

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Π.Μ.Σ. Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικού Ενδιαφέροντος

Μεταπτυχιακή Μελέτη:

“Μείωση ρυπαντικών παραμέτρων υγρών αποβλήτων
ελαιουργείων μέσω της αξιοποίησης του ενζυμικού δυναμικού
του βασιδιομύκητα *Abortiporus biennis*”

Μενελίνα Κ. Κουγιουμτζοπούλου

Αθήνα

2018

Επιβλέπον: Ζερβάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Π.Μ.Σ. Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικού Ενδιαφέροντος

Μεταπτυχιακή Μελέτη:

“Μείωση ρυπαντικών παραμέτρων υγρών αποβλήτων
ελαιουργείων μέσω της αξιοποίησης του ενζυμικού δυναμικού
του βασιδιομύκητα *Abortiporus biennis*”

Μενελίνα Κ. Κουγιουμτζοπούλου

Αθήνα

2018

Επιβλέπον: Ζερβάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μεταπτυχιακή Μελέτη:

“Μείωση ρυπαντικών παραμέτρων υγρών αποβλήτων
ελαιουργείων μέσω της αξιοποίησης του ενζυμικού δυναμικού
του βασιδιομύκητα *Abortiporus biennis*”

Μενελίνα Κ. Κουγιουμτζοπούλου

Επιβλέπον:

Ζερβάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη:

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής, Μέλος

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος

Περίληψη

Τα απόβλητα που παράγονται κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου αποτελούν μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα για τις περιοχές γύρω από την Μεσόγειο όπου βρίσκεται το κέντρο καλλιέργειας του είδους *Olea europaea*. Οι λόγοι που καθιστούν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) δύσκολα στη διαχείρισή τους, είναι η τοξικότητά, ο μεγάλος όγκος και οι πολλές και διάσπαρτες ελαιουργικές μονάδες. Στη χώρα μας, μέχρι σήμερα, συνήθως τα Υ.Α.Ε. εναποθέτονται σε υδάτινους ή χερσαίους αποδέκτες ή λιγότερο συχνά σε δεξαμενές ώστε να εξατμιστούν μέσω της ηλιακής ακτινοβολίας. Οι τρόποι αυτοί δεν θεωρούνται αποτελεσματικοί και κατ' επέκταση φιλικό στο περιβάλλον. Η έρευνα γύρω από τη διαχείριση του συγκεκριμένου είδους αποβλήτου είναι εκτενής και αναφέρεται τόσο σε φυσικοχημικές όσο και σε βιολογικές προσεγγίσεις. Στις τελευταίες ανήκει και η χρήση μυκήτων λευκής σήψης οι οποίοι χρησιμοποιούνται και για την διαχείριση-αποτοξικοποίηση άλλων αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων. Η δράση τους οφείλεται σε λιγνολυτικά ένζυμα που παράγουν εξωκυτταρικά, τα οποία είναι ικανά να αποδομήσουν το σύνθετο μόριο της λιγνίνης αλλά και μεγάλο εύρος ξενοβιοτικών ενώσεων ανάλογης σύστασης. Το αρχικό σκέλος του πειράματος, αφορούσε στην μείωση του ρυπαντικού φορτίου των Υ.Α.Ε. με τη χρήση επιλεγμένου στελέχους βασιδιομύκητα του είδους *Abortiporus biennis* και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας μέσω της προσθήκης διαφόρων συγκεντρώσεων αζώτου και μετάλλων-συνενζύμων στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Η διάρκεια της επώασης ήταν 35 ημέρες σε 27°C υπό συνθήκες συνεχούς ανάδευσης. Από αυτή τη διαδικασία η μείωση των φαινολικών έφτασε το 91,5% και ο αποχρωματισμός ξεπέρασε το 50% σε σχέση με τον μάρτυρα. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μύκητα μετρήθηκε επίσης η ενεργότητα των ενζύμων, λακκάση, υπεροξειδάση εξαρτημένη του Mn και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn ενώ επίσης εξετάστηκε και η παραγωγή των ενζύμων υπεροξειδάση της λιγνίνης και οξειδάση της βερατρύλ-αλκοόλης (χωρίς όμως να ανιχνευτεί η παρουσία τους). Η παραγωγή τους φάνηκε να επηρεάζεται από την προσθήκη αζώτου και μετάλλων. Την τελευταία μέρα (35^η) των μετρήσεων οι ενεργότητες των ενζύμων ήταν κατά κύριο λόγο χαμηλές. Την ίδια μέρα, η μείωση των φαινολικών συνέχιζε να βαίνει αυξανόμενη ενώ ο αποχρωματισμός είχε σταματήσει. Με το πέρας των 35 ημερών, μετρήθηκαν η βιομάζα του μύκητα, το pH,

η αγωγιμότητα και η μείωση της φυτοτοξικότητας των Υ.Α.Ε. μέσω της μέτρησης του δείκτη βλαστικότητας σπόρων φυτών μαρουλιού. Ειδικότερα η βιομάζα ήταν μεγαλύτερη στην επέμβαση όπου είχαν προστεθεί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο αζώτου (3,2 g/L) όσο και μετάλλων (16 mg/L). Παρά τη σημαντική μείωση των ολικών φαινολικών και την υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας, η φυτοτοξικότητα του αποβλήτου δεν μειώθηκε σημαντικά. Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος παραλαμβάνονταν κάθε εβδομάδα (δηλαδή μετά την έλευση 7, 14, 21, 28 και 35 ημερών) υγρό από το μέσω καλλιέργειας του μύκητα το οποίο προστέθηκε σε διαλύματα μη αποστειρωμένου Υ.Α.Ε. (25% v/v). Ακολούθησε επώασή τους υπό συνεχή ανακίνηση στους 37°C και λαμβάνονταν μετρήσεις κάθε 4, 24 και 48 h από τις οποίες διαπιστώθηκε ότι το φαινολικό φορτίο μειώθηκε μέχρι και 53,6% (από δείγμα που λήφθηκε μετά την ολοκλήρωση της 3^{ης} εβδομάδας ανάπτυξης του μύκητα) ενώ το χρώμα έως και 23,4% (από δείγμα που λήφθηκε μετά την ολοκλήρωση της 1^{ης} εβδομάδας). Συμπερασματικά φαίνεται πως όχι μόνο η αποτοξικοποίηση των Υ.Α.Ε. είναι δυνατή με την καλλιέργειας του είδους *A. biennis* αλλά, σε ένα βαθμό, και μέσω της χρήσης του υγρού μέσου καλλιέργειας μετά την ανάπτυξη του μύκητα. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται η επίδραση των λιγνολυτικών ενζύμων του *A. biennis* στη μείωση των φαινολικών ενώσεων και στον αποχρωματισμό των ΥΑΕ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περαιτέρω εκτενέστερη μελέτη της χρήσης υγρού μέσου καλλιέργειας επιλεγμένων μυκήτων λευκής σήψης στην αποτοξικοποίηση των Υ.Α.Ε. και η εν γένει βελτιστοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου βιοεπεξεργασίας.

Λέξεις Κλειδιά: Μύκητες, Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων, Λιγνολυτικά Ένζυμα, Βιολογική Διαχείριση, Βιοαποδόμηση

Abstract

Olive-mill-wastewater (OMW) is the main by-product of the olive oil extraction process, and it is considered as a major pollution factor especially in the Mediterranean basin where most of olive tree cultivation takes place. Treatment of OMW is particularly difficult because of its huge volume of production within a limited time period, its high organic content and the large number and scattered distribution of olive oil mills. To date, no method of OMW treatment or disposal has been widely adopted in Greece; hence, large quantities of this effluent are still led either to soil or water receptors, and to lesser degree to open evaporation ponds. The use of efficient and environmentally friendly methodologies based on physicochemical and/or biological approaches could provide viable solutions. The use of white rot fungi (WRF) for the treatment of several agro-industrial effluents is gaining in popularity thanks to the ligninolytic enzymes they excrete. These enzymes are able to degrade not only lignin but also other recalcitrant molecules of similar structure. The first part of the experiments focused on the study of the effect that the growth of *Abortiporus biennis* (phylum *Basidiomycota*) in OMW (25% v/v) had on the total phenolic content, decolorization and phytotoxicity of the effluent when supplemented with nitrogen and co-enzymes (Cu & Mn). The cultures were maintained for 35 days under a continuous agitation regime at 27°C. Every week, measurements of the total phenolic content, decolorization and lignolytic enzyme activities were taking place. The maximum phenolic reduction was 91.5% and decolorization over 50%. The enzymes measured were laccase, MnP and MnIP, while the presence of LiP and VaOX was not detected. The enzyme activity was affected either positively either negatively by the presence of nitrogen, manganese and copper. The final day of measurements, the activity of laccase, MnP and MnIP was rather low. Moreover, at the end of the incubation period (35 days), the fungal biomass, pH, electrical conductivity and germination index of lettuce seeds were estimated. The largest fungal biomass was recorded in the OMW medium with the highest concentrations of nitrogen and metals. Despite the relatively large biomass production and the high level of phenolic degradation, the phytotoxicity did not seem to improve significantly. The second part of the experiments focused on the assessment of the effect of the liquid culture medium (obtained after 7, 14, 21, 28 and 35 days of A.

biennis growth in OMW) on raw OMW (25% v/v), which was further subjected to incubation under agitation for 4, 24 and 48 h at 37°C. The maximum reduction of total phenolic content was 53.6% (with liquid culture medium obtained after 21 days of fungal growth), whereas the decolorization was reached the 23.4% (with liquid culture medium obtained after 7 days of fungal growth). In conclusion, not only *A. biennis* confirms its ability to degrade OMW, but also its growth medium has similar effects. Furthermore, the excretion of lignolytic enzymes related to reduction of phenolic content and decolorization of OMW. These experiments could be a motivation to investigate the mode of action of growth medium extract and if it would constitute an alternative OMW treatment method.

