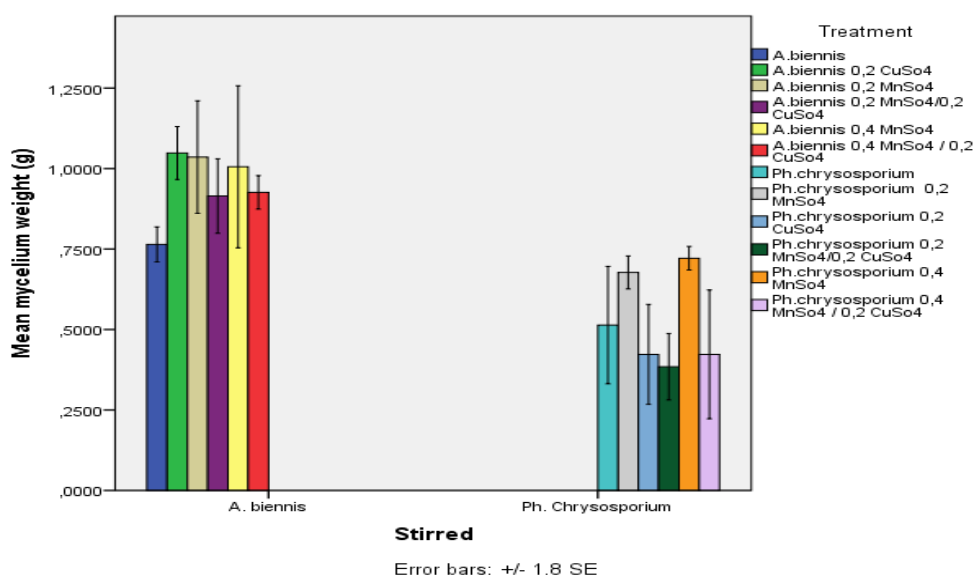
Phanerochaete chrysosporium

Η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας *Ph. chrysosporium* παρατηρήθηκε στις αναδευόμενες φιάλες στο ΥΑΕ με 0,4mM MnSO₄ ακολουθούμενο από τα 0,2mM MnSO₄ και στην επέμβαση χωρίς μέταλλα. Η παραγωγή τους κυμάνθηκε στα 0,5-0,7g. Στις μη αναδευόμενες φιάλες τα τρία καλύτερα αποτελέσματα τα είχαν οι φιάλες με 0,4mM MnSO₄, με 0,2mM MnSO₄, και με 0,2mM MnSO₄+0,2mM CuSO₄ και η παραγωγή ήταν περί τα 0,5g.

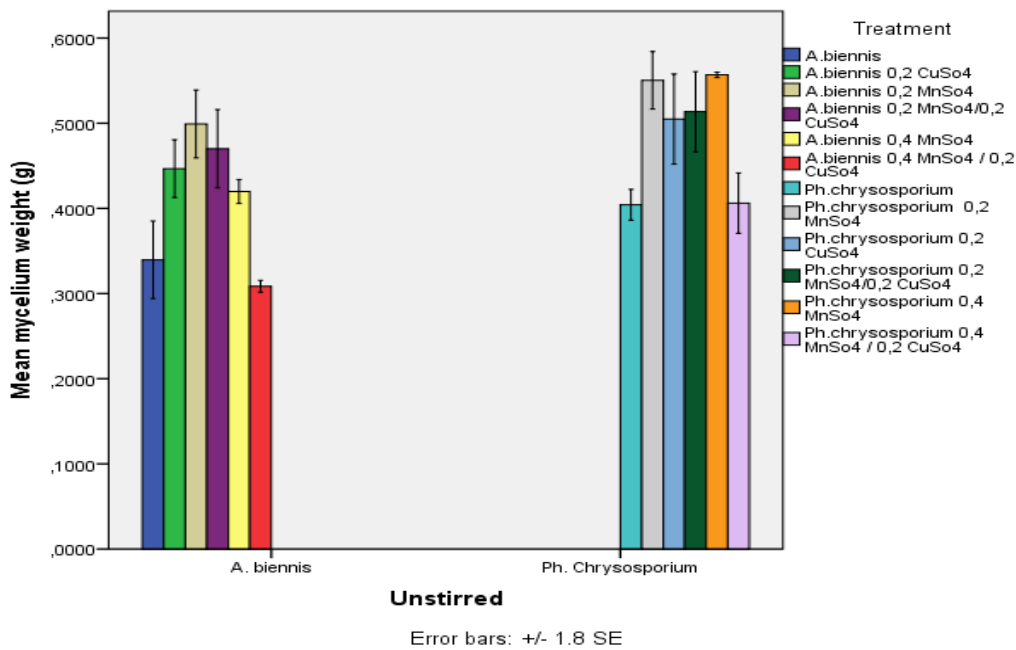


Διάγραμμα 3.2.2.2.: Η παραγωγή μυκηλίου σε g *Phanerochaete chrysosporium* σε αναδευόμενες φιάλες (αριστερά) και μη αναδευόμενες φιάλες (δεξιά).

Στις αναδευόμενες φιάλες παρήχθηκε περισσότερη βιομάζα από το *A. biennis*, ενώ στις μη αναδευόμενες φιάλες μεγαλύτερη βιομάζα παρουσίασε το *Ph. chrysosporium* (Διάγραμμα 3.2.2.3-4).



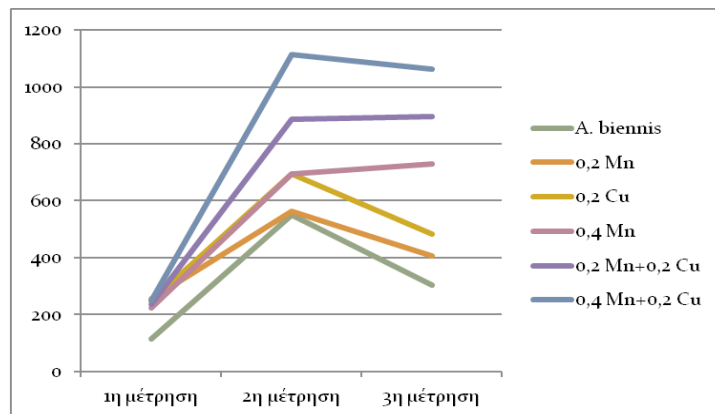
Διάγραμμα 3.2.2.3: Η παραγωγή μυκηλίου σε g στις αναδευόμενες φιάλες.



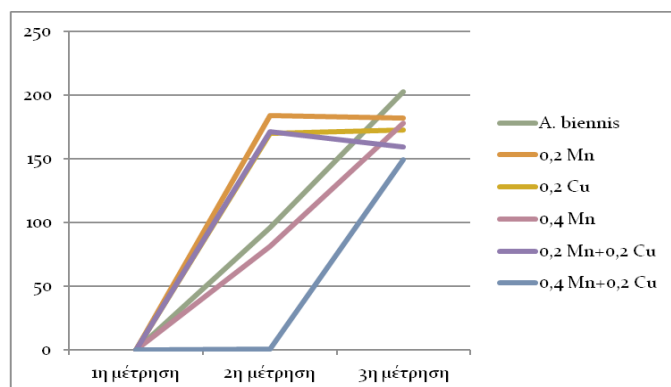
Διάγραμμα 3.2.2.4: Η παραγωγή μυκηλίου σε g στις μη αναδευόμενες φιάλες.

3.2.3. Ενεργότητα ενζύμων

Λακκάση



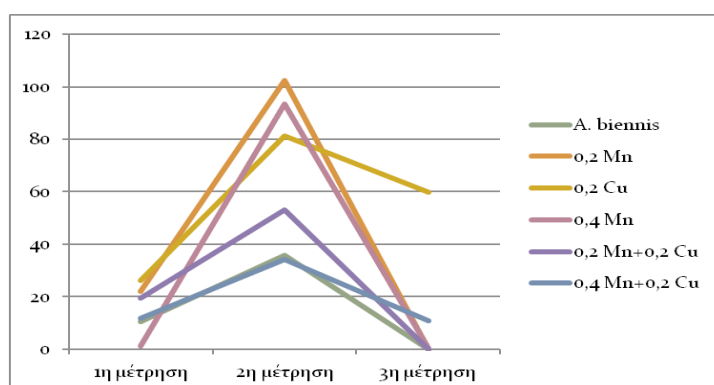
Διάγραμμα 3.2.3.1: Ενεργότητα λακκάσης από το *A. biennis* στις αναδευόμενες φιάλες.



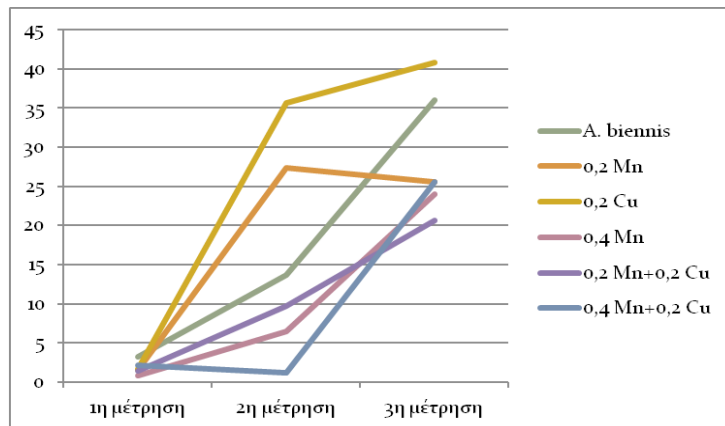
Διάγραμμα 3.2.3.2: Ενεργότητα λακκάσης από το *A. Biennis* στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.

Στις αναδεδυόμενες φιάλες, η λακκάση έφτασε στη μέγιστη ενεργότητα της την 14^η μέρα επώασης με την καταπληκτική μέτρηση περί τα 1100U για το 0,4 mM Mn+0,2 mM Cu, 900U για το 0,2 mM Mn+0,2 mM Cu και 700U για το 0,4 mM Mn. Στις μη αναδεδυόμενες φιάλες, βλέπουμε τεράστιες διαφορές σε σχέση με τις αναδεδυόμενες καθώς παρατηρούμε μια μέγιστη τιμή για τα 0,2 mM Mn, 0,2 mM Cu και 0,2 mM Mn+0,2 mM Cu ίση με 170-180U. Η λακκάση ενεργοποιείται μετά τη 14^η μέρα για το 0,4 mM Mn+0,2 mM Cu για να καταλήξει την 21^η μέρα στην παραγωγή 150U. Το *Ph. chrysosporium* δεν παράγει το ένζυμο λακκάση.

Mn- Υπεροξειδάση



Διάγραμμα 3.2.3.3: Ενεργότητα Mn- υπεροξειδάσης από το *A. biennis* στις αναδεδυόμενες φιάλες

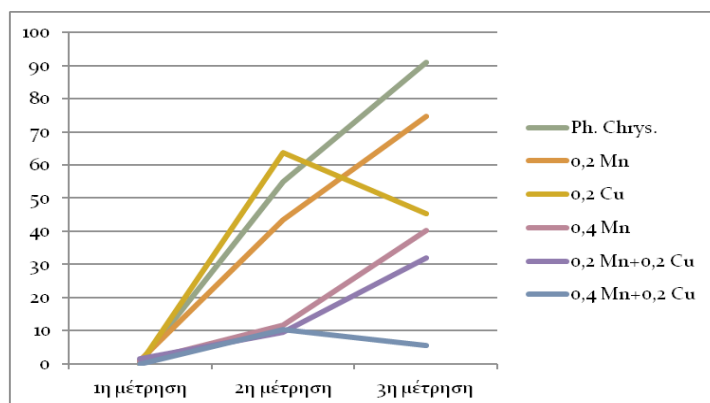


Διάγραμμα 3.2.3.4: Ενεργότητα Μn- υπεροξειδάσης από το *A. biennis* στις μη αναδεδυόμενες φιάλες.

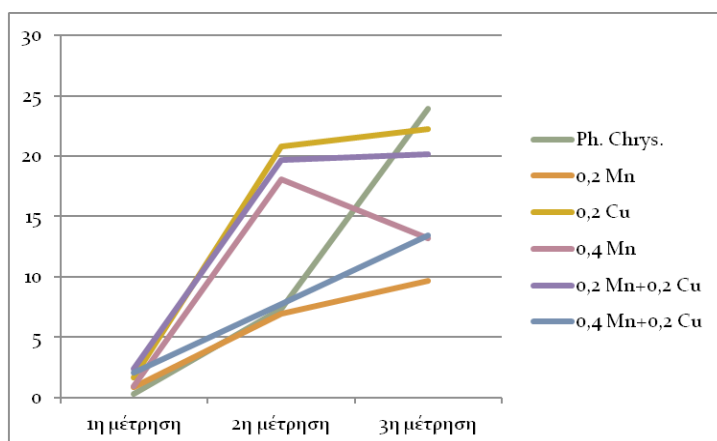
Όπως και στη περίπτωση της λακκάσης, έτσι και στη Μn- υπεροξειδάση παρατηρούμε υψηλότερη ενεργότητα στις αναδεδυόμενες φιάλες με τα 0,2 mM Mn, τα 0,4 mM Mn και τα 0,2 mM Cu να παίρνουν τη μέγιστη τιμή τους τη 14^η μέρα 100U, 90U και 80U αντίστοιχα. Στις μη αναδεδυόμενες φιάλες, βλέπουμε πιο σταδιακή αύξηση της ενεργότητας σε σχέση με τις αναδεδυόμενες καθώς οι μέγιστες τιμές μετρήθηκαν την 21^η μέρα, για τα 0,2 mM Cu, την επέμβαση χωρίς μέταλλα και τα 0,2 mM Mn και ήταν 40U, 36U, 27U αντίστοιχα.

Για το *Ph. chrysosporium*, στις αναδεδυόμενες φιάλες παρατηρούμε μικτή συμπεριφορά με τις μεγαλύτερες τιμές να σημειώνουμε την 21^η μέρα για *Ph. chrysosporium* χωρίς μέταλλα 90U και για 0,2 mM Mn 75U, ενώ στην 14^η μέρα για το 0,2 mM Cu 60U. (Διάγραμμα 3.2.17)

Στις μη αναδεδυόμενες παρατηρούμε χαμηλότερες μέγιστες τιμές που κυμαίνονται από 17-24U για τα 0,2 mM Cu, τα 0,2 mM Mn+0,2 mM Cu, και για τα *Ph. chrysosporium* χωρίς προσθήκη μετάλλων. (Διάγραμμα 3.2.18).



Διάγραμμα 3.2.3.5: Ενεργότητα Mn- υπεροξειδάσης από το *Ph. chrysosporium* στις αναδευόμενες φιάλες.



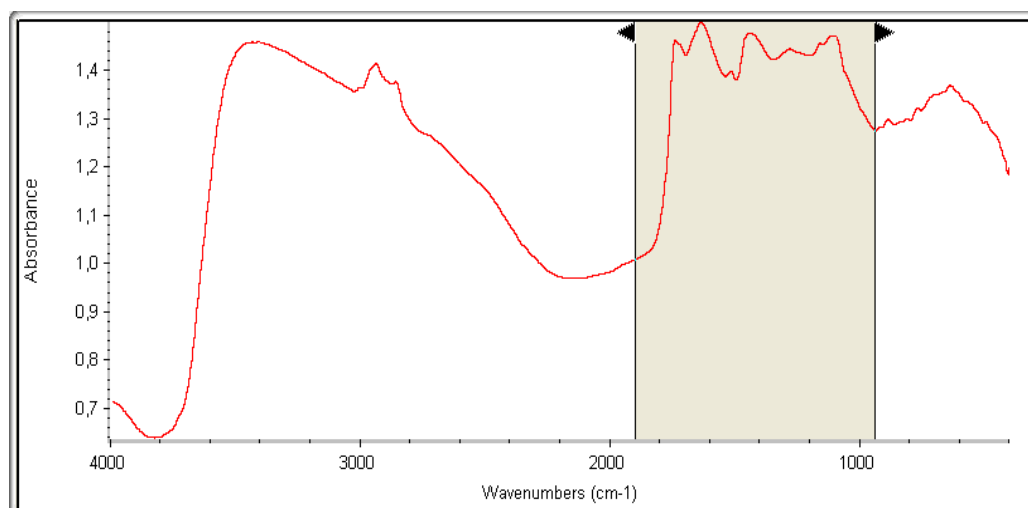
Διάγραμμα 3.2.3.6: Ενεργότητα Mn- Υπεροξειδάσης από το *Ph. chrysosporium* στις μη αναδευόμενες φιάλες.

Η λιγνίνη υπεροξειδάση, για το *A. biennis* έχει τη μέγιστη ενεργότητα της στη δεύτερη μέτρηση (14^η μέρα) με 140-260U για τις μη αναδευόμενες φιάλες. Ενώ, για το *Ph. chrysosporium* έχουμε μικτή εικόνα με τα περισσότερα μέγιστα να τα βρίσκουμε τη 14^η μέρα και σε παρόμοια επίπεδα με το *A. biennis*.

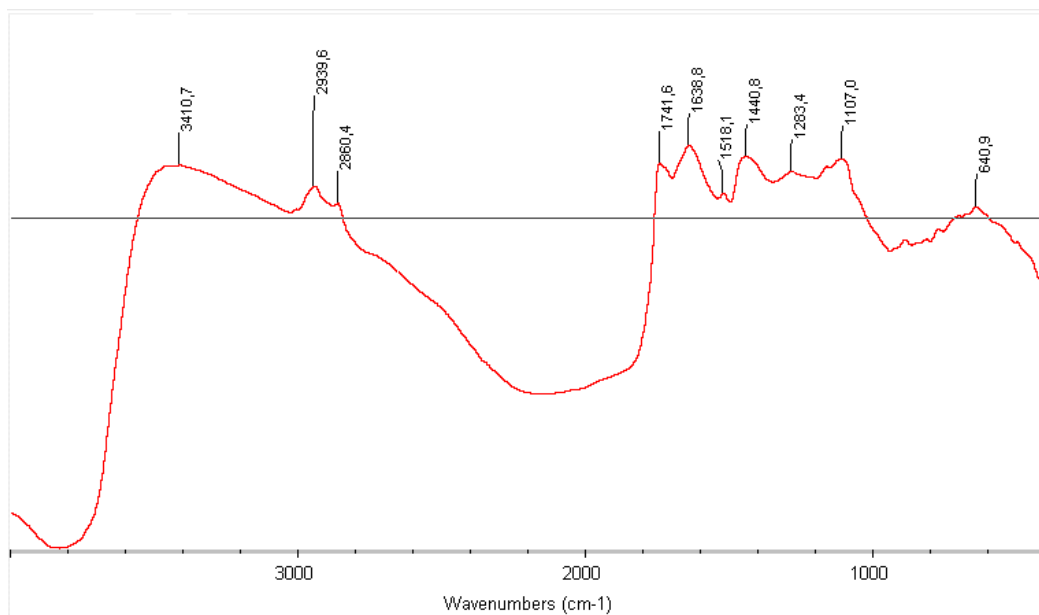
3.2.4. Φάσματα FT-IR

Χρησιμοποιούμε την φασματοσκοπία για να ταυτοποιήσουμε οργανικές ενώσεις. Στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος, αφού πήραμε αποτελέσματα βιοαποδόμησης φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, θέλουμε να διαπιστώσουμε αν μπορούμε να επιβεβαιώσουμε αυτά τα αποτελέσματα παραλαμβάνοντας και ερμηνεύοντας φάσματα FT-IR από τα δείγματα μας. Θα ασχοληθούμε μόνο με το στέλεχος *A. biennis* αφού αυτό ήταν το πιο αποδοτικό στη μείωση των φαινολικών ουσιών.

Στους Πίνακες 1.3.1.1. και 1.3.1.2. συνοψίζονται κορυφές σε ένα φάσμα FT-IR και αναφέρονται οι ομάδες ενώσεων στις οποίες αντιστοιχούν. Μπορούμε να βρούμε τις φαινολικές ενώσεις (αρωματικός χαρακτήρας) σε πολλές κορυφές οπότε ανάλογα με τις μεταβολές που θα διαπιστώνουμε σε αυτές τις συγκεκριμένες κορυφές, θα μπορούμε να διαπιστώνουμε και μείωση των φαινολικών ουσιών. Παρατίθενται παρακάτω με διαχωρισμό αναδεδυόμενες και μη αναδεδυόμενες φιάλες με καλλιέργειες του μύκητα *A. biennis* και τα αντίστοιχα φάσματα IR με τις κορυφές που μας ενδιαφέρουν και τις ερμηνείες τους.



Εικόνα 3.2.4.1: Φάσμα FT-IR υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. Η σκιαγραφημένη περιοχή είναι η περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος 1800-900 cm^{-1} .



Εικόνα 3.2.4.2: Το παραπάνω φάσμα FT-IR με όλες τις κορυφές του.

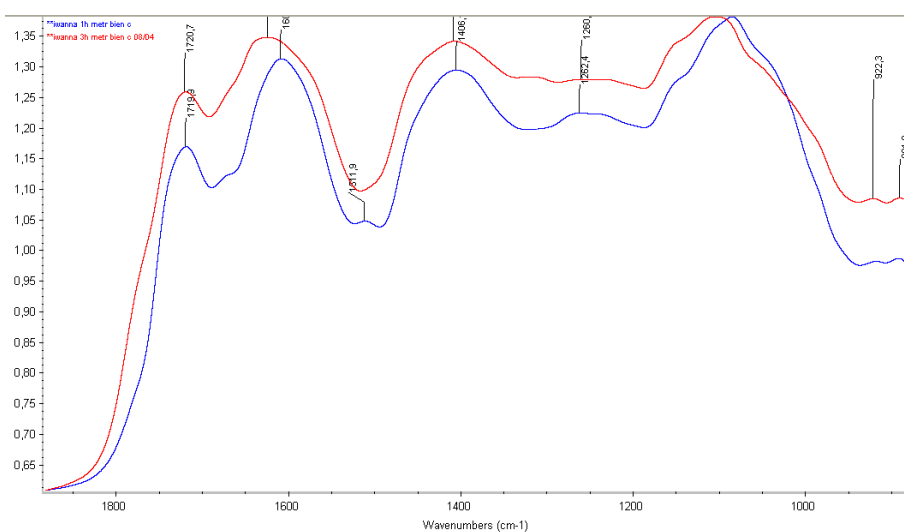
Με βάση σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα (παρατέθηκαν στην Εισαγωγή), οι κορυφές της Εικόνας 3.2.2 χαρακτηρίζονται ως εξής:

- 3410,7 cm^{-1} : υδροξυλομάδες και νερό (Smith, 1999)
- 2939,6 cm^{-1} : αλειφατική ομάδα μεθυλενίου (Smith, 1999)
- 2860,4 cm^{-1} : αλειφατική ομάδα μεθυλενίου (Smith, 1999)
- 1714,6 cm^{-1} : εστέρες, καρβοξυλικά οξέα και κετόνες
- 1620-1660 cm^{-1} : δονήσεις τάσης αρωματικού C=C
- 1638,8 cm^{-1} : αμίδιο I, απορροφημένο νερό
- 1505-1515, 1518,1, 1525 cm^{-1} : αρωματικός σκελετός, φαινολικά, λιγνίνη
- 1440,8 cm^{-1} : αλειφατικές ομάδες
- 1283,4 cm^{-1} : καρβοξύλια, αιθέρες, πιθανός αρωματικός χαρακτήρας
- 1107,0 cm^{-1} : πιθανός αρωματικός χαρακτήρας

- 1300-900 cm^{-1} : C-H, υδροξυλομάδες, C-O από αιθέρες σε αρωματικούς δακτυλίους

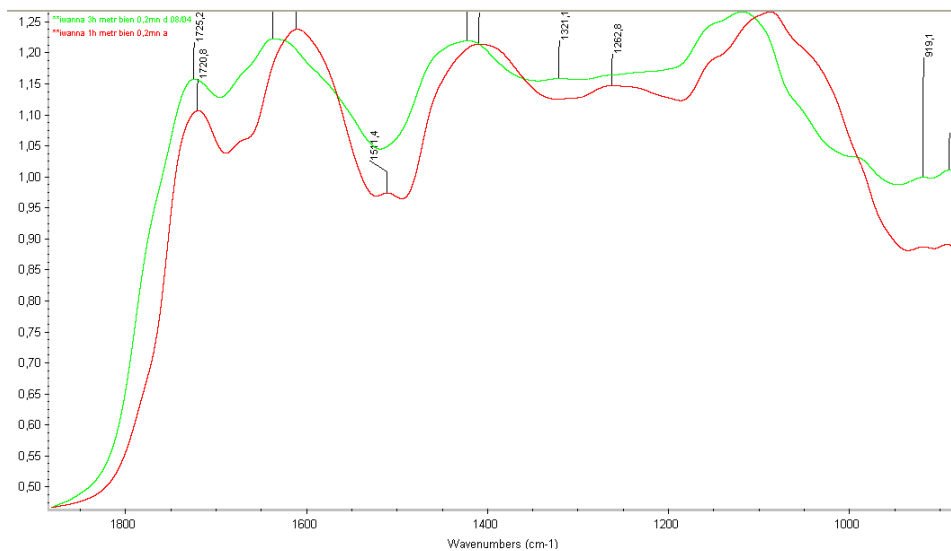
Συνεπώς, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις περιοχές: 1660-1620 cm^{-1} , 1525-1505 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1107 cm^{-1} , 1300-900 cm^{-1} .