Key Words: fungi, olive mill wastewater, lignolytic enzymes, biological treatment, bioremediation

Ευχαριστίες

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιο για την ευκαιρία να συνεργαστώ με την επιστημονική του ομάδα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή ως το τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών και για τις πολύτιμες γνώσεις και κατευθύνσεις που μου έδωσε. Κατόπιν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα τον Καθηγητή κ. Κατινάκη Παναγιώτη που ως επιστημονικός υπεύθυνος του μεταπτυχιακού προγράμματος η συμβολή του ήταν καθοριστικής σημασίας αλλά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη που η διδασκαλία και η σχεδόν καθημερινή τριβή με βοήθησε στην καλύτερη κατανόηση θεμάτων που άπτονται της συγκεκριμένης εργασίας. Επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα του Γ.Π.Α. και βασικό συνεργάτη κ. Κουτρώτσιο Γεώργιο που οι γνώσεις, η εμπειρία και κυρίως η έμπρακτη συμβολή του καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου διαμόρφωσαν το τελικό αποτέλεσμα της εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της επιστημονικής ομάδας του κ. Ζερβάκη, τον Δρ. Πολέμη Ηλία, την υποψήφια διδάκτορα κ. Φρυσούλη Βασιλική και τον κ. Δασκαλόπουλο Βασίλειο (Γεωπόνο, MSc), που από την πρώτη στιγμή με υποδέχθηκαν θερμά και με βοήθησαν οποτεδήποτε χρειάστηκε. Στη συνέχεια, όλους τους υπόλοιπους καθηγητές, εργαζόμενους και ερευνητές στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας που δημιούργησαν ένα πολύ ευχάριστο κλίμα κατά την καθημερινή μου απασχόληση στο χώρο. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, που για άλλη μια φορά με στήριξε και ήταν δίπλα μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract.....	4
1 Εισαγωγή	9
1.1 Η καλλιέργεια του ελαιόδεντρου	9
1.2 Διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου	10
1.3 Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιοτριβείων	14
1.3.1 Φυσικοχημικές Μέθοδοι Επεξεργασίας.....	16
1.3.2 Απομόνωση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας.....	19
1.3.3 Βιολογικές μέθοδοι.....	20
1.3.3.1 Αναερόβιες Μέθοδοι Διαχείρισης	20
1.3.3.2 Αερόβιες Μέθοδοι Διαχείρισης	23
1.3.3.2.1 Κομποστοποίηση	24
1.3.3.2.2 Μύκητες Λευκής Σήψης	26
1.3.3.3 Συνδυασμοί Αερόβιας και Αναερόβιας Επεξεργασίας.....	33
2 Στόχος της Εργασίας.....	34
3 Υλικά και Μέθοδοι	35
3.1 Βιολογικό Υλικό	35
3.2 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar – PDA.....	35
3.3 Υγρό Απόβλητο Ελαιοτριβείου	35
3.4 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού φορτίου του αποβλήτου.....	36
3.5 Εκτίμηση της μείωσης του χρώματος του αποβλήτου	37
3.6 Εκτίμηση της ενεργότητας των ενζύμων	38
3.6.1 Λακκάση	38
3.6.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn (MnIP) και Mn-υπεροξειδάση (MnP)	39
3.6.2.1 Εκτίμηση της παρέμβασης του υποστρώματος (background activity) στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn και Mn-υπεροξειδάση	39
3.6.2.2 Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP).....	40
3.6.2.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Mn – υπεροξειδάση (MnP) 41	
3.6.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση (LiP).....	42
3.6.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης (VAO)	43
3.7 Μέτρηση Βιομάζας	44
3.8 Μέτρηση pH	44
3.9 Μέτρηση Αγωγιμότητας	45
3.10 Μέτρηση του Δείκτη Βλαστικότητα	45
3.11 Πειραματική Διαδικασία.....	45
3.12 Στατιστική Ανάλυση.....	46
4 Αποτελέσματα.....	49
4.1 Μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου του αποβλήτου παρουσία του μύκητα.....	49
4.2 Μεταβολή του χρώματος του αποβλήτου παρουσία του μύκητα.....	51

4.3	Παραγωγή Ενζύμων.....	52
4.3.1	Λακκάση.....	52
4.3.2	MnP.....	55
4.3.3	MnIP.....	57
4.3.4	LiP και VAOx.....	59
4.4	Μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου με εκχύλισμα από την καλλιέργεια του μύκητα.....	59
4.5	Μεταβολή του χρώματος του αποβλήτου με εκχύλισμα από την καλλιέργεια του μύκητα.....	61
4.6	Προσδιορισμός Βιομάζας.....	63
4.7	Προσδιορισμός pH.....	64
4.8	Προσδιορισμός Αγωγιμότητας.....	64
4.9	Βλαστικότητα.....	65
5	Συζήτηση.....	67
6	Συμπεράσματα.....	76
7	Παράρτημα Αποτελεσμάτων.....	77
8	Βιβλιογραφία.....	84
9.	Πηγές Εικόνων και Διαγραμμάτων:.....	98

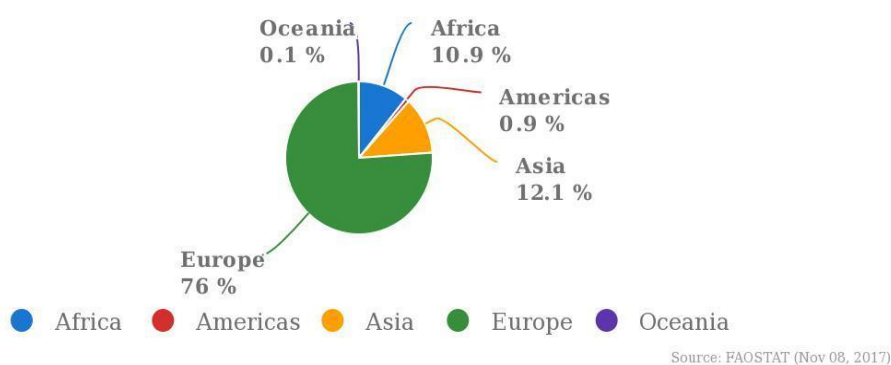
1 Εισαγωγή

1.1 Η καλλιέργεια του ελαιόδεντρου

Το παρθένο ελαιόλαδο προέρχεται από τον καρπό του είδους *Olea europaea* της οικογένειας *Oleaceae*. Η καλλιέργεια της ελιάς είναι πολύ διαδεδομένη παγκοσμίως αλλά κυρίως γύρω από την Μεσόγειο. Η Ευρώπη κατέχει το 76% της παραγωγής του παρθένου ελαιολάδου για περισσότερα από είκοσι χρόνια (Διάγραμμα 1.1). Η Ισπανία κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή, με την Ιταλία να έρχεται δεύτερη και την Ελλάδα τρίτη (Διάγραμμα 1.2). Η ίδια κατάταξη ισχύει και για την παραγωγή ελαιοκάρπου. Το 2014, στη χώρα μας, συγκομίστηκαν 1.780.560 τόνοι ελαιοκάρπου από 938.270 ha και παρήχθησαν 208.900 τόνοι παρθένου ελαιολάδου καθιστώντας το τελευταίο το 5^ο κατά σειρά παραγόμενο προϊόν (Διάγραμμα 1.3). (www.fao.org/faostat/) Επίσης, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στη χώρα μας λειτουργούν 573 εγκεκριμένες μονάδες τυποποίησης ελαιολάδου μέχρι το 2018 (www.minagric.gr).

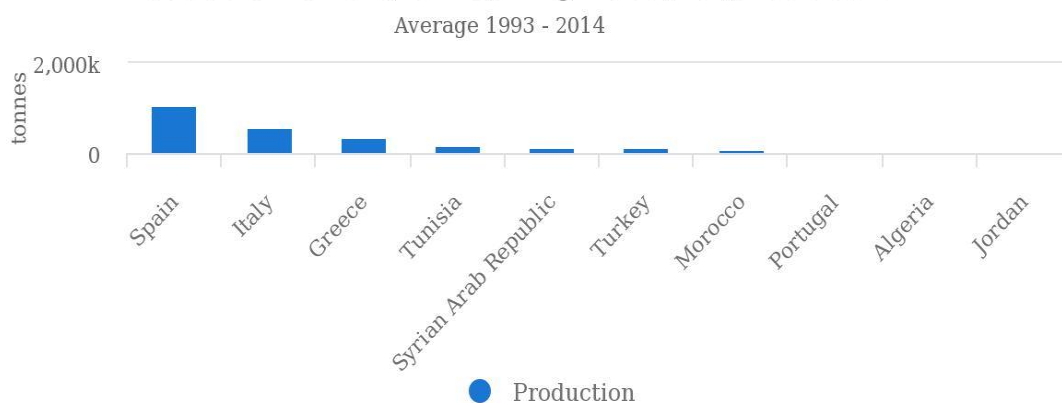
Production share of Oil, olive, virgin by region

Average 1993 - 2014



Διάγραμμα 1.1: Τα ποσοστά παραγωγής παρθένου ελαιολάδου την περίοδο 1993-2014 ανά ήπειρο (www.fao.org/faostat/)

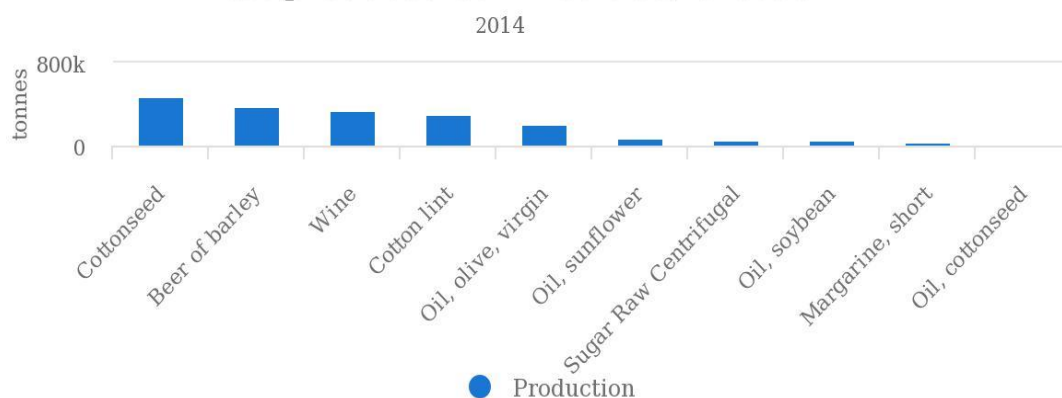
Production of Oil, olive, virgin: top 5 producers



Source: FAOSTAT (Nov 08, 2017)

Διάγραμμα1.2: Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή παρθένου ελαιολάδου την περίοδο 1993-2014 (www.fao.org/faostat/)

Most produced commodities, Greece



Source: FAOSTAT (Nov 08, 2017)

Διάγραμμα1.3: Τα δέκα αγροτικά προϊόντα με τη μεγαλύτερη παραγωγή στην Ελλάδα για το 2014 (www.fao.org/faostat/)

1.2 Διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου

Μετά τη συγκομιδή του ελαιόκαρπου ακολουθεί η εξαγωγή του λαδιού στο ελαιοτριβείο. Η τελική ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου εξαρτάται από τον τρόπο συγκομιδής, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού και σαφώς από τη μέθοδο

εξαγωγής του. Οι άγουρες ελιές φαίνεται να δίνουν λάδι πιο πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις από τις υπερώριμες. Όσο αναφορά στο τρόπο που επηρεάζει η μέθοδος διαχωρισμού, το ελαιόλαδο από διαφασικό σύστημα φαίνεται να περιέχει μεγαλύτερο φαινολικό φορτίο (Gimeno et al., [2002](#)). Η παραδοσιακή μέθοδος θεωρείται ήδη ξεπερασμένη και έχει αντικατασταθεί από σύγχρονες οι οποίες συνεχώς βελτιώνονται.

Παραδοσιακή Μέθοδος: Αρχικά οι συγκομισμένοι καρποί συνθλίβονταν σε μυλόπετρες (Εικόνα 1.1) που η κινητήριος δύναμη δίνεται από ζώα . Η πάστα που δημιουργείται αποτελείται από το ελαιώδες μέρος, το υδατικό και το στερεό και τοποθετείται σε υφασμάτινες σακούλες (ντορβάδες). Οι τελευταίες στοιβάζονταν η μια πάνω από την άλλη και με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας (Εικόνα 1.2) γίνεται η εξαγωγή του λαδιού και του χυμού. Στη συνέχεια είτε αφήνεται ώστε να διαχωριστεί από μόνο του σε δυο φάσεις, λόγω διαφορετικού ειδικού βάρους, είτε θα κατευθυνόταν σε διαχωριστήρες. (Albuquerque et al., [2004](#))



Εικόνα1.1: Μυλόπετρες παραδοσιακού ελαιοτριβείου



Εικόνα1.2: Η μηχανική πρέσα (δεξιά) και το δοχείο αρχικής έκθλιψης των καρπών με τη σκάφη συγκέντρωσης της ελαιόπαστας (στο βάθος)

Σύγχρονη Μέθοδος: Με την ανακάλυψη της ηλεκτρικής ενέργειας η διαδικασία έγινε απλούστερη και συντομότερη. Αρχικά, μετά την παραλαβή, γίνεται διαχωρισμός του καρπού από τα φύλλα κι αν κρίνεται απαραίτητο πλύσιμο. Μετά οι ελιές οδηγούνται στο σπαστήρα όπου με γρήγορη περιστροφή αναγκάζονται να χτυπήσουν με δύναμη σε μια μεταλλική επιφάνεια. Από αυτή τη διαδικασία παραλαμβάνεται μια πάστα στην οποία θα γίνει η μάλαξη. Σ' αυτό το στάδιο γίνεται προετοιμασία για την απομόνωση του ελαιολάδου σταματώντας την γαλακτοματοποίηση που άρχισε κατά το σπάσιμο, σχηματίζοντας μεγαλύτερες σταγόνες ελαίου διαχωρισμένες από το νερό. Η διαδικασία αυτή κρατάει από μίση ως μια ώρα στους 26,6° – 30° C. Η σταθερότητα της θερμοκρασίας είναι πολύ σημαντική καθώς υψηλότερες οδηγούν σε απώλεια αρωμάτων, πικράδα και στυφότητα του τελικού προϊόντος. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του λαδιού από τους υδατικούς χυμούς και τα στερεά. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με διφασικούς ή τριφασικούς διαχωριστήρες (Εικόνα 1.3). (Albuquerque et al., [2004](#))

Το τριφασικό σύστημα διαχωρισμού εισήχθη στην Ισπανία τη δεκαετία του '70. Η νέα αυτή προσέγγιση στόχευε στην μεγιστοποίηση της παραγωγής λαδιού (Morillo et al., [2009](#)). Ονομάζεται έτσι καθώς διαχωρίζει την ελαιόπαστα σε τρεις φάσεις, τη στερεή, την ελαιώδη και την υδατική (Εικόνα 1.4). Στα τριφασικά μηχανήματα γίνεται επιπλέον προσθήκη νερού για ξέπλυμα, το οποίο καταλήγει ως απόβλητο μαζί με τους χυμούς και τα στερεά υλικά των καρπών. Τα μειονεκτήματα είναι πως το λάδι «ξεπλένεται» από αντιοξειδωτικά και αρώματα και λόγω του επιπλέον νερού παράγονται μεγάλες ποσότητες αποβλήτου που διαχειρίζονται δύσκολα. Ως προς τα απόβλητα, το αρνητικό είναι η τεράστια παραγωγή δύσκολα διαχειρίσιμου αποβλήτου. Οι πιο διαδεδομένοι τρόποι διαχείρισης του υγρού αποβλήτου είναι η απόθεση σε δεξαμενές από όπου εξατμίζεται, και η χρήση του ως εδαφοβελτιωτικό σε καλλιεργούμενα εδάφη (Albuquerque et al., [2004](#)).

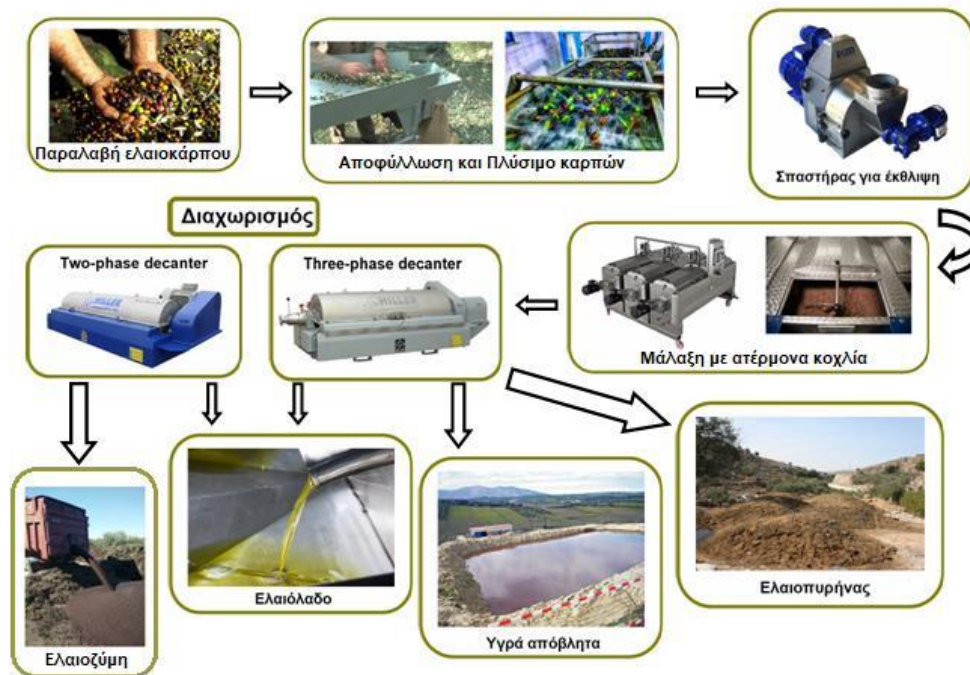
Οι διφασικοί διαχωριστήρες εμφανίστηκαν στην Ισπανία στις αρχές της δεκαετίας του '90 ως μια φιλικότερη προς το περιβάλλον λύση. Αντίθετα, με το τριφασικό σύστημα, δεν προστίθεται επιπλέον νερό, το ελαιόλαδο είναι καλύτερης ποιότητας και παράγεται μικρότερος όγκος αποβλήτου. Από τα διφασικά ελαιοτριβεία παράγεται ελαιόλαδο και απόβλητο σε μορφή πάστας με υψηλή περιεκτικότητα σε