Αναδεδυόμενες καλλιέργειες



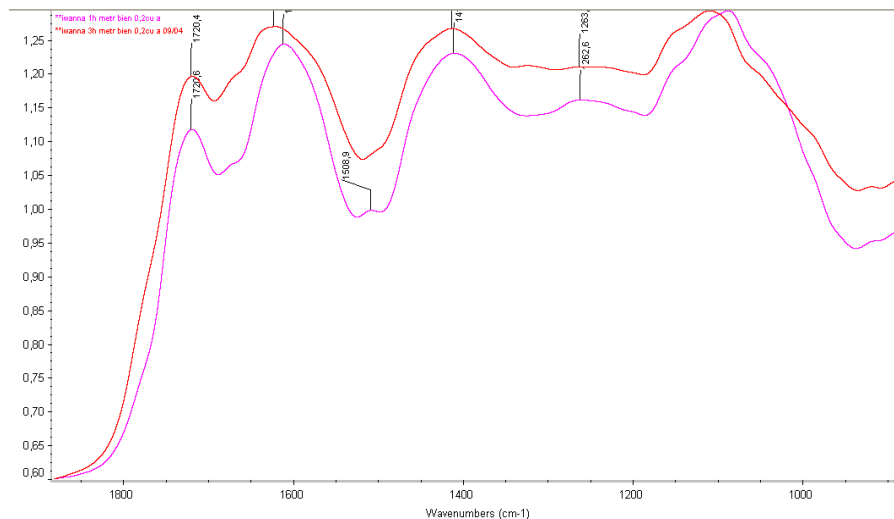
Εικόνα 3.2.4.3: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900 cm^{-1} . *A. biennis* στις επεμβάσεις T1 (μπλε) και T3 (κόκκινο).

Παρατηρούμε ότι στην T3 η κορυφή 1511,9 cm^{-1} που υπήρχε στη χρονική στιγμή T1 δεν εμφανίζεται στην T3, ενώ η 1262,4 cm^{-1} στην T1 έχει εξομαλυνθεί αρκετά στην T3.



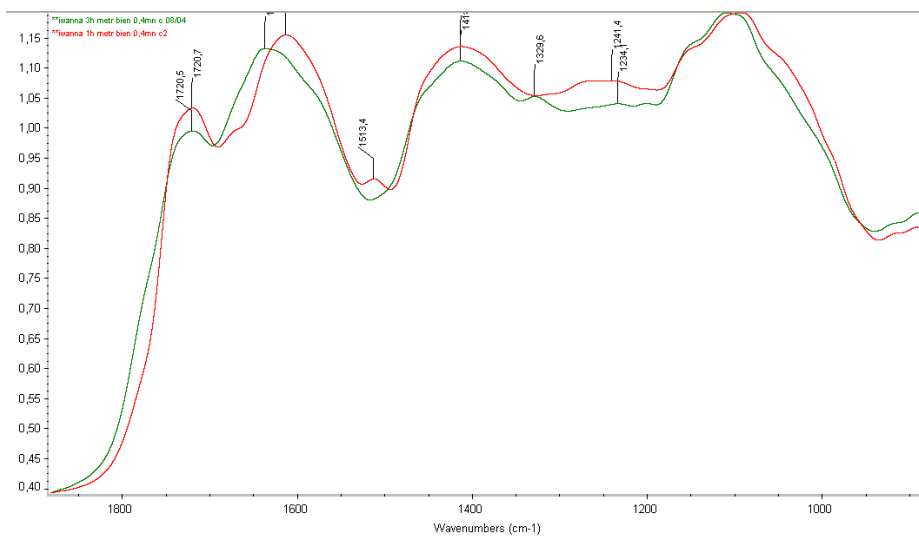
Εικόνα 3.2.4.4: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. A. biennis στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn [T1 (κόκκινο) - T3 (πράσινο)].

Η κορυφή 1511,4 cm⁻¹ που υπήρχε στη χρονική στιγμή T1 δεν εμφανίζεται στην T3, ενώ η 1262,8 cm⁻¹ που υπήρχε T1 επίσης δεν παρατηρείται στην T3.

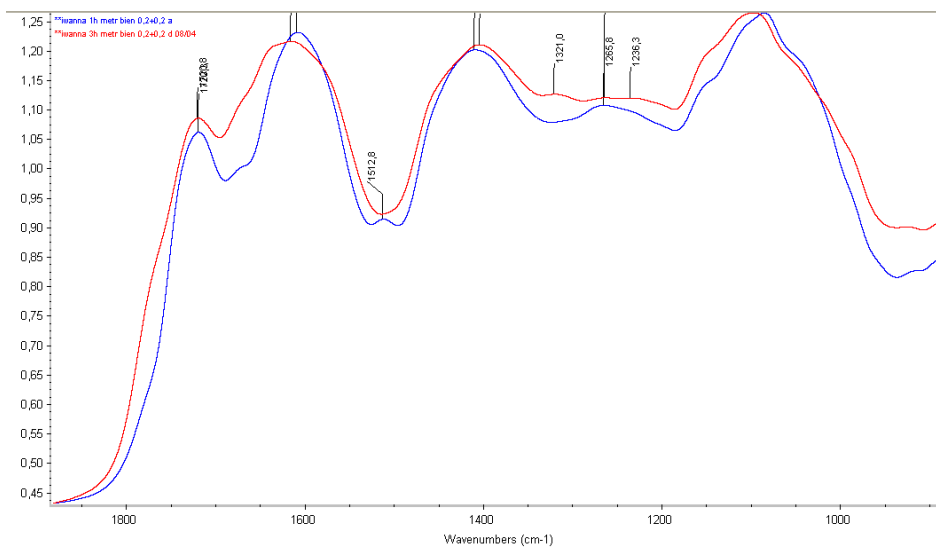


Εικόνα 3.2.4.5: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. A. biennis στις επεμβάσεις 0,2 mM Cu [T1 (φούξια) - T3 (κόκκινο)].

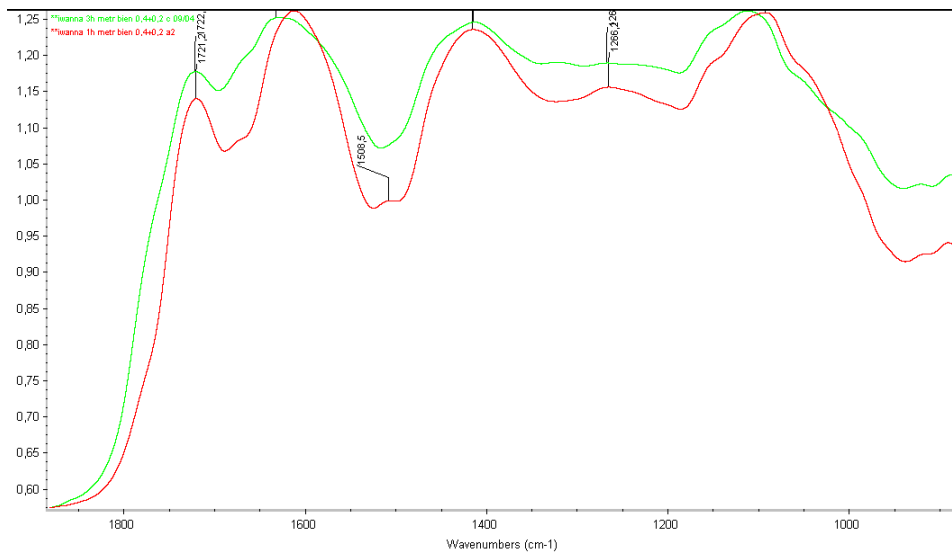
Παρατηρούμε ότι στην T3 η κορυφή 1508,9 cm⁻¹ που υπήρχε στη χρονική στιγμή T1 δεν εμφανίζεται στην T3, ενώ η 1262,6 cm⁻¹ στην T1 εξομαλύνθηκε στην T3.



Εικόνα 3.2.4.6: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn [T1 (κόκκινο) - T3 (πράσινο)].



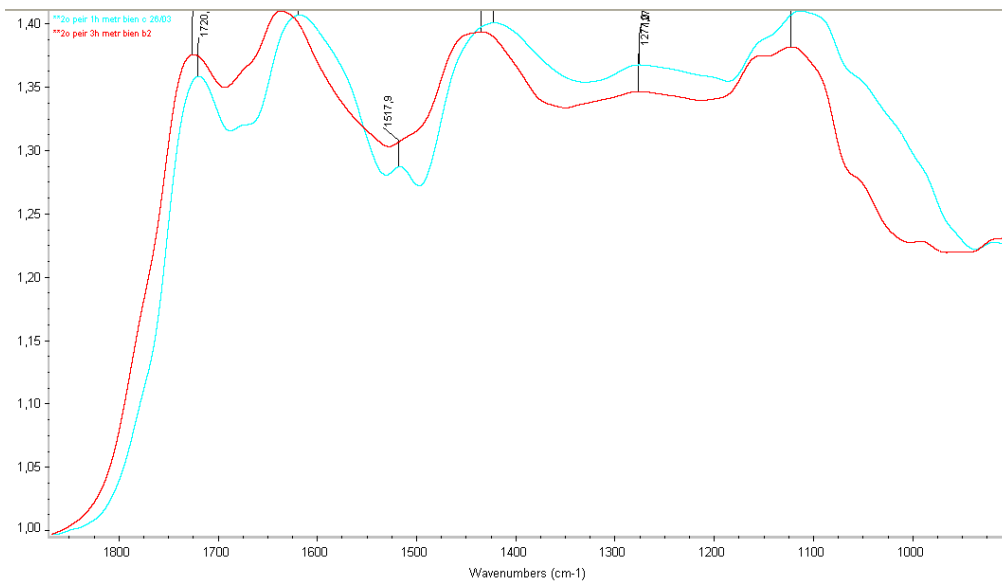
Εικόνα 3.2.4.7: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (μπλε) - T3 (κόκκινο)].



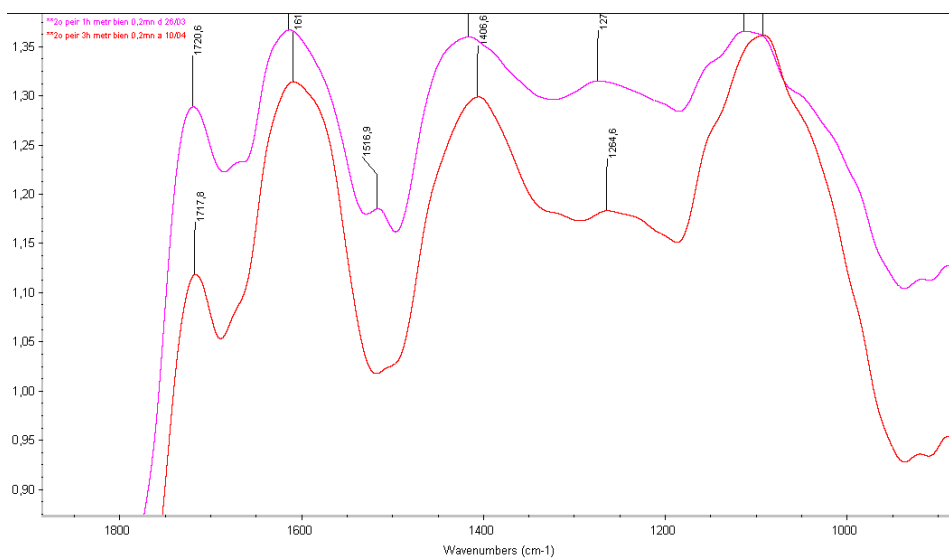
Εικόνα 3.2.4.8: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (κόκκινο) -T3 (πράσινο)].