νερό, περίπου 56-65% (Morriilo et al., [2009](#); Roig et al., [2006](#)). Στην Ισπανία, συνήθως, το απόβλητο φυγοκεντρείται εκ νέου για παραλαβή επιπλέον ποσότητας λαδιού. Το απόβλητο που προκύπτει και από την τον δεύτερο διαχωρισμό, ξηραίνεται και με χημικό διαχωρισμό με εξάνιο απομονώνεται το επιπλέον λάδι. Το τελικό παραπροϊόν δύναται να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο για παραγωγή ενέργειας στα ελαιοτριβεία. Μια άλλη προσέγγιση αξιοποίησης είναι η κομποστοποίηση αυτού του στερεού αποβλήτου και η χρήση του ως λίπασμα (Alburquerque et al., [2004](#)). Τα παραπάνω συστήματα διαχωρισμού στηρίζονται στη φυγοκέντρωση και είναι οριζόντιας διατάξεως. Υπάρχουν και κάθετης διάταξης με καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και συντομότερης λειτουργίας (Vossen, [2007](#)).



Εικόνα1.3: Ο τρόπος διαχωρισμού της ελαιόπαστας σε τρία κλάσματα

Το απόβλητο χαρακτηρίζεται από υψηλό οργανικό φορτίο ($COD \approx 200g/L$), μεγάλο λόγο C/N και ελαφρώς όξινο pH (4-6). Οι οργανικές ενώσεις που το απαρτίζουν είναι λιπίδια, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και φαινολικές ενώσεις. Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα του αποβλήτου απέναντι σε φυτά και μικροοργανισμούς. Η μη σταθερή φύση τους, οδηγεί σε φαινόμενα πολυμερισμού κατά την αποθήκευση και δημιουργίας δύσκολα αποδομήσιμων ενώσεων που ρυπαίνουν το περιβάλλον που αποτίθενται. (Morriilo et al., [2009](#))



Εικόνα1.4: Σχεδιάγραμμα των σταδίων παραγωγής ελαιολάδου από τριφασικό και διφασικό σύστημα διαχωρισμού

1.3 Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιοτριβείων

Το υψηλό οργανικό φορτίο και η τοξικότητα που προκαλεί το απόβλητο στους οργανισμούς, κυρίως φυτά και μικροοργανισμούς, καθιστούν απαραίτητη την διαχείρισή του. Τα απόβλητα από την εξαγωγή του ελαιολάδου μπορεί να είναι υγρά, από τριφασικούς διαχωριστήρες, ή σε μορφή πάστας, από διφασικούς. Η σύσταση του υγρού αποβλήτου εξαρτάται από παράγοντες όπως τη μέθοδο εξαγωγής, την καλλιεργούμενη ποικιλία, το στάδιο ωριμότητας των καρπών, την περιοχή, τις καλλιεργητικές τεχνικές και το κλίμα. (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006; Roig et al., 2006)

Το υγρό απόβλητο ελαιουργείων θεωρείται σημαντικός ρυπαντικός παράγοντας για το περιβάλλον καθώς περιέχει δύσκολα αποδομήσιμα υλικά όπως σύνθετες φαινόλες και λιπαρά οξέα μακρών αλυσίδων (Roig et al., 2006). Σ' αυτήν τη κατηγορία ανήκουν τα φλαβονοειδή, οι απλές φαινόλες κι οι πολυφαινόλες που προκύπτουν μετά από πολυμερισμό (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006). Από την άλλη αποτελεί και χρήσιμη πηγή οργανικής ουσίας και θρεπτικών στοιχείων που

οδηγεί, εκτός από την ανάγκη αποτοξικοποίησης, στην παραγωγή μεθανίου μέσω αναερόβιων διαδικασιών και οργανικού λιπάσματος μετά από κομποστοποίησή του (Roig et al., [2006](#)).

Στην Ελλάδα οι μονάδες εξαγωγής ελαιολάδου είναι μικρές και διάσπαρτες με αποτέλεσμα η αξιοποίηση του υγρού αποβλήτου να δυσχεραίνεται. Οι συνήθειες πρακτικές αφορούν λύσεις όπως απόθεση στο έδαφος, σε λίμνες και ποτάμια ή συγκέντρωσή τους σε μεγάλες δεξαμενές ώστε να εξατμιστούν. Όλα τα παραπάνω θεωρούνται ακατάλληλες μέθοδοι καθώς από τη μια ρυπαίνεται το περιβάλλον κι από την άλλη κυριαρχεί έντονη και δυσάρεστη οσμή (Εικόνα 1.5). (Paraskeva & Diamadoroulos, [2006](#)) Η εξάτμιση αποτελεί μια εφαρμόσιμη μέθοδο στη χώρα μας καθώς απαιτεί απλές εγκαταστάσεις και το κλίμα ευνοεί στην επίτευξή της. Έχει όμως και αρνητικά όπως οι απαιτήσεις σε έκταση, η ενοχλητική οσμή και η παρουσία εντόμων (Roig et al., [2006](#)). Επίσης η υγρή φάση του αποβλήτου μαζί με τον ελαιοπυρήνα χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή ενέργειας και χρήση αυτής στα ελαιοτριβεία (Vitolo et al., [1999](#)). Η απευθείας εφαρμογή στον αγρό προκαλεί συμπτώματα φυτοτοξικότητας καθώς σε φυτά σίτου παρουσιάστηκαν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, μειώθηκαν οι δευτερεύοντες βλαστοί και η παραγωγή τελικά δεν βελτιώθηκε (Rinaldi et al., [2003](#)). Οι θετικές επιδράσεις της εφαρμογής του αποβλήτου στο έδαφος είναι ο εφοδιασμός με κάλιο (K) (Gallardo-Lara et al., [2000](#)), η συγκράτηση συγκεντρώσεων ζιζανιοκτόνων από το έδαφος (Cox et al., [1997](#)) και η παρεμπόδιση παθογόνων μικροοργανισμών (Kotsou et al., [2003](#)).

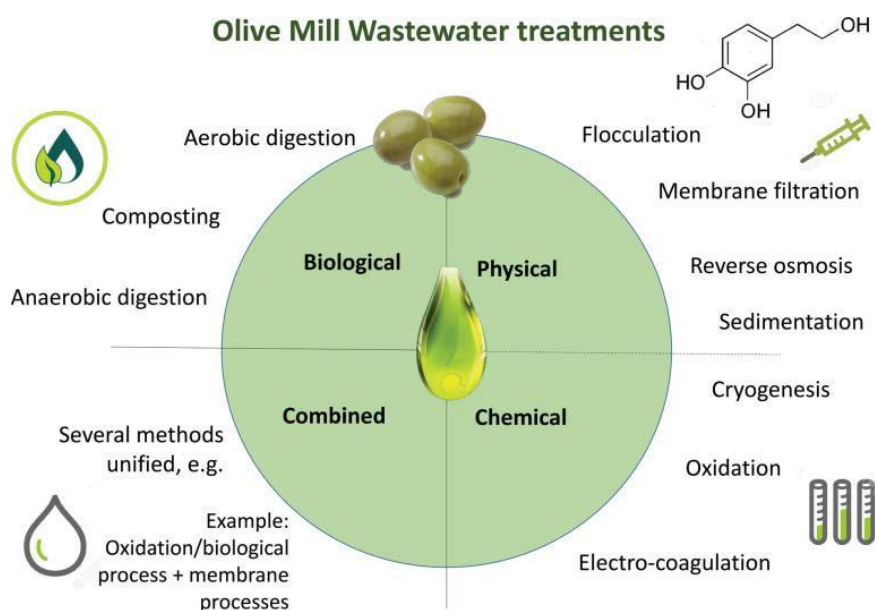


Εικόνα 1.5: Απόθεση αποβλήτων ελαιοτριβείων σε ποτάμια στην Μεσσηνία (αριστερά) και Ηλεία (δεξιά)