Και στα τρία τελευταία φάσματα (Εικόνες 3.2.4.6 έως 3.2.4.8) παύει να εμφανίζεται στην T3 η βασική κορυφή που υπήρχε στην T1 (φανερώνει την ύπαρξη φαινολικών στα 1508-1515 cm⁻¹), ενώ και η κορυφή στα 1260-1266 cm⁻¹ εξομαλύνεται καθώς η καλλιέργεια φθάνει στη χρονική στιγμή T3.

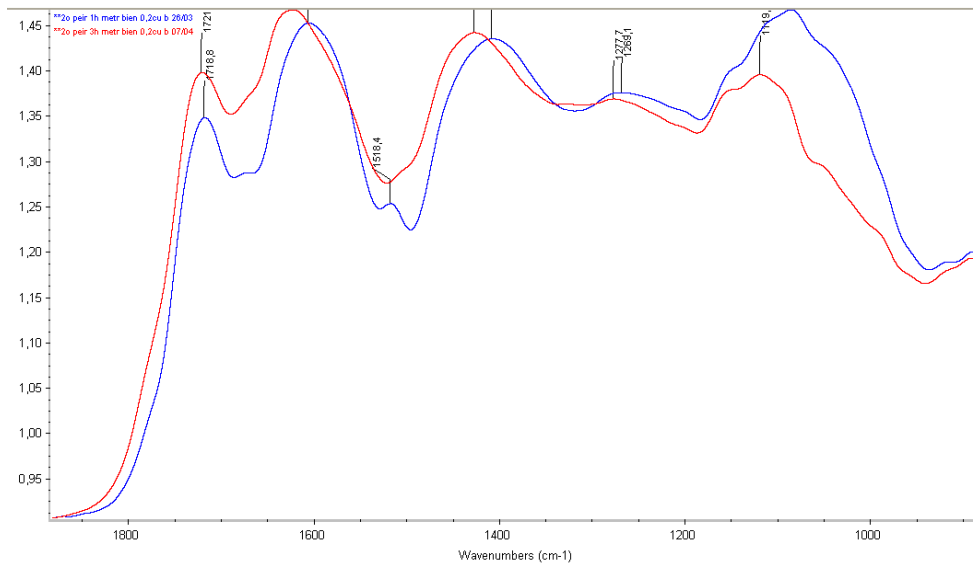
Μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες



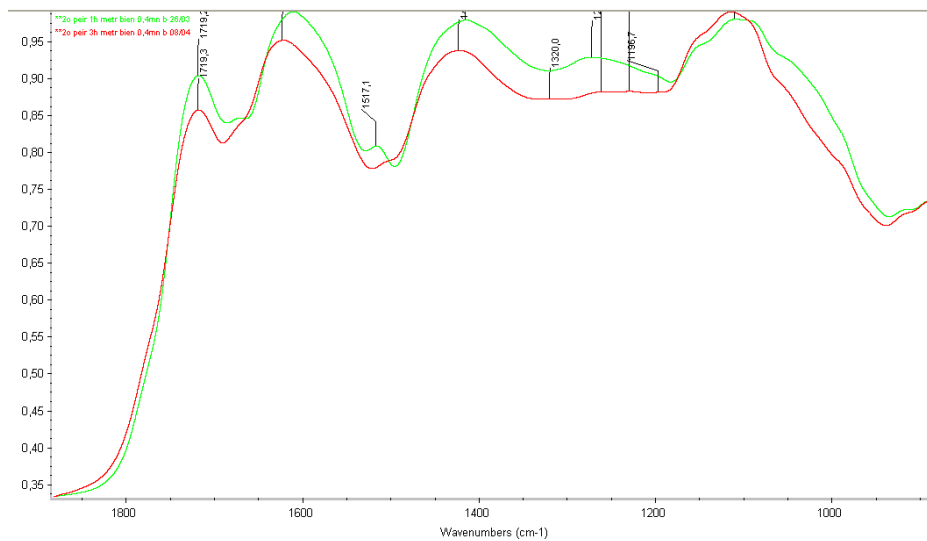
Εικόνα 3.2.4.9: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις χρονικές στιγμές T1 (γαλάζιο) και T3 (κόκκινο).



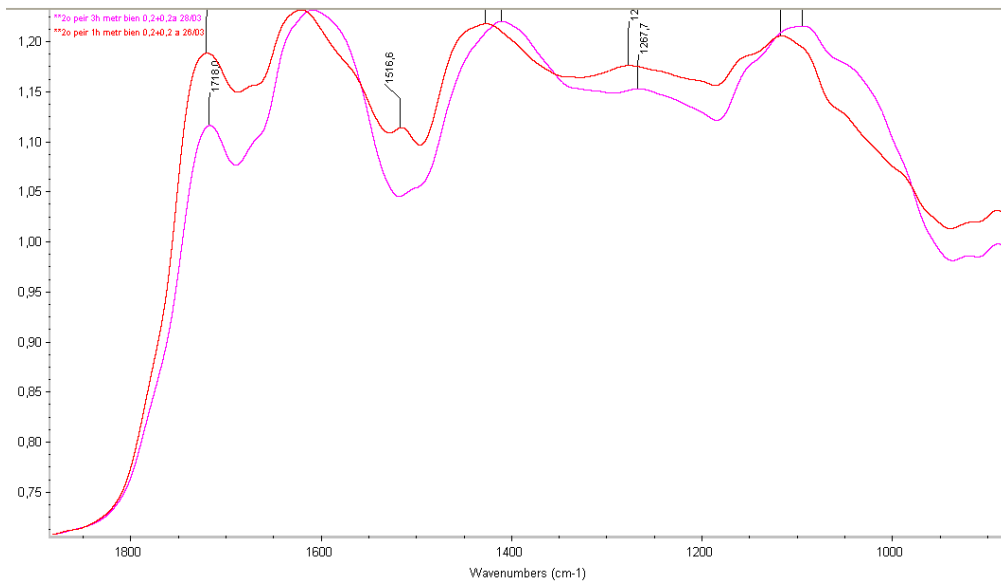
Εικόνα 3.2.4.10: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn [T1 (φούξια) - T3 (κόκκινο)].



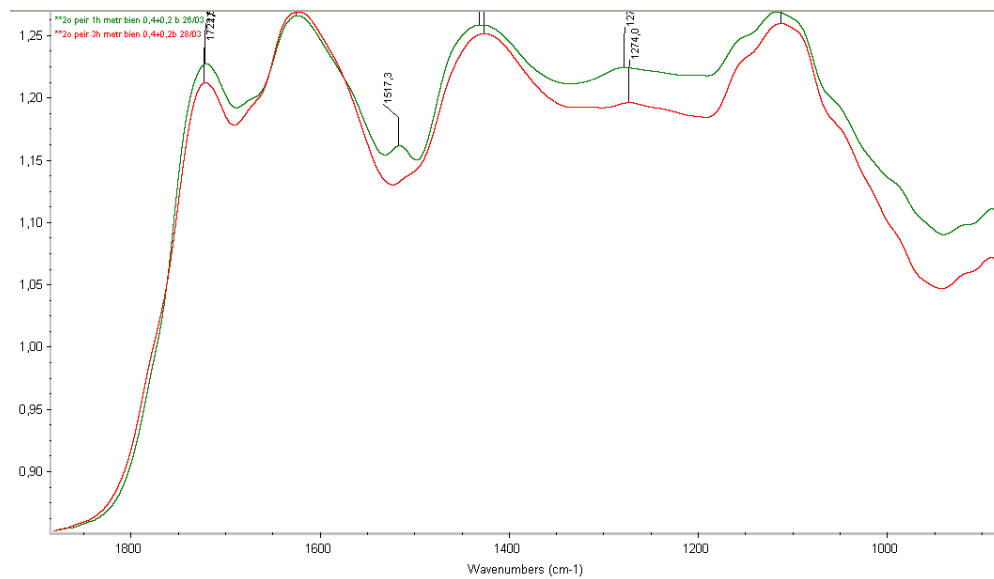
Εικόνα 3.2.4.11: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,2 mM Cu [T1(μπλε) - T3 (κόκκινο)].



Εικόνα 3.2.4.12: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn [T1 (πράσινο) - T3 (κόκκινο)].



Εικόνα 3.2.4.13: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,2 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (κόκκινο) -T3 (φούξια)].



Εικόνα 3.2.4.14: Περιοχή φάσματος FT-IR 1800-900cm⁻¹. *A. biennis* στις επεμβάσεις 0,4 mM Mn- 0,2 mM Cu [T1 (πράσινο) - T3 (κόκκινο)].

Στα παραπάνω φάσματα που αφορούν τις μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες παρατηρούμε ότι εξαφανίζεται η βασική μας κορυφή που υπήρχε στη χρονική στιγμή T1 (και φανερώνει την ύπαρξη φαινολικών στα 1516-1518 cm⁻¹), καθώς και η

κορυφή στα 1267-1277 cm^{-1} που υπήρχε στην T1 εξομαλύνεται στην T3 μετατοπιζόμενη ελαφρώς σε μικρότερα μήκη κύματος.

3.3. ΤΡΙΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: Επίδραση της προσθήκης αζώτου

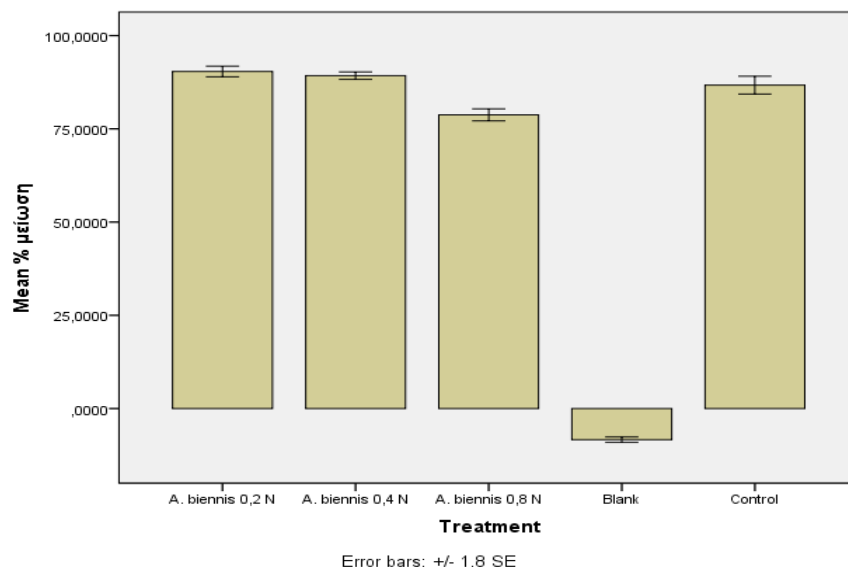
Στο δεύτερο πείραμα αναζητήσαμε απαντήσεις, με βάση μας τα δύο στελέχη *Abortiporus biennis* και *Phanerochaete chrysosporium*, ως προς τη διαδικασία ανάδευσης και ως προς τη προσθήκη μετάλλων. Τα διαγράμματα που αναλύσαμε παραπάνω μας δείχνουν ότι πιο αποδοτική μέθοδος και για τα δύο στελέχη είναι η ανάδευση, και ως προς τη βιομάζα, και ως προς τα φαινολικά και ως προς το χρώμα του ΥΑΕ. Επίσης ελέγξαμε αρκετά και τις περιπτώσεις της προσθήκης μικροποσοτήτων μετάλλων. Παρατηρήσαμε επίσης ότι σαφώς το *A. biennis* είναι πιο αποδοτικό στη βιοαποδόμηση των φαινολικών ουσιών και αυτός είναι άλλωστε ο λόγος που το επιλέξαμε για τις αναλύσεις με FT-IR.

Συνεπώς, για τρίτο πείραμα επιλέχθηκε το *A. biennis* σε αναδευόμενες καλλιέργειες για να διαπιστωθεί η επίδραση της προσθήκης αζώτου. Ως πηγή αζώτου επιλέξαμε το θειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε συγκεντρώσεις 0,2g/L, 0,4g/L και 0,8g/L.

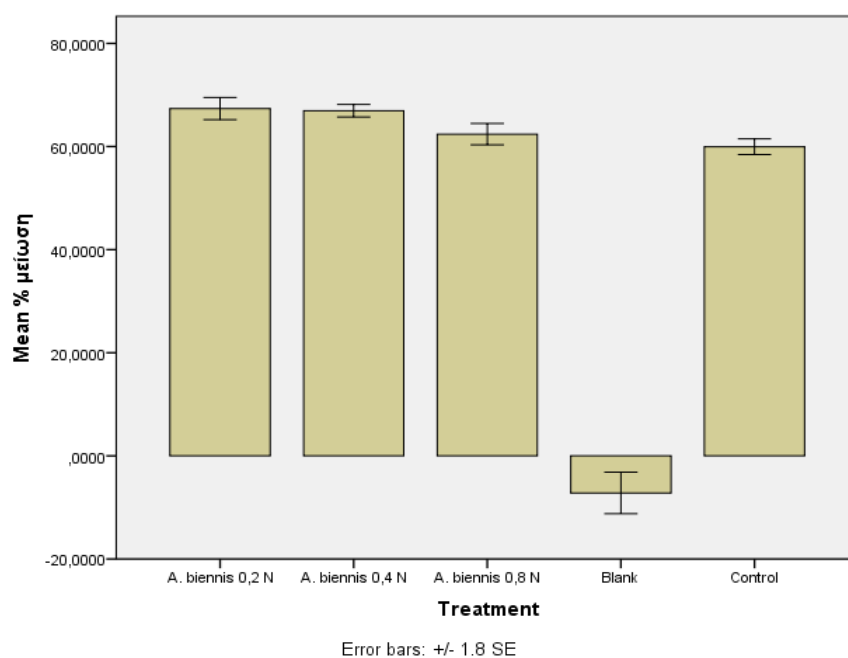
3.3.1. Μετρήσεις φαινολικών και αποχρωματισμού

Στο Διάγραμμα 3.3.1.1. παρατηρούμε μεγάλη % μείωση των φαινολικών ουσιών ακόμα και στις φιάλες χωρίς προσθήκη αζώτου. Συγκεκριμένα στο μάρτυρα (χωρίς άζωτο) παρατηρήσαμε μείωση 87%. Στις φιάλες με 0,2g/L άζωτο είδαμε πτώση των φαινολικών ουσιών κατά 90%, στο 0,4g/L άζωτο 89% και στο 0,8g/L άζωτο μικρότερη μείωση της τάξης του 78%.

Στο ίδιο μοτίβο μειώσεων κυμαίνεται και το χρώμα του ΥΑΕ με τον μάρτυρα να έχει αποχρωματιστεί κατά 60%. Στις φιάλες με 0,2g/L άζωτο είδαμε αποχρωματισμό κατά 67%, στο 0,4g/L άζωτο 66% και στο 0,8g/L άζωτο μικρότερη μείωση της τάξης του 62%. (Διάγραμμα 3.3.1.2)



Διάγραμμα 3.3.1.1: Επί τοις εκατό (%) μείωση των **φαινολικών ουσιών** σε σχέση με το αρχικό ανεπεξέργαστο ΥΑΕ σε καλλιέργειες *A. biennis* με διαφορετικές προσθήκες αζώτου.

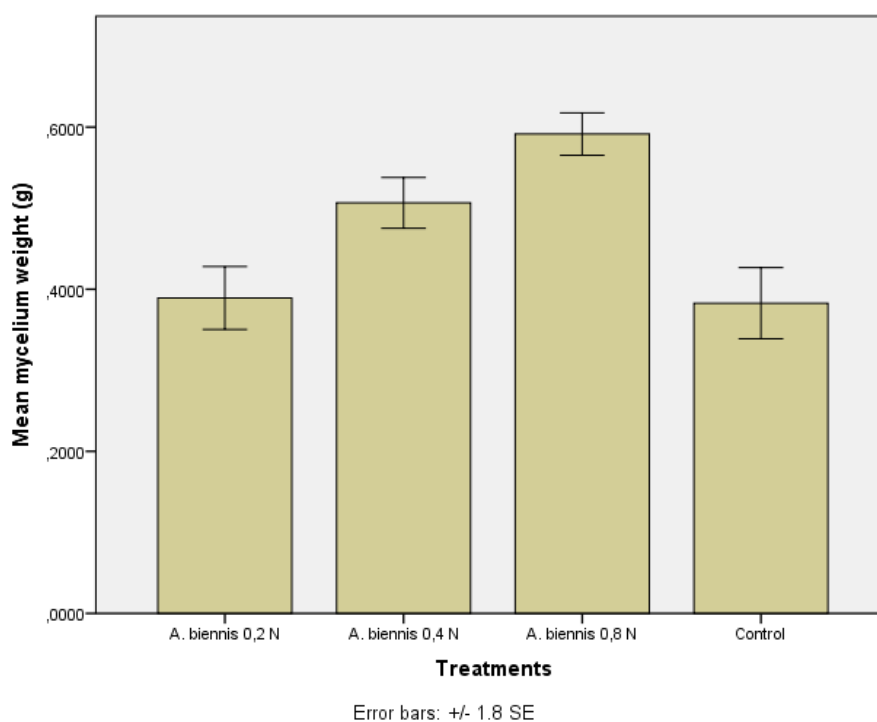


Διάγραμμα 3.3.1.2: Επί τοις εκατό (%) μείωση του **χρώματος** σε σχέση με το αρχικό ανεπεξέργαστο ΥΑΕ σε καλλιέργειες *A. biennis* με διαφορετικές προσθήκες αζώτου.

3.3.2. Παραγωγή βιομάζας

Πίνακας 3.3.2.1. Παραγωγή βιομάζας του μύκητα *A. biennis* σε g.

Επέμβαση	Ξηρό βάρος σε g MEAN \pm SE
Abortiporus biennis - Μάρτυρας	0,383 \pm 0,024 ^b
Abortiporus biennis - 0,2 g/l	0,389 \pm 0,021 ^b
Abortiporus biennis - 0,4 g/l	0,507 \pm 0,017 ^a
Abortiporus biennis - 0,8 g/l	0,591 \pm 0,015 ^a

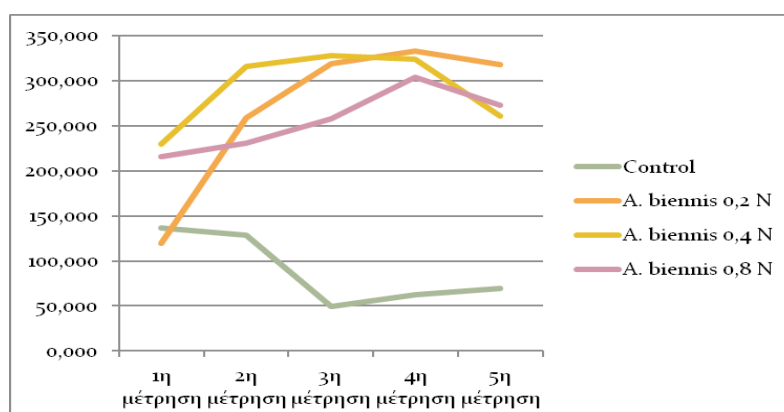


Διάγραμμα 3.3.2.1.: Βάρος του παραγόμενου μυκηλίου του μύκητα *A. biennis* σε g.

Στο θέμα του παραγόμενου μυκηλίου έχουμε να παρατηρήσουμε το εξής παράδοξο. Στις φιάλες που είχαμε μεγάλη πτώση φαινολικών ουσιών και έγινε πολύ καλός αποχρωματισμός, παρατηρήθηκε η μικρότερη παραγωγή μυκηλίου. Στις φιάλες με *A. biennis* 0,8g/L άζωτο που παρατηρήσαμε τη μικρότερη μείωση φαινολικών και τον λιγότερο αποχρωματισμό, σε αυτές, έχουμε και το μεγαλύτερο βάρος μυκηλίου. Αντίστοιχα ισχύει και για τις άλλες συγκεντρώσεις.

3.3.3. Ενεργότητα ενζύμων

Λακκάση

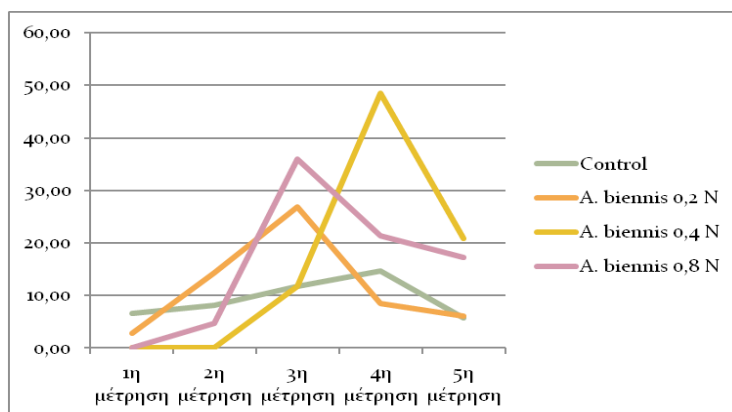


Διάγραμμα 3.3.3.1.: Ενεργότητα λακκάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης.

Φαίνεται ότι και οι τρεις συγκεντρώσεις αζώτου παρουσιάζουν πολύ καλή ενεργότητα λακκάσης, σε αντίθεση με τον μάρτυρα. Άρα μπορούμε να πούμε ότι το άζωτο προάγει την ενεργότητα της λακκάσης, με καλύτερη συγκέντρωση αζώτου να φαίνεται η 0,4 g/L.

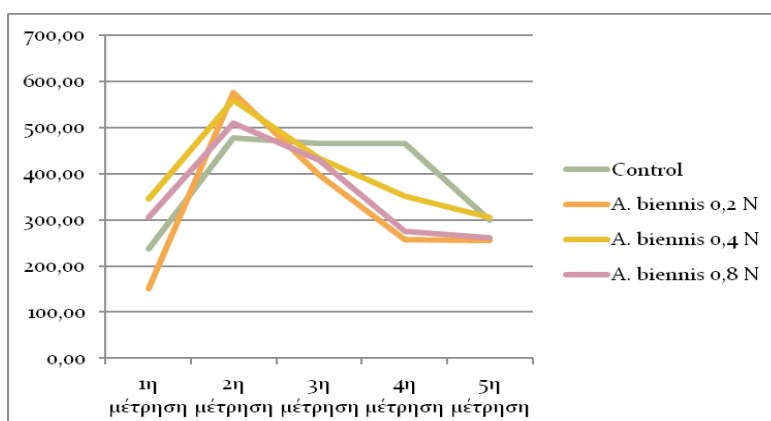
Mn- υπεροξειδάση

Κατ' αντιστοιχία με την ενεργότητα της λακκάσης, ο μάρτυρας πολύ λιγότερη ενεργότητα Mn- υπεροξειδάσης και το άζωτο 0,4g/L ΥΑΕ φαίνεται να έχει την καλύτερη ενεργότητα Mn- υπεροξειδάσης.



Διάγραμμα 3.3.3.2: Ενεργότητα Mn- Υπεροξειδάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης του μύκητα *A. biennis*.

Λιγνίνη Υπεροξειδάση



Διάγραμμα 3.3.3.3: Ενεργότητα λιγνίνης υπεροξειδάσης στη διάρκεια των 25 ημερών επώασης του μύκητα *A. biennis*.