Μια επίσης διαδεδομένη εφαρμόσιμη μέθοδος, είναι η χρήση του ως εδαφοβελτιωτικό στους αγρούς. Εκτός από δύσκολα διαχειρίσιμες ενώσεις, τα υγρά

απόβλητα είναι πλούσια σε οργανική ουσία και ανόργανα θρεπτικά κι αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα στη γεωργική πρακτική. Όμως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το υλικό αυτό είναι υπεύθυνο για πρόκληση φυτοτοξικότητας, παρεμπόδιση φυτρώματος των σπόρων και μειωμένη ευρωστία φυτών όποτε απαιτείται επεξεργασία πριν αυτό το βήμα. (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#); Roig et al., [2006](#))

Οι μέθοδοι επεξεργασίας χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: τις φυσικές, τις χημικές, τις βιολογικές και τους συνδυασμούς μεταξύ τους (βλ. εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Οι μέθοδοι επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιοτριβείου κατά κατηγορία (Caporaso et al., [2017](#))

1.3.1 Φυσικοχημικές Μέθοδοι Επεξεργασίας

Στις φυσικές μεθόδους ανήκουν διαδικασίες όπως: η αραίωση, η εξάτμιση, η καθίζηση, η διήθηση και η φυγοκέντρωση. Πρέπει να σημειωθεί πως με τις φυσικές μεθόδους δεν μειώνεται το οργανικό φορτίο και η τοξικότητα του αποβλήτου. Η αραίωση συνήθως προηγείται της βιολογικής επεξεργασίας ώστε να προσαρμοστούν και να αναπτυχθούν ευκολότερα οι μικροοργανισμοί. Με την εξάτμιση, αυτό που επιτυγχάνεται είναι κατά 70-75% μείωση του όγκου αλλά η οργανική ύλη παραμένει στο ίζημα που θα πρέπει να επεξεργαστεί ξεχωριστά (Εικόνα 1.7). Με την φυγοκέντρωση και διήθηση παρατηρείται αύξηση του pH και της αγωγιμότητας και

μείωση του οργανικού φορτίου λόγω διαχωρισμού. Κάποιες φορές επιλέγεται η θερμική επεξεργασία του αποβλήτου για παραγωγή ενέργειας για το ελαιοτριβείο αλλά εκτός της εκπομπής τοξικών αερίων στην ατμόσφαιρα απαιτείται και ακριβός εξοπλισμός. (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#))



Εικόνα1.7: Το ίζημα που απομένει μετά την εξάτμιση του υγρού αποβλήτου

Στις χημικές μεθόδους ανήκει και η κροκίδωση μέρους του αποβλήτου με κάποιο χημικό παράγοντα που οδηγεί σε μείωση του όγκου και αποτοξικοποίησή του. Οι Atkas et al. ([2001](#)) επεξεργάστηκαν διάφορα υγρά απόβλητα από την παραγωγή ελαιολάδου με ασβέστη σε διάφορες δόσεις (10-40g/L) ώστε να κροκιδωθεί ένα μέρος του και να μειωθεί η τοξικότητά του. Έτσι, οι φαινολικές ενώσεις μειώθηκαν 62-73% και οι επιστήμονες πρότειναν την εφαρμογή του ασβέστη πριν από άλλες φυσικές μεθόδους. Για την αποτοξικοποίηση υγρού αποβλήτου προηγήθηκε η προσθήκη ασβέστη και υδροξειδίου του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) με σκοπό να μειωθούν τα στερεά υλικά και να μην υπάρξουν μηχανικές βλάβες από αυτά στη συνέχεια (Bubba et al., [2004](#)). Οι Sarika et al. ([2005](#)), υπολόγισαν το ποσοστό των συσσωματωμάτων στο 20% του αρχικού αποβλήτου πειραματιζόμενοι με έξι πολύ-ηλεκτρολύτες και με ασβέστη και μολυσίτη (FeCl_3) ως μάρτυρες. Για τέσσερις από αυτούς, ήταν δυνατόν, σε δόση 2,5-3g/L να συγκεντρώνουν τα στερεά υλικά του αποβλήτου και να μειώσουν τις συγκεντρώσεις COD και BOD. Οι Kestioglu et al. ([2005](#)) χρησιμοποίησαν πολύ-ηλεκτρολύτες όπως το θειικό αργίλιο (Al_2SO_4) και το χλωρίδιο του τρισθενούς σιδήρου (FeCl_3) με αποτέλεσμα το ποσοστό των στερεών του αποβλήτου να μειωθεί κατά 10-15%. Με την αξιοποίηση των παραπάνω

κροκιδωτικών μειώνεται το COD κατά 94-95% και το φαινολικό φορτίο κατά 90-91%.

Η χρήση ιόντων Al^+ και Fe^+ ως μέσω ηλεκτροκροκίδωσης του αποβλήτου οδήγησαν σε αποχρωματισμό κατά 52% και μείωση του οργανικού φορτίου μετά από 30 λεπτά κατά 42% (Inan et al., [2003](#)). Η οικονομικά συμφέρουσα ροή ιόντων Al^+ $75mA\ cm^{-2}$ μείωσε το οργανικό φορτίο κατά 76%, τις πολυφαινόλες κατά 91% και το χρώμα 95% σε 25 λεπτά (Adhoum & Monser, [2004](#)).

Για καλύτερα αποτελέσματα τις περισσότερες φορές συνδυάζονται διάφορες φυσικές και χημικές μέθοδοι. Οι Al-Mahan et al. ([2000](#)) παρατήρησαν πως μετά τη φυγοκέντρηση το COD μειώθηκε κατά 21% και το BOD κατά 16% και ύστερα από διήθηση 16% επιπλέον το BOD. Στο τέλος έγινε και προσρόφηση του αποβλήτου σε άργιλο οπότε και το COD μειώθηκε επιπλέον 71% και το φαινολικό φορτίο κατά 81%. Σ' ένα άλλο πείραμα, οι Azzam et al. ([2004](#)) μέτρησαν μείωση 94% φαινολικών ενώσεων και 83% οργανικής ουσίας μετά από καθίζηση, φυγοκέντρηση, διήθηση και τέλος προσρόφηση του διηθήματος σε ενεργό άνθρακα.

Η οξειδωση αποτελεί έναν διαδεδομένο τρόπο επεξεργασίας των βιομηχανικών και αστικών υγρών αποβλήτων (Stasinakis, [2008](#)). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη πρόκληση ελευθέρων και ασταθών ριζών $-OH^+$ που δημιουργούνται από μια πηγή οξυγόνου και ενέργειας (θερμότητα) (Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)). Ως πηγή οξυγόνου χρησιμοποιείται το όζον (O_3) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ενέργειας η ηλιακή ή η υπεριώδης ακτινοβολία (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#)). Πολλές φορές απαιτείται κατακρήμνιση των στερεών για καλύτερη διέλευση του φωτός (Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)). Οι Kestioglu et al. ([2005](#)), ανάμεσα στις υπόλοιπες μεθόδους σύγκριναν και την επεξεργασία των αποβλήτων με H_2O_2/UV και O_3/UV χωρίς να φανερώνεται κάποια διαφορά ως προς την αποδόμηση του οργανικού φορτίου και των φαινολικών.

Οι οξειδωτικές μέθοδοι είναι αρκετά διαδεδομένες για στη διαχείριση των αποβλήτων με το O_3 να θεωρείται ένας επιλεκτικός οξειδωτικός παράγοντας ως προς τους αρωματικούς δακτυλίους και τους διπλούς δεσμούς ενώ η πλήρης ανοργανοποίηση του αποβλήτου θεωρείται εξαιρετικά δύσκολη (Karageorgos et al. [2006](#)). Η μελέτη των Benitez et al. ([1997](#)) επιβεβαιώνει αυτή την εκλεκτικότητα καθώς διέσπασαν το 94,3% των φαινολικών ενώσεων αλλά το COD μειώθηκε μόνο κατά 6,2%. Οι Karageorgos et al. ([2006](#)) προσπάθησαν να εξυγιάνουν το υγρό απόβλητο έξι μηνών αλλά και «φρέσκο», με οζονοποίηση. Παρατήρησαν πως το

σύνολο του οργανικού φορτίου δεν μειώθηκε σημαντικά αλλά οι φαινολικές ενώσεις αποδομήθηκαν έως και κατά 90%. Η τοξικότητά του αξιολογήθηκε πριν και μετά την οξείδωση, στο θαλάσσιο βακτήριο *Vibrio fischeri*, και ήταν ανάλογη της μείωσης του COD. Από την άλλη το O₃ δεν διαλύεται σε μεγάλο ποσοστό στο νερό γι' αυτό θεωρείται πως έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα (Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)).