Στη λιγνίνη υπεροξειδάση φαίνεται να έχουμε μια μέγιστη ενεργότητα για όλες τις επεμβάσεις στη 10^η μέρα με τις τιμές να κυμαίνονται από 480U-580U. Και αμέσως μετά και μέχρι το τέλος των 25 ημερών παρατηρείται σταδιακή μείωση της ενεργότητας μέχρι τα 300U.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων είναι ένα μείγμα από φυτικό νερό και μαλακών ιστών της ελιάς αλλά και νερού που χρησιμοποιήθηκε σε διάφορα στάδια της παραγωγής του ελαιολάδου. Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή εκτιμάται από 7 έως 30 εκατομύρια κυβικά μετρα. Παρ'όλο που η ποσότητα των αποβλήτων αυτών είναι πολύ μικρότερη από άλλων ειδών αποβλήτων, όπως οικιακών, και η παραγωγή είναι εποχιακή, η συνεισφορά τους στην περιβαλλοντική ρύπανση είναι σημαντική εξαιτίας κάποιων ιδιοτήτων που έχουν να κάνουν τόσο με τη σύσταση του αποβλήτου αλλά και από τη σύγχρονη κατάσταση στον τομέα της ελαιοπαραγωγής.

Σε όρους επίδρασης ρύπανσης, 1 m³ υγρού αποβλήτου είναι ισοδύναμο με 100-200 m³ οικιακών αποβλήτων. Το πιο εμφανές αποτέλεσμα είναι ο χρωματισμός, ένα αποτέλεσμα οξειδώσεων και πολυμερισμών ταννινών. Τα ΥΑΕ έχουν ακόμα ένα σημαντικό φορτίο σακχάρων, φωσφόρου και φαινολικών ουσιών που είναι τοξικές για κάποιους οργανισμούς.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να μειωθεί το ρυπαντικό οργανικό φορτίο των αποβλήτων είναι πολλές (Tsagaraki et al, 2007) και μία εξ αυτών είναι η αερόβια βιολογική διεργασία με τη χρήση μυκήτων. Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν το πλεονέκτημα να αποδομούν τη λιγνίνη οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αποδόμηση των φαινολικών ουσιών που βρίσκονται στα ΥΑΕ. (Van Aken and Agathos, 2001)

Για το πρώτο (προκαταρκτικό) πείραμα, θέλοντας να ελέγξουμε τη απόδοση δύο στελεχών μυκήτων στην αποδόμηση των φαινολικών ουσιών στ; ΥΑΕ, το οποία είχαν προεπεξεργαστεί ακολουθώντας διαφορετική διαδικασία (παστερίωση ή αποστείρωση). Οπότε, τα *Abortiporus biennis* και *Phanerochaete chrysosporium* επωάστηκαν με 50% ΥΑΕ σε στατικές συνθήκες και σε αποστειρωμένο ή παστεριωμένο υγρό απόβλητο για 30 μέρες. Στις αναλύσεις για τη μείωση των φαινολικών ουσιών παρατηρήσαμε για το *A. biennis* περίπου 4 g/L μείωση φαινολικών στο αποστειρωμένο υλικό και 4,5 g/L για το παστεριωμένο υλικό.

Σίγουρα είχαμε μεγαλύτερη μείωση φαινολικών στο παστεριωμένο αλλά και στις δυο επεμβάσεις είχαμε παρά ταύτα πολύ καλή μείωση.

Για το *Ph. chrysosporium* είχαμε στο παστεριωμένο 90% μεγαλύτερη πτώση φαινολικών σε σχέση με το αποστειρωμένο, παρόλα αυτά είχε πολύ μικρή μείωση και στις δύο επεμβάσεις, της τάξης του 1 -1,5 g/L.

Στο θέμα της παραγωγής βιομάζας στο τέλος των 30 ημερών του πειράματος το *A. biennis* παρήγε 20% παραπάνω στο αποστειρωμένο υλικό, ενώ το *Ph. chrysosporium* παρήγε 40% παραπάνω μυκήλιο στο παστεριωμένο, μικρές ποσότητες όμως.

Στο θέμα του αποχρωματισμού του αποβλήτου δεν παρατηρήσαμε κάτι τέτοιο, σε ασυμφωνία με τη βιβλιογραφία. Μάλιστα στο *Ph. chrysosporium* είχαμε μεγάλη αύξηση του χρώματος.

Για το *A. biennis*, η ενεργότητα της λακκάσης είναι καλή (220-240U) και στις δύο επεμβάσεις. Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης του Mn ουσιαστικά ανύπαρκτη στο αποστειρωμένο υλικό και με μια μικρή ενεργότητα στο παστεριωμένο. Όσο για τη λιγνίνη υπεροξειδάση ξεκίνησε να ενεργεί μετά τη 10^η μερά αλλά έφτασε σε πολύ καλές τιμές πιο πολύ για το αποστειρωμένο.

Για το *Ph. chrysosporium* πολύ μικρή ενεργότητα υπεροξειδάσης του Mn και όπως και στο αποστειρωμένο, αργοπορημένη ενεργοποίηση της λιγνίνης υπεροξειδάσης, αλλά κατά 25% παραπάνω από το *A. biennis*.

Μπορούμε να πούμε με βάση τα παραπάνω ότι η παστερίωση δεν προσφέρει κάτι παραπάνω στην επώαση σε σχέση με την αποστείρωση.

Επίσης βλέπουμε ότι το *A. biennis* είναι πιο αποδοτικό από το *Ph. chrysosporium* είτε το θρεπτικό υλικό είναι αποστειρωμένο είτε παστεριωμένο.

Στο δεύτερο πείραμα ασχοληθήκαμε με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων μετάλλων (συνενζύμων), δηλ. χαλκού και μαγγανίου. Και επίσης ελέγχουμε την επίδραση της ανάδευσης σε συνθήκες αποστειρωμένου αποβλήτου.

Στις αναλύσεις για τη μείωση των φαινολικών ουσιών και για το *A. biennis* παρατηρήσαμε μεγάλη απόδοση στις αναδευόμενες καλλιέργειες. Συγκεκριμένα 90% πρώτα για τα 0,2 mM Mn+ 0,2 mM Cu και μετά για τα 0,4 mM Mn+ 0,2 mM Cu και 0,4 mM Mn, 84% για τα 0,2 mM Cu, 70% για τα χωρίς προσθήκη μετάλλων και 65% για το 0,2 mM Mn. Δηλαδή στο 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu έχουμε ένα 30% παραπάνω μείωση φαινολικών σε σχέση με τα 0,2 mM Mn.

Σε αντίθεση, τη μεγαλύτερη μείωση φαινολικών για το *A. biennis* στις μη αναδευόμενες καλλιέργειες την παρατηρήσαμε στο 0,2 mM Mn, στο χωρίς και στα 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu (70% μείωση). Επίσης είχαμε 60% απόδοση στα 0,2 mM Mn και 0,2 mM Cu. Και τέλος 50% στα 0,4 mM Mn +0,2 mM Cu.

Για το *A. biennis* στις αναδευόμενες καλλιέργειες έχουμε ένα ποσοστό 30-80% παραπάνω απόδοση στη μείωση φαινολικών ουσιών απ' ότι στις μη αναδευόμενες φιάλες. Καλύτερη απόδοση στις αναδευόμενες καλλιέργειες έχει η συγκέντρωση μετάλλων 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu, ενώ στα μη αναδευόμενα την καλύτερη απόδοση έχει η 0,2 mM Mn. Παρατηρούμε ότι στις καλλιέργειες με χωρίς προσθήκη μετάλλων και στις 0,2 mM Mn έχουμε σχεδόν την ίδια απόδοση και στις δύο επεμβάσεις, αναδευόμενες και μη. Ενώ οι επεμβάσεις 0,4 mM Mn και 0,2 mM Cu βρήκαμε έως 50% παραπάνω απόδοση στις αναδευόμενες και για τα 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu 35% παραπάνω. Τη μεγαλύτερη διαφορά στην απόδοση, σε αναδευόμενες και μη, την έχουν οι καλλιέργειες με τα 0,4 mM Mn +0,2 mM Cu με 80% μεγαλύτερη απόδοση στις αναδευόμενες καλλιέργειες.

Για το *Ph. chrysosporium*, στις αναδευόμενες καλλιέργειες τη μεγαλύτερη απόδοση έχει το 0,2 mM Mn με 55% μείωση φαινολικών. Ακολουθούν τα χωρίς μέταλλα και τα 0,4 mM Mn με 36-40% μείωση. Τα 0,2 mM Cu 27% και οι συνδυασμοί μετάλλων μέχρι 23% μείωση φαινολικών. Στα μη αναδευόμενα, μεγαλύτερη απόδοση έχουν οι καλλιέργειες χωρίς προσθήκη μετάλλων με 20% μείωση φαινολικών και μετά το 0,2 mM Cu αποδίδει 13%. Οι υπόλοιπες επεμβάσεις κυμάνθηκαν στα 2-7% μείωση φαινολικών ουσιών. Δηλαδή έχουμε και έως 100% παραπάνω μείωση φαινολικών στις αναδευόμενες καλλιέργειες σε σχέση με τις μη. Τελικά είτε αναφερόμαστε σε αναδευόμενες είτε σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες, το *A. biennis* βιοαποδομεί σαφώς περισσότερα οργανικά συστατικά από το *Ph. chrysosporium*.

Τα ποσοστά αποχρωματισμού του αποβλήτου για το *A. biennis* σε αναδευόμενες καλλιέργειες είναι σε συμφωνία με τα ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων. Βέβαια, δεν έχουμε την ανομοιογένεια ποσοστών που παρατηρήσαμε στα φαινολικά και εδώ στον αποχρωματισμό τα ποσοστά είναι από 77 έως 86% μείωση του χρώματος του ΥΑΕ. Αναλογικά είναι και ο αποχρωματισμός του *A. biennis* στις Μη αναδευόμενες φιάλες και επιτεύχθηκε μείωση του χρώματος από 30-50%. Η

παραγωγή βιομάζας μυκηλίου για το *A. biennis* σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες είναι και αυτή σε πολύ καλή συμφωνία σε σχέση με την αποδόμηση φαινολικών ενώσεων. Όπως θα περιμέναμε, η βιομάζα του *A. biennis* στις μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες είναι η μισή σε σχέση με τις αναδεδυόμενες.

Η παραγωγή **βιομάζας** μυκηλίου για το *Ph. chrysosporium* σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες είναι σε πλήρη συμφωνία σε σχέση με τα ποσοστά αποδόμησης φαινολικών ενώσεων, αλλά μικρότερη σε σχέση με το *A. biennis* κάτι που περιμέναμε γιατί είχε λιγότερη δραστηριότητα. Έχουμε να παρατηρήσουμε όμως ότι στις μη αναδεδυόμενες, το *Ph. chrysosporium* έχει παραγωγή βιομάζας περίπου 20% μεγαλύτερη σε σχέση με το *A. biennis* στις μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες, και επίσης ότι οι διαφορές στη παραγωγή βιομάζας σε αναδεδυόμενες και μη, δεν έχουν μεγάλες διαφορές, παρά τις μεγάλες διαφορές στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων.

Σε ό,τι αφορά την ενεργότητα ενζύμων, έχουμε να παρατηρήσουμε την μακράν μεγαλύτερη ενεργότητα λακκάσης στο *A. biennis* σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Επίσης, παρατηρούμε και υψηλή ενεργότητα της υπεροξειδάσης του Mn, δύο φορές πάνω στις αναδεδυόμενες σε σχέση με τις μη αναδεδυόμενες. Μια ίδια εικόνα για την υπεροξειδάση του Mn βλέπουμε και για το *Ph. chrysosporium*.

Ένα επόμενο κομμάτι του 2^{ου} πειράματος ήταν η φασματοσκοπία. Χρησιμοποιούμε τη **φασματοσκοπία FT-IR** για να ταυτοποιήσουμε οργανικές ενώσεις (El Hajjouji et al., 2008, 2007, Hafidi et al., 2005)

Λαμβάνουμε φάσματα από τα λυοφιλωμένα δείγματα μας και μπορούμε αμέσως μετά, να συγκρίνουμε τα αρχικά δείγματα μας π.χ. T1 ή T0 με τα τελευταία μας, T3.