Κάτω από συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας νερού και πίεσης αέρα πραγματοποιείται η οξείδωση δια «υγρού αέρα» (wet air oxidation) που θεωρείται αποτελεσματική και σύντομη μέθοδος η οποία, όμως, έχει υψηλό κόστος εξοπλισμού και λειτουργίας (Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)). Για βελτίωση της παραπάνω διαδικασίας γίνεται ρύθμιση του pH, προσθήκη κάποιου προωθητή δημιουργίας ελευθέρων ριζών (π.χ. H₂O₂) και καταλυτών (π.χ. Pt, CuO) (Rivas et al., 2001a, b). Μια άλλη κατηγορία είναι η οξείδωση με αντιδραστήρια Fenton δηλαδή ο συνδυασμός δισθενούς ή τρισθενούς Fe (FeCl₃, FeSO₄) με H₂O₂ που θεωρείται απλή και οικονομική (Rivas et al., 2001c; Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)). Με συγκέντρωση αποβλήτου 70%, λόγο H₂O₂/ FeSO₄=8,33, pH=4 και διάρκεια 2 ωρών το COD μειώθηκε κατά 40% (Ahmadi et al., [2005](#)). Υπάρχει και επαυξημένη μορφή της παραπάνω οξείδωσης (Enhanced Fenton's oxidation) που αφορά στο συνδυασμό των παραπάνω με UV ή ηλιακή ενέργεια (Gernjak et al., [2003](#)). Ο συνδυασμός του H₂O₂/FeSO₄ με TiO₂ και ηλιακή ενέργεια οδήγησαν σε 100% μείωση των φαινολικών ενώσεων και 85% του οργανικού φορτίου (Gernjak et al., [2004](#)). Οι Drouiche et al. ([2004](#)) αρχικά υπέρ-διήθησαν το υγρό απόβλητο και στη συνέχεια εφαρμόσαν φωτο-οξείδωση με UV/H₂O₂ και τα αποτελέσματα ήταν επίσης ικανοποιητικά.

1.3.2 Απομόνωση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Το υγρό απόβλητο ελαιουργίας είναι κατά πολύ πλουσιότερο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις σε σχέση με το ελαιόλαδο. Έτσι μια προσέγγιση είναι η ανάκτηση τέτοιων οργανικών συστατικών κατά την επεξεργασία τους. Τα κυριότερα είναι τα εξής: υδροξυ-τυροσόλη, τυροσόλη και λακτόνη (Roig et al., [2006](#)). Η υδροξυ-τυροσόλη, θεωρείται και το πλέον άφθονο με μια προσέγγιση του 1g σε 1L αποβλήτου. Ο τρόπος για την ανάκτησή τους συνήθως αφορά ένα συνδυασμό φυσικοχημικών διαδικασιών. Θα πρέπει να σημειωθεί πως με την αξιοποίηση προϊόντων που μπορεί

να προκύψουν, η διαχείριση των αποβλήτων γίνεται περισσότερο συμφέρουσα. (Rahmanian et al., [2014](#))

Οι Turano et al. ([2002](#)), πρότειναν αρχικά φυγοκέντρωση για απομάκρυνση των στερεών, εν συνεχεία υπερ-διήθηση του υπερκείμενου υγρού και τελικά διαχωρισμό των χρήσιμων συστατικών (πολυφαινόλες, λιπίδια, σάκχαρα). Σε ένα πείραμα τριών σταδίων, αρχικά απομακρύνθηκαν οι στερεές ύλες, στη συνέχεια οι οσμές και το χρώμα και τελικά διαχωρίστηκαν οι φαινολικές ενώσεις υψηλής προστιθέμενης αξίας (Agalias et al., [2007](#)). Με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας απομονώθηκαν εννέα διαφορετικές φαινολικές ενώσεις αποβλήτου ελαιουργίας (Ceccon et al., [2001](#)). Οι Bouzid et al. ([2005](#)), αφού χαρακτήρισαν ενζυμικά το υγρό καλλιέργειας του είδους *Aspergillus niger*, το χρησιμοποίησαν για ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από αντίστοιχο εκχύλισμα αποβλήτου.

Οι ενώσεις που απομονώνονται εφαρμόζονται σε τρόφιμα ως γαλακτωματοποιητές ή αντιμικροβιακοί παράγοντες (Caroraso et al., [2017](#)) και σε καλλυντικά (Galanakis, [2010](#)).

1.3.3 Βιολογικές μέθοδοι

Από τις πλέον μελετημένες είναι και οι βιολογικές μέθοδοι εξυγίανσης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. Θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, αποτελεσματικές και οικονομικά συμφέρουσες λύσεις. Χωρίζονται στις αναερόβιες και τις αερόβιες μεθόδους ανάλογα τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται. Γενικά, η επεξεργασία τους με μικροοργανισμούς απαιτεί προσοχή στην επιλογή των κατάλληλων στελεχών και την προετοιμασία του αποβλήτου λόγω της τοξικότητάς του. (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#))

1.3.3.1 Αναερόβιες Μέθοδοι Διαχείρισης

Στις αναερόβιες προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται βακτήρια και τα στάδια της διαδικασίας είναι η υδρόλυση, η οξεογένεση και μεθανογένεση. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, η ελάχιστη παραγωγή λυματολάσπης και τέλος η παραγωγή μεθανίου. Για μια πιο επιτυχημένη διαδικασία

τα βακτήρια εγκλιματίζονται σε βαθμιαίες συγκεντρώσεις αποβλήτου ή χρησιμοποιούνται στελέχη απομονωμένα από το ίδιο το υλικό καθώς οι ενώσεις που το αποτελούν δεν ευνοούν την ανάπτυξή τους (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#)).

Τις περισσότερες φορές προηγείται αραίωση, καθίζηση, διήθηση, ρύθμιση του pH και προσθήκη θρεπτικών αν και σε μερικές περιπτώσεις δεν είναι αρκετά ούτε αυτά (Paraskeva & Diamadopoulos, [2006](#); Azbar et al., [2004](#); Filidei et al., [2003](#)). Τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο συγκεκριμένο απόβλητο παρεμποδίζουν τη ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών (Beccari et al., [1998](#)). Γι' αυτό το λόγο, στη μελέτη των Zouari & Ellouz ([1996](#)), πριν την αραίωση πραγματοποιήθηκε και αφαίρεση της ελαιώδους φάσης του αποβλήτου πριν την εισαγωγή του στον αναερόβιο αντιδραστήρα. Παρόλα αυτά, τα χρωμοφόρα μόρια δεν επέτρεψαν στον πληθυσμό των βακτηρίων να αναπτυχθεί.

Για τη συγκράτηση του πληθυσμού των βακτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί υλικά όπως ο μπετονίτης (Borja et al., [1992](#); Beccari et al., [1999](#); Raposo et al., [2004](#); Raposo et al., [2005](#)), ο σεπιολίτης (Borja et al., [1992](#)), ο ενεργός άνθρακας, η σιλικόνη (silica gel) (Bertin et al., 2004a, b; Bertin et al., [2010](#)), πορώδεις κύβοι (Bertin et al., [2010](#)) και το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) (Raposo et al., [2005](#)). Στα πλαίσια της προσπάθειας το υγρό απόβλητο να γίνει καταλληλότερο υπόστρωμα προστίθενται και στοιχεία όπως το ασβέστιο (Ca) για τη διάλυση των λιπαρών οξέων (Beccari et al., [1998](#)). Οι Georgacakis & Dalis ([1993](#)), διαχώρισαν τις δυο φάσεις του αποβλήτου, πρόσθεσαν αμμωνία (NH₃) και ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) για ρύθμιση του pH και του λόγου C/N, και επεξεργάστηκαν αναερόβια και τα δυο κλάσματα. Η προσθήκη Ca(OH)₂ και μπετονίτη βελτίωσε σε τέτοιο βαθμό την αναερόβια διαδικασία που δεν χρειαζόταν προηγούμενος διαχωρισμός του αποβλήτου (Beccari et al., [1999](#)). Οι Filidei et al. ([2003](#)), προεπεξεργάστηκαν το απόβλητο με προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃) και αμμωνίας (NH₃) τόσο για να ρυθμίσουν το pH όσο κι ως μέσα υποστήριξης κατά τη αναερόβια διαδικασία. Εκτός των παραπάνω, σ' ένα άλλο σκέλος του πειράματος, έγινε διήθηση και διαχωρισμός, για κομποστοποίηση του στερεού κλάσματος και αναερόβια επεξεργασία του υγρού όπου το οργανικό φορτίο και οι πολυφαινόλες μειώθηκαν σημαντικά. Οι Sabbah et al, ([2004](#)), κατέγραψαν μείωση της τάξης του 95% των φαινολικών ενώσεων αφού είχαν διηθήσει το απόβλητο και μετά εφαρμόσει ενεργό άνθρακα για προσρόφηση κάποιων ουσιών πριν την τελική αναερόβια επεξεργασία.