Όπως δείξαμε και στα αποτελέσματα μας παραπάνω, υπάρχουν κάποιες συγκεκριμένες κορυφές του φάσματος που μας υποδηλώνει ύπαρξη φαινολικών ενώσεων οπότε παρκολουθούμε όποια αλλαγή υπάρξει σε αυτές. Η πολύ κρίσιμη αλλαγή κορυφής είναι αυτή στα 1515 cm^{-1} . Και πράγματι στις τελευταίες μας μετρήσεις, στα φάσματα αυτών, δεν υπάρχει πια η κορυφή αυτή που δηλώνει ξεκάθαρα ύπαρξη φαινολικών ενώσεων. Επίσης στο κομμάτι του φάσματος $1300-900\text{ cm}^{-1}$ μπορούμε να βρούμε στοιχεία που να δείχνουν παρουσία οργανικής ουσίας οπότε αλλαγές και σε αυτή τη περιοχή είναι ενδεικτικές.

Σε σύγκριση των δειγμάτων T3 του πειράματος με τις αναδεδυόμενες και μη καλλιέργειες με τα αντίστοιχα T1, βλέπουμε εξομάλυνση στη περιοχή $1300-900\text{ cm}^{-1}$

και εξαφάνιση της κορυφής περίπου στο 1515 cm^{-1} . Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με τη μείωση των φαινολικών ενώσεων που παρατηρήσαμε σε αυτά τα δείγματα μας. Επίσης σύγκριση των αρχικών δειγμάτων T1 μεταξύ τους φανέρωσε ομοιομορφία στις κορυφές συτές, δηλαδή ύπαρξη φαινολικών ουσιών, όπως και ισχύει.

Οφείλουμε σε αυτό το σημείο να αναφέρουμε κάποιες παραμέτρους σχετικές με τα φάσματα FT-IR ώστε να γίνει κατανοητό ότι δεν ήμασταν σε θέση να αναλύσουμε τα αποτελέσματα που είχαμε με όλα τα χρήσιμα εργαλεία που υπάρχουν σχετικά. Πιο σαφή αποτελέσματα θα είχαμε αν μπορούσαμε να κάνουμε στατιστική ανάλυση αυτών μέσω ομοιότητας % φασμάτων, χρησιμοποίηση δεύτερης παραγώγου και PCA. Κάτι τέτοιο δε γινότανε στη περίπτωση μας αφού δεν είχαμε αρκετά δείγματα ώστε να μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή στατιστικά αποτελέσματα. Για πιο σίγουρα αποτελέσματα ενδείκνυται η σύγκριση των φασμάτων από τα δείγματα μας με φάσματα από πρότυπες ενώσεις, κάτι το οποίο δεν ήταν εφικτό. Και τελικά η χρησιμοποίηση αυτής της μεθόδου είναι αρκετά χρήσιμη όταν συνοδεύεται και από άλλες τεχνικές, όπως ^{13}C NMR και HPLC για ταυτοποίηση συγκεκριμένων συστατικών.

Σαν τρίτο πείραμα, και αφού προηγουμένως μελετήθηκε η προσθήκη μετάλλων, διερευνήθηκε η προσθήκη αζώτου με τη μορφή της ένωσης $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Έγινε προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ στα υγρά απόβλητα και η επάωση με *Abortiporus biennis* σε αναδεδόμενες καλλιέργειες. Η μείωση των φαινολικών ενώσεων ήταν εντυπωσιακή και της τάξης του 90%. Το ακόμα πιο εντυπωσιακό είναι ότι ακόμα και στις φιάλες χωρίς άζωτο είχαμε τέτοια μείωση φαινολικών. Τη μεγαλύτερη μείωση φαινολικών την έκαναν οι καλλιέργειες που περιείχαν συγκέντρωση $0,2\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και τη λίγο μικρότερη η $0,8\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Σε ό,τι αφορά τον αποχρωματισμό, βλέπουμε το ίδιο μοτίβο με τα φαινολικά, 70% μείωση του χρώματος, μεγαλύτερο για το $0,2\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, μικρότερο για το $0,8\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Μόνο οι καλλιέργειες χωρίς άζωτο είχαν μικρότερο αποχρωματισμό σε σχέση με τη πτώση των φαινολικών ενώσεων που προάγανε.

Σε σχέση με τη παραγωγή βιομάζας η καλύτερη ήταν της συγκέντρωσης $0,8\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε αντιδιαστολή με τα μικρότερα νούμερα σε μείωση φαινολικών και χρώματος. Όσον αφορά στα ένζυμα, η λακκάση έχει δείξει πολύ καλή ενεργότητα και στις τρεις συγκεντρώσεις αζώτου αλλά την καλύτερη ενεργότητα έδειξαν οι φιάλες με $0,2\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Βλέπουμε μια αρκετά μικρή δραστηριότητα Mn- υπεροξειδάσης για όλες τις φιάλες, συμπεριλαμβανομένου και του control. Η λιγνίνη υπεροξειδάση όμως δείχνει πολύ μεγάλη ενεργότητα, με μια λίγο διαφορετική εικόνα για το control, με μεγαλύτερη τιμή όλων των συγκεντρώσεων αζώτου στη 10^η μέρα. Η πολύ υψηλή ενεργότητα λακκάσης στη συγκέντρωση 0,2g/L (NH₄)₂SO₄ σε συνδυασμό με τη καλύτερη μείωση φαινολικών ενώσεων και χρώματος, 90% και 70% αντίστοιχα, μας δείχνει ότι το *A. biennis* σε συνδυασμό με 0,2g/L (NH₄)₂SO₄ μέσα στο ΥΑΕ, επιτυγχάνει πολύ σημαντικά αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Η αποστείρωση φαίνεται να είναι το καλύτερο μέσο προεπεξεργασίας των ΥΑΕ αφού η παστερίωση ουσιαστικά δεν προσδίδει κάποιο πλεονέκτημα, εκτός από την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας στο *Phanerochaete chrysosporium*.
- ✓ Τα δύο στελέχη *Abortiporus biennis* και *Phanerochaete chrysosporium* αποδομούν περισσότερα φαινολικά συστατικά όταν βρίσκονται με το απόβλητο σε συνθήκες ανάδευσης.
- ✓ Ο αποχρωματισμός του αποβλήτου συσχετίζεται με τη μείωση των φαινολικών ενώσεων.
- ✓ Η προσθήκη στην επώαση μικρών ποσοτήτων μετάλλων Mn, Cu, προάγουν τη αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, πόσο μάλλον όταν είναι και υπό καθεστώς ανάδευσης.
- ✓ Το *Phanerochaete chrysosporium* για να δράσει ικανοποιητικά στην αποδόμηση οργανικών συστατικών χρειάζεται ανάδευση, αλλά και προσθήκη ποσοτήτων μετάλλων.
- ✓ Για το *Abortiporus biennis* επίσης προτείνονται συνθήκες ανάδευσης αλλά και προσθήκη 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu ή 0,4 mM Mn στα ΥΑΕ, καθώς αυτές οι συνθήκες δώσανε πάνω από 90% μείωση φαινολικών ενώσεων.
- ✓ Για το *Abortiporus biennis* σε συνθήκες μη ανάδευσης προτείνεται προσθήκη 0,2 mM Mn +0,2 mM Cu ή 0,2 mM Mn, καθώς αυτές οι συνθήκες δώσανε 70% μείωση φαινολικών ενώσεων.
- ✓ Η υψηλή παραγωγή μυκηλίου φαίνεται να συνδέεται με την αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων στο *Abortiporus biennis* τόσο σε αναδευόμενες συνθήκες όσο και σε μη, ενώ με το *Phanerochaete chrysosporium* δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της μείωσης φαινολικών ουσιών με την παραγωγή βιομάζα.
- ✓ Το *Abortiporus biennis* αποδομεί τα ΥΑΕ κυρίως μέσω της παραγωγής λακκάσης, ενώ το *Phanerochaete chrysosporium* με την Mn- υπεροξειδάση.
- ✓ Η υπέρυθρη φασματοσκοπία FT-IR μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της αποδόμησης των οργανικών συστατικών των

αποβλήτων ελαιουργείων, αρκεί να έχουμε ένα σημαντικό αριθμό δειγμάτων ώστε να επιδέχεται στατιστική ανάλυση, να έχουμε πρότυπες ουσίες για σύγκριση, και να στοχεύουμε περισσότερο στην ποιοτική ταυτοποίηση. Για ποσοτικοποίηση, χρειάζεται συνδυασμός μεθόδων.

- ✓ Η προσθήκη πηγής αζώτου στη καλλιέργεια του *A. biennis*, δηλ. ποσότητας 0,2g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ υπό ανάδευση, επέφερε πάνω από 90% μείωση των φαινολικών ενώσεων και δε μπορούμε παρά να θεωρήσουμε αυτές τις συνθήκες πολύ αποδοτικές σε ό,τι αφορά την βιοαποδόμηση οργανικών συστατικών υγρών αποβλήτων ελαιουργείων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Ahmaruzzaman M., (2008). Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 143, 48–67.

Asses N., Ayed L., Bouallagui H., Sayadi S. & Hamdi M., (2009) Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 407–413.

Belaid C., Khadraoui M., Mseddi S., Kallel M., Elleuch B. & Fauvarque J. F., (2013). Electrochemical treatment of olive mill wastewater: Treatment extent and effluent phenolic compounds monitoring using some uncommon analytical tools. *Journal of Environmental Sciences*, 25 (1), 220–230.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A. & Del Rio J. A., (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. *Food Chemistry*, 68, 457–462.

Billes F. & Mohammed-Ziegler I., (2007). Vibrational spectroscopy of phenols and phenolic polymers. Theory, experiment and applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 369–441.

Boeriu C. G., Bravo D., Gosselink R. J. A. & van Dam J. E.G., (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 20, 205–218.

Caputo M. C., De Girolamo A. M. & Volpe A., (2013). Soil amendment with olive mill wastes: Impact on groundwater. *Journal of Environmental Management*, 131, 216–221.

Catalin Mot A., Silaghi-Dumitrescu R. & Sarbu C., (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 516–522.

- Coimbra M. A., Barros A. S., Coelho E., Goncalves F., Rocha S. M. & Delgadillo I., (2005). Quantification of polymeric mannose in wine extracts by FT-IR spectroscopy and OSC-PLS1 regression. *Carbohydrate Polymers*, 61, 434–440.
- Davies L. C., Vilhena A. M., Novais J. M. & Martins-Dias S., (2004). Olive mill wastewater characteristics: modelling and statistical analysis. *Grasas y Aceites*, 55, Fasc. 3, 233–241.
- Derenne A., Van Hemelryck V., Lamoral-Theys D., Kiss R. & Goormaghtigh E., (2013). FTIR spectroscopy: A new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832, 46–56.
- Diamantis V., Erguder T. H., Aivasidis A., Verstraete W. & Voudrias E., (2013). Wastewater disposal to landfill-sites: A synergistic solution for centralized management of olive mill wastewater and enhanced production of landfill gas. *Journal of Environmental Management*, 128, 427–434.
- Diamantis V., Pagorogon L., Gazani E., Doerr S. H., Pliakas F. & Ritsema C. J., (2013). Use of olive mill wastewater (OMW) to decrease hydrophobicity in sandy soil. *Ecological Engineering*, 58, 393–398.
- El Fels L., Zamama M., El Asli A. & Hafidi M., (2014). Assessment of biotransformation of organic matter during co-composting of sewage sludge-lignocelulosic waste by chemical, FTIR analyses, and phytotoxicity tests. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 128–137.
- El Hajjouji H., Bailly J.R., Winterton P., Merlina G., Revel J.C. & Hafidi M., (2008). Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment. *Bioresource Technology*, 99, 4958–4965.
- El Hajjouji H., Fakharedine N., Ait Baddi G., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C. & HaWdi M., (2007). Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet–visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, 98, 3513–3520.
- El-Abbassi A., Kiai H. & Hafidi A., (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132, 406–412.

El-Abbassi A., Kiai H., Raiti J. & Hafidi A., (2014). Cloud point extraction of phenolic compounds from pretreated olive mill wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 1480–1486.

Fakharedine N., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Revel J.C. & Hafidi M., (2006). Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive-mill waste-waters. *Process Biochemistry*, 41, 398–404.

Ferapontova E. E., Castillo J. & Gorton L., (2006). Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin-model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 1343–1354.

Flores M. I. A., Romero-Gonzalez R., Frenich A. G. & Vidal J. L. M., (2012). Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 134, 2465–2472.

Francioso O., Sanchez-Cortes S., Bonora S., Roldan M. L. & Certini G., (2011). Structural characterization of charcoal size-fractions from a burnt *Pinus pinea* forest by FT-IR, Raman and surface-enhanced Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 994, 155–162.

Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K. M., Gilani A.-H. & Saari N., (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea L.*): A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291–3340.

Giuffrè A. M., Sicari V., Piscopo A. & Louadj L., (2012). Antioxidant activity of olive oil mill wastewater obtained from different thermal treatments. *Grasas y Aceites*, 63 (2), Abril-Junio, 209–213.

Hafidi M., Amir S. & Revel J. C., (2005). Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and C NMR. *Process Biochemistry*, 40, 2615–2622.

Hajji F., Kunz B. & Weissbrodt J., (2014). Polymer incompatibility as a potential tool for polyphenol recovery from olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 156, 23–28.

- Hanafi F., Belaoufi A., Mountadar M. & Assobhei O., (2011). Augmentation of biodegradability of olive mill wastewater by electrochemical pre-treatment: Effect on phytotoxicity and operating cost. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 94–99.
- Justino C. I. L., Pereira R., Freitas A. C., Rocha-Santos T. A. P., Panteleitchouk T. S. L. & Duarte A. C., (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, 21, 615–629.
- Kamnev A. A., Tugarovaa A. V., Selivanovab M. A., Tarantilis P. A., Polissiouc M. G. & Kudryashev N. S., (2013). Effects of americium-241 and humic substances on *Photobacterium phosphoreum*: Bioluminescence and diffuse reflectance FTIR spectroscopic studies. *Spectrochimica Acta Part A*, 100, 171–175.
- Kamnev A.A., Antonyuk L.P., Tugarova A.V., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. & Gardiner P.H.E., (2002). Fourier transform infrared spectroscopic characterization of heavy metal-induced metabolic changes in the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of Molecular Structure*, 610, 127–131.
- Kapellakis I. E., Tsagarakis K. P. & Crowther J. C., (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7, 1-26.
- Kouvoutsakis G., Mitsi C., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. & Pappas C.S., (2014). Geographical differentiation of dried lentil seed (*Lens culinaris*) samples using Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (DRIFTS) and discriminant analysis. *Food Chemistry*, 145, 1011–1014.
- Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Vrvic M. M., Todorovic N., Jakovljevic D. & Van Griensven L. J. L. D., (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 144–153.
- Kumar N. S. & Min K., (2011). Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chemical Engineering Journal*, 168, 562–571.
- Lafka T.-I., Lazou A. E., Sinanoglou V. J. & Lazos E. S., (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 125, 92–98.

Lafka T.-I., Sinanoglou V. J. & Lazos E. S., (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206–1214.

Lee Ok-H., Lee Boo-Y., Lee J., Lee Hee-B., Son Jong-Y., Park Cheon-S., Shetty K. & Kim Young-C., (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100, 6107–6113

Lu X., Ross C. F., Powers J. R., Eric Aston D. & Rasco B. A., (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum*) and elephant garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance fourier transformed infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5215–5221.

Lu X., Wang J., Al-Qadiri H. M., Ross C. F., Powers J. R., Tang J. & Rasco B. A., (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129, 637–644.

Magdich S., Jarboui R., Ben Rouina B., Boukhris M. & Ammar E., (2012). A yearly spraying of olive mill wastewater on agricultural soil over six successive years: Impact of different application rates on olive production, phenolic compounds, phytotoxicity and microbial counts. *Science of the Total Environment*, 430, 209–216.

Martinez D, et al., (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnol* 22:695–700.

Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautová V. & Zervakis G. I., (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere*, 88, 620–626.

Ouzounidou G., Zervakis G. I. & Gaitis F., (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 4 (Special Issue 1), 21–38.

Pappas C.S., Takidelli C., Tsantili E., Tarantilis P.A. & Polissiou M.G., (2011). Quantitative determination of anthocyanins in three sweet cherry varieties using

diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. Athens, Greece, Journal of Food Composition and Analysis, 24, 17–21.

Pappas C.S., Tarantilis P.A., Moschopoulou E., Moatsou G., Kandarakis I. & Polissiou M.G., (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. Food Chemistry, 106, 1271–1277.

Paraskeva P. & Diamadopoulos E., (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A Review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81, 1475–1485.

Parikh S. J., Goyne K. W., Margenot A. J., Mukome F. N. D. & Calderón F. J., (2014). Soil chemical insights provided through vibrational spectroscopy. Advances in Agronomy, 126, Ch. 1, 1-148.

Ryan D. & Robards K., (1998). Phenolic compounds in olives. Wagga Wagga, Australia, Analyst, 123, 31–44

Santos S. A. O., Villaverde J. J., Sousa A. F., Coelho J. F. J., Neto C. P. & Silvestre A. J. D., (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. Industrial Crops and Products, 47, 262– 269.

Silva S. D., Feliciano R. P., Boas L. V. & Bronze M. R., (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. Food Chemistry, 150, 489–493.

Skotti E., Anastasaki E., Kanellou G., Polissiou M. & Tarantilis P. A., (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Athens, Greece, Industrial Crops and Products, 53, 46– 54.

Skotti E., Kountouri S, Bouchagier P, Tsitsigiannis D. I., Polissiou M. & Tarantilis P. A., (2014). FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical composition of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* induced by extracts of some Greek medicinal and aromatic plants. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 127, 463–472.

Smidt E. & Meissl K., (2007).The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. Waste Management, 27, 268–276.

- Smidt E. & Parravicini V., (2009). Effect of sewage sludge treatment and additional aerobic post-stabilization revealed by infrared spectroscopy and multivariate data analysis. Vienna, Austria, *Bioresource Technology*, 100, 1775–1780.
- Smidt E., Meissl K., Schwanninger M. & Lechner P., (2008). Classification of waste materials using Fourier transform infrared spectroscopy and soft independent modeling of class analogy. *Waste Management*, 28, 1699–1710.
- Snyder A. B., Sweeney C. F., Rodriguez-Saona L. E. & Giusti M. M., (2014). Rapid authentication of concord juice concentration in a grape juice blend using Fourier-Transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 147, 295–301.
- Soto M. L., Moure A., Domínguez H. & Parajó J. C., (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105, 1–27.
- Spandre R. & Dellomonaco G., (1996). Polyphenols pollution by olive mill waste waters. [Journal of Environmental Hydrology](#), 4, 1-13.
- Tarantilis P. A., Beljebbar A., Manfait M. & Polissiou M., (1998). FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus L.*) and some derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, 54, 651–657.
- Tarantilis P.A., Troianou V.E., Pappas C.S., Kotseridis Y.S. & Polissiou M.G., (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Athens, Greece, *Food Chemistry*, 111, 192–196.
- Tsagaraki E., Lazarides H. N. & Petrotos K. B., (2007). Olive Mill Wastewater Treatment. Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, Ch. 8, 133-157. Thessaloniki, Greece.
- Van Aken B. & Agathos S. N., (2001). Biodegradation of nitro-substituted explosives by white-rot fungi: A Mechanistic Approach. *Advances in Applied Microbiology*, 48.
- Zahir E., Saeed R., Hameed M. A. & Yousuf A., (2014). Study of physicochemical properties of edible oil and evaluation of frying oil quality by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*.

Zervakis G. I., Bekiaris G., Tarantilis P. A. & Pappas C. S., (2012). Rapid strain classification and taxa delimitation within the edible mushroom genus *Pleurotus* through the use of diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. *Fungal Biology*, 116, 715–728.

Zoumpoulou G., Papadimitriou K., Polissiou M. G., Tarantilis P. A. & Tsakalidou E., (2010). Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 202–207.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

LIFE ENV/GR/000671, (2001 – 2004). Πρόγραμμα MINOS: Ανάπτυξη διαδικασίας για την ολοκληρωμένη διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείων με ανάκτηση φυσικών αντιοξειδωτικών και παραγωγή οργανικού λιπάσματος.

Skoog D., Holler F. & Nieman T., (2002). Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης.

Βουρεξάκη Α., (2012). Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιουργείων στο Νομό Ηρακλείου. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Μηχανολογίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης.

Γιαλιτάκη Μ. Α., (2013). Ικανότητα προσρόφησης φαινολών από εδάφη διαφορετικής σύστασης. Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Γιαννακοπούλου Ε., (2010). Επίδραση του γονοτύπου, του περιβάλλοντος και του χρόνου συλλογής των δειγμάτων στη συγκέντρωση των φαινολικών στα φύλλα και τους καρπούς δύο ελληνικών ποικιλιών ελιάς. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γιωργουδέλλη Σ. Χ., (2011). Μελέτη ποιοτικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση μούρων (*Morus alba L.*). Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δαούσης Σ. Φ., (2013). Ενόργανη ανάλυση και βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων των φυτών δίκταμο (*Origanum dictamnus*), δεντρολίβανο (*Posmarinus officinalis*) και

θρούμπι (*Satureja hortensis*). Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ζερβάκης Γ., (1998). Ο ρόλος των μανιταριών σε συστήματα αειφορικής γεωργίας. Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας, Βιολογική Γεωργία. Πραγματικότητα-προοπτικές, Καλαμάτα, 48-60.

Ζερβάκης Γ., (2011). Εισαγωγή στη Μυκητολογία, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις στα πλαίσια του μαθήματος Γενική Μικροβιολογία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Θεριός Ι., (2005). Ελαιοκομία. Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη.

Κανέλλου Γ., (2011). Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κατσιμπίρη Φ. Κ., (2010). Εγκλεισμός συστατικών αιθερίου ελαίου λεβάντας σε β-κυκλοδεξτρίνη. Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κοστρίβα Α. Κ., (2007). Μελέτη της αποδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείων με τη χρήση αυτοχθόνων μυκήτων εδάφους. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Κουτσογιάννη Α., (2010). Γεωγραφική διαφοροποίηση βοτάνων με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας, της φασματοσκοπίας υπερύθρου και της χημειομετρίας. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κυριακόπουλος Χ., (2005). Η αποδόμηση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείων μετά από εφαρμογή τους στο έδαφος. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας φυτών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Λουτατίδου Σ., (2012). Επίδραση των αντιδράσεων Fenton στην ενεργότητα της αναερόβιας χώνευσης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών.

Μακαβέλου Μ. Π., (2010). Αξιολόγηση ποιοτικών χαρακτηριστικών σε καρπούς Μουριάς (*Morus alba L.*). Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μπεκιάρης Γ. Κ., (2011). Χαρακτηρισμός στελεχών βασιδιομυκήτων με χρήση φασματοσκοπίας FT-IR. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονική Βιοτεχνολογία, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Νασιούλα Χ., (2010). Αξιολόγηση τριφασικής και διφασικής μεθόδου ελαιοποίησης του ελαιοκάρπου. Μεταπτυχιακή εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών.

Οιχαλιώτης Κ. & Ζερβάκης Γ., (1999). Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων, Μια αξιολόγηση της υφισταμένης κατάστασης. *Ελιά & Ελαιόλαδο*, 14, 52-59.

Παζιώτου Γ., (2011). Μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών του *Echinacea purpurea* καλλιεργούμενου στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παπαϊωάννου Α. Λ., (2011). Σύγκριση των συστατικών του αρώματος Μαυρου και Άσπρου πιπεριού (*Piper nigrum L.*). Αξιολόγηση προϊόντων της ελληνικής αγοράς. Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παπανικολάου Γ. Κ., (2010). Μελέτη της διαδικασίας λιγνινοποίησης στους διαφόρους ιστούς νεαρών φυτών αραβοσίτου κατά την ανάπτυξή τους σε στάσιμο νερό. Μεταπτυχιακή εργασία. Τμήμα Γεωπονική Βιοτεχνολογία, Τομέας Βιολογικών Φυτών, Εργαστήριο Φυσιολογίας & Μορφολογίας Φυτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πατσού Μ., (2013). Έλεγχος της πρεβιοτικής δράσης εδώδιμων μανιταριών που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας. Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σάλτας Δ. Κ., (2012). Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού οξέος σε βότανα με την εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας, της Φασματοσκοπίας υπερύθρου και της Χημειομετρίας. Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σιάτης Ν. Γ., (2013). Ανάπτυξη νέων μεθόδων παραλαβής και ανάλυσης δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά και ενεργειακά φυτά. Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