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου, δηλαδή η μεθανιογένεση, αποτελεί παράλληλα και πρόκληση καθώς η σύσταση του αποβλήτου αποτρέπει την διαδικασία αυτή (Hamdi, [1996](#)). Η τελική παραγωγή βιοαερίου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες εφαρμογής αναερόβιων διαδικασιών. Οι Borja et al., ([1992](#)) κατέγραψαν μείωση οργανικού φορτίου στο 90% και παραγωγή μεθανίου ανάλογα με το μέσο σταθεροποίησης από 0,318 έως 0,344 m³CH₄/kgCOD. Για μέγιστη αποδόμηση και παραγωγή μεθανίου, σε μελέτη των Dalis et al. ([1996](#)), η αναερόβια διαδικασία έγινε σε δυο διαφορετικούς αντιδραστήρες στη σειρά. Στον πρώτο έγινε μείωση του COD κατά 83% και στον δεύτερο επιπλέον 8%. Αντίστοιχα στο φαινολικό φορτίο, αρχικά 75% και στη συνέχεια 45%. Στα πειράματα των Betrin et al. (2004[a](#), [b](#)), παρουσία ενεργού άνθρακα υπήρξε μεγαλύτερη μείωση του COD και των φαινολικών ενώσεων απ' ό τι με τα silica gel και η παραγωγή μεθανίου ήταν 0,08 m³CH₄/kgCOD και 0,18 m³CH₄/kgCOD αντίστοιχα για τα δύο μέσα σταθεροποίησης.

Σε κάποιες περιπτώσεις οι αναερόβιοι χειρισμοί αποτοξικοποίησης του αποβλήτου έπονται μεθόδων οξειδωσης. Η βασική ιδέα της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι η μετατροπή σύνθετων ενώσεων σε απλούστερες που στη συνέχεια θα αποδομηθούν πλήρως από τους μικροοργανισμούς. Κατά αυτόν τον τρόπο μειώνεται και το κόστος, εφόσον εφαρμόζεται μια ήπια οξειδωση και το απόβλητο έχει μετατραπεί σ' ένα καταλληλότερο υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς (Mantzavinos & Kalogerakis, [2005](#)). Στη μελέτη των Khoufi et al. ([2006](#)), η προετοιμασία με οξειδωση τύπου Fenton διευκόλυνε την αναερόβια διαδικασία που ακολούθησε. Η προσθήκη ενός ακόμη βήματος, της υπερ-διήθησης, μείωσε τις πολυφαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους και αποτοξικοποίησε πλήρως το απόβλητο (Khoufi et al., [2009](#)). Εφαρμογή O₃, πριν την αναερόβια επεξεργασία, σε μη διηθημένο υγρό απόβλητο για 3 ώρες μείωσε τις φαινολικές ενώσεις και τα λιπίδια κατά 50% αλλά επέδρασε αρνητικά την τελική παραγωγή μεθανίου (Andreozzi et al., [1998](#)). Αντίθετα, οι Benitez et al. ([1997](#)), παρατήρησαν πως η οξειδωση με O₃ αύξησε την παραγωγή μεθανίου κατά την αναερόβια διαδικασία. Πιο πρόσφατα, οι Azabou et al ([2010](#)), εφάρμοσαν υγρή οξειδωση στο απόβλητο και στη συνέχεια η παραγωγή μεθανίου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με μη προ-επεξεργασμένο.

Μια διαφορετική προσέγγιση αφορά στο συνδυασμό των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με απόβλητα διαφορετικής προέλευσης και στη συνέχεια αναερόβια επεξεργασία. Η ανάμιξη με απόβλητα χοιροστασιών οδήγησε σε ικανοποιητική μείωση του οργανικού φορτίου και παραγωγή CH₄ (Marques et al., [1998](#); Marques,

[2001](#)). Οι ερευνητές πρότειναν πως δεν είναι απαραίτητη η αραίωση, η ρύθμιση του pH και η προσθήκη πηγής αζώτου (N) αν γίνει ανάμιξη είτε με λυματολάσπη, είτε με κοπριά, είτε με οικιακά απόβλητα (Angelidaki & Ahring, [1997](#)). Η ανάμιξη με κοπριά χοίρων μείωσε την οργανική ύλη κατά 75% και η NH₃ που περιείχε λειτούργησε σαν πηγή N και ρυθμιστής του pH (Angelidaki et al., [2002](#)).

1.3.3.2 Αερόβιες Μέθοδοι Διαχείρισης

Στις βιολογικές μεθόδους ανήκει και η επεξεργασία με αερόβιους μικροοργανισμούς είτε πρόκειται για μύκητες είτε για βακτήρια. Το βακτήριο *Bacillus pumilus* απομάκρυνε τις φαινολικές ενώσεις σε διαλύματα αποβλήτου (Ramos-Cormenzana et al., [1996](#)). Το αζωτοδεσμευτικό είδος *Azotobacter vinelandii* όχι μόνο μειώνει την φυτοτοξικότητα του αποβλήτου αλλά και το εμπλουτίζει με βακτήρια και μεταβολίτες τους που ευνοούν τις καλλιέργειες (Piperidou et al., [2000](#); Ehaliotis et al., [1999](#)). Μίγμα αερόβιων βακτηρίων μείωσε το οργανικό φορτίο κατά 85% και κατά 67% τις φαινολικές ενώσεις και η αποτοξικοποίησή του αξιολογήθηκε από πλαγκτόν (Isidori et al., [2004](#)). Απομόνωση βακτηριακών στελεχών από το ίδιο το απόβλητο φαίνεται να αποτελεί λύση για χρήση τους στην διαχείριση του αποβλήτου (Di Gioia et al., [2002](#)). Τα βακτήρια φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά έναντι φαινολικών μικρού μοριακού βάρους κι όχι τόσο σε πολυμερή (McNamara et al., [2008](#)).

Οι μύκητες θεωρούνται επίσης αποτελεσματικοί στην αποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Οι Hamdi et al. ([1992a](#)) στην προσπάθειά τους να βελτιώσουν την διήθηση του αποβλήτου και να διευκολύνουν τον διαχωρισμό του σε δυο φάσεις πρόσθεσαν τον μύκητα *Aspergillus niger*. Το ίδιο είδος μύκητα πρόσθεσαν και οι Cereti et al. ([2004](#)) μαζί με μια πηγή φωσφόρου και το οργανικό φορτίο μειώθηκε κατά 35-64%. Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* μείωσε κατά 80% το οργανικό φορτίο (Scioli & Vollaro, [1997](#)). Λιπολυτικές ζύμες του γένους *Candida* αναπτύχθηκαν σε μη αραιωμένο απόβλητο τριφασικού ελαιοτριβείου μειώνοντας σημαντικά τις τιμές του COD. Μετά την εξάντληση των εναλλακτικών πηγών άνθρακα, οι ζύμες αξιοποίησαν τις φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να τις αποδομήσουν (Gonçalves et al., [2009](#)). Οι Filidei et al. ([2003](#)), σύγκριναν τρεις διαφορετικούς μύκητες, δυο είδη των γενών *Geotrichum* και *Aspergillus* και το

Candida tropicalis και παρατήρησαν μείωση του COD κατά 55%, 52,5% και 62,8% και των φαινολικών κατά 46,6%, 44,3% και 51,7%, αντίστοιχα.

Εκτός από βακτήρια και μύκητες, δυο είδη άλγης (*Ankistrodesmus braunii*, *Scenedesmus quadricauda*) εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα αποτοξικοποίησης του αποβλήτου. Τελικά, δεν μείωσαν σημαντικά τα ολικά φαινολικά παρά μόνο το 50% εκείνων με μικρό μοριακό βάρος που μετέτρεψαν σε μη ανιχνεύσιμες αρωματικές ενώσεις (Pinto et al., 2003). Επιπλέον, φύκος του γένους *Scenedesmus* sp. αναπτύχθηκε σε διάλυμα με περιεκτικότητα σε υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων 9% (μη αποστειρωμένο) και ανόργανα θρεπτικά που οδήγησε σε αποδόμηση των φαινολικών (Di Caprio et al., 2015).

Οι αερόβιες μέθοδοι έχουν συνδυαστεί κι αυτές με διαδικασίες οξειδωσης. Φαίνεται πως με την οξειδωση μειώνονται οι αρωματικές ενώσεις ενώ οι μικροοργανισμοί αποδομούν την οργανική ύλη. Έτσι, ο συνδυασμός οξονοποίησης και αερόβιας επεξεργασίας υπερτερούσε σε σχέση με την εφαρμογή των μεθόδων ξεχωριστά (Benitez et al., 1999). Σε δυο μελέτες, εφάρμοσαν οξειδωση Fenton και στη συνέχεια αερόβια επεξεργασία με υψηλά ποσοστά μείωσης οργανικών και φαινολικών ενώσεων (Bressan et al., 2004; Beltran-Heredia et al., 2001). Ενθαρρυντικά ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης των Lafi et al. (2009), με συνδυασμό O₃/UV και αερόβιας αποδόμησης.

1.3.3.2.1 Κομποστοποίηση

Ως αερόβια μέθοδος επεξεργασίας περιγράφεται και η κομποστοποίηση με σκοπό την μετατροπή του αποβλήτου σε εδαφοβελτιωτικό με χρονική διάρκεια κάποιων εβδομάδων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως τελικά στο έδαφος εμπλουτίζεται με θρεπτικά συστατικά που περιείχε το απόβλητο, αλλά όχι και με εκείνα που προκαλούν φαινόμενα τοξικότητας (Roig et al., 2006). Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή κόμποστ από απόβλητα ελαιοτριβείου είναι ενθαρρυντικά καθώς δεν παρατηρούνται διαφορές στην παραγωγή και τις αναλύσεις των φυτών σε σχέση με τα ανόργανα λιπάσματα (Cegarra et al., 1996), βελτιώνεται η σχέση έδαφους-φυτού και μειώνεται το κόστος της καλλιέργειας (Tomati et al., 1996). Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η προσέκλυση έντομων, παραγωγή δυσάρεστων οσμών και η απορροή ρυπασμένου νερού (Morriilo et al., 2009).

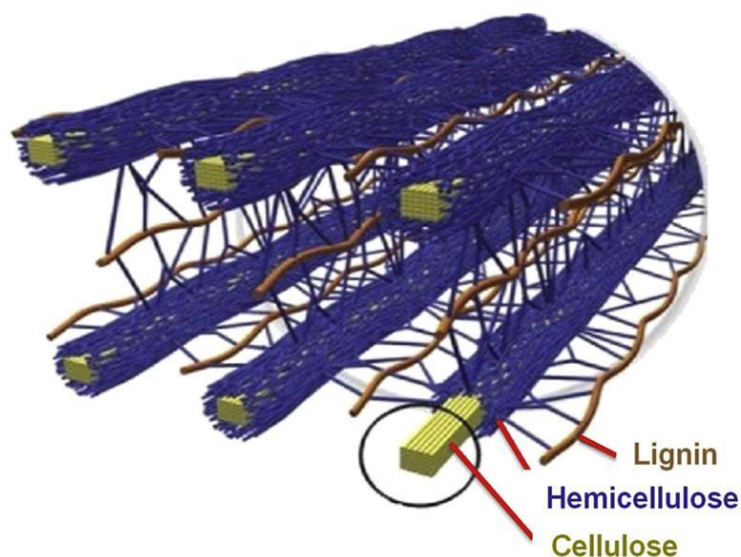
Για την κομποστοποίηση του συγκεκριμένου αποβλήτου γίνεται συνδυασμός και με άλλα αγροτικά υπολείμματα για θρεπτική ισορροπία (Morriilo et al., [2009](#)). Η ανάμιξη τόσο της στερεής όσο και της υγρής φάσης του αποβλήτου με άχυρο σίτου και κομποστοποίηση οδήγησε σε απομάκρυνση της φυτοτοξικότητας (Tomati et al., [1995](#)). Με τον ίδιο συνδυασμό, η λιγνίνη και οι φαινολικές ενώσεις αποδομήθηκαν έως 70% (Galli et al., [1997](#)). Η συν-κομποστοποίηση με άχυρο σικάλεως, για δυο μήνες, μείωσε τα φαινολικά συστατικά κατά 95% και κατ' επέκταση την τοξικότητα (Zenjari et al., [2006](#)). Μετά την κομποστοποίηση της στερεάς φάσης του αποβλήτου με άχυρο σίτου σε σειράδια, οι αναλύσεις έδειξαν πως το τελικό προϊόν αποτελείται από ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, με σταθερή οργανική ύλη και απουσία βαρέων μετάλλων (Madejon et al., [1998](#)). Σε άλλες δοκιμές, υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου αναμίχθηκε με απόβλητα πλούσια σε N όπως με κοπριά πουλερικών, λυματολάσπη ή υποπροϊόντα από τη χυμοποίηση πορτοκαλιών και στη συνέχεια προστέθηκαν είτε σε απόβλητα εκκοκισμού βάμβακος (Paredes et al., [2000](#); Paredes et al., [2001](#); Paredes et al., [2002](#)) είτε σε άχυρο αραβοσίτου (Paredes et al., [2000](#); Paredes et al. [2002](#)). Στις περιπτώσεις που προστέθηκε και απόβλητο ελαιουργείων σημειώθηκε περισσότερη οργανική ύλη, υψηλότερη αγωγιμότητα και νιτροποίηση αλλά και φαινόμενα φυτοτοξικότητας (Paredes et al. [2001](#)). Η φυτοτοξικότητα σ' αυτή την περίπτωση φαίνεται να καθυστερεί την βλάστηση των σπόρων αλλά όχι να την αναστέλλει (Paredes et al., [2000](#)).

Η κομποστοποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε υπολείμματα αποβλήτου που έχουν υποστεί ήδη επεξεργασία. Οι Abid et al. ([2007](#)), κομποστοποίησαν τα υπολείμματα από ηλεκτρο-οξειδωση με αντιδραστήριο Fenton. Σε αναλογία 60% υπολειμμάτων από την εξάτμιση και 40% κοπριά πουλερικών για 210 ημέρες, οι φαινολικές ενώσεις και τα λιπίδια μειώθηκαν και ο δείκτης βλαστικότητας ήταν 87,71% (Hachicha et al., [2009](#)). Επιπλέον, δυο διαφορετικά υπολείμματα από την εξαγωγή του ελαιολάδου, όπως ο πυρήνας και το υγρό απόβλητο μπορούν να συνδυαστούν για παραγωγή κόμποστ (Filipi et al., [2002](#)).

Εκτός από αγροτικά υπολείμματα, ως παράγοντες συν-κομποστοποίησης χρησιμοποιούνται και βιομηχανικά απόβλητα (Vlyssides et al., [1999](#)). Οι Sánchez-Agias et al. ([2008](#)), αξιολόγησαν την συμβολή όξινων αποβλήτων θειικού σιδήρου σε μίγμα λυματολάσπης και αποβλήτου ελαιοτριβείου. Ιδανική θεωρήθηκε η προσθήκη κατά την θερμόφιλη φάση, όπου σταθεροποίησε συντομότερα το κόμποστ και το τελικό προϊόν ήταν πλούσιο σε Fe και S.

1.3.3.2 Μύκητες Λευκής Σήψης

Για τη σωστή κατανόηση της σημασίας των μυκήτων λευκής σήψης και των λιγνολυτικών τους ενζύμων στη φύση θα πρέπει να περιγραφεί η δομή της λιγνίνης και τα χαρακτηριστικά της. Η σύνθεσή της γίνεται από τους φυτικούς οργανισμούς και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο βιο-πολυμερές μετά την κυτταρίνη στη φύση (Boerjan et al., [2003](#)). Βρίσκεται στα φυτά σε ποσοστά από 15-40% και μαζί με άλλους δυο πολυσακχαρίτες, τη κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, αποτελούν το ξύλο του οποίου ο ουσιαστικός τους ρόλος είναι η στήριξη (Ghaffar & Fan, [2013](#)). Συγκεκριμένα, η λιγνίνη συμβάλει στη στήριξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, στην μεταφορά νερού και θρεπτικών διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και στην αδιαβροχοποίηση των κυττάρων (Boerjan et al., [2003](#)). Το ξύλο αποτελείται από αυτά τα τρία συστατικά που δομικά «μπλέκονται» μεταξύ τους (Ghaffar & Fan, [2013](#)) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Η κυτταρίνη περιβάλεται από την ημικυτταρίνη και μεταξύ των δομών αυτών σχηματίζεται η λιγνίνη. (Ghaffar & Fan, [2013](#))

Δομικά πρόκειται για ένα σύνθετο πολυμερές τρισδιάστατο μόριο που αποτελείται από τρία φαινυλοπροπανοειδή μονομερή, τη p-υδροξυφαινόλη (p-hydroxyphenyl), την γουαϊακόλη (guaiacyl alcohol) και συρινγκλική αλκοόλη (syringyl alcohol). Ο σχηματισμός της λιγνίνης δεν γίνεται, πάντα, με σταθερές αναλογίες των παραπάνω μονομερών και αυτό εξαρτάται από το φυτικό είδος

(μονοκότυλα, δικότυλα, γυμνόσπερμα φυτά), τον φυτικό ιστό καθώς και το κυτταρικό οργανίδιο. Αρχικά, από τη φαινυλαλανίνη δημιουργούνται τα μονομερή, στη συνέχεια μέσω αποϋδρογόνωσης οι ελεύθερες ρίζες που θα τελικά θα αποτελέσουν τα σημεία πολυμερισμού (Boerjan et al., [2003](#)). Οι δεσμοί που σχηματίζονται είναι διαφόρων τύπων κι αυτός είναι ο λόγος που καθιστά την αποδόμηση της λιγνίνης δύσκολη (Ghaffar & Fan, [2013](#)). Επίσης, φυτικοί ιστοί με λιγνίνη αποδομούνται δύσκολα λόγω της απουσίας υδρολυόμενων δεσμών μεταξύ των μονομερών που την απαρτίζουν (Martirani et al., [1996](#)).

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των μυκήτων λευκής σήψης είναι η ικανότητα να αποδομούν την λιγνίνη. Αν και δεν αποτελεί ταξινομικό γνώρισμα τα περισσότερα είδη ανήκουν στους βασιδιομύκητες (Pointing, [2001](#)). Το όνομά των μυκήτων οφείλεται στην όψη τους επί του ξύλου αφού έχουν αποδομήσει τη λιγνίνη (Pointing, [2001](#)). Χάρη στα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά τους ένζυμα, διασπάται η λιγνίνη του ξύλου και τροφοδοτείται ο κύκλος του άνθρακα (Maciel & Robeiro, [2010](#)). Επιπλέον, μέσα από αυτή τη διαδικασία γίνονται διαθέσιμοι, προς άλλους οργανισμούς, πολυσακχαρίτες δεσμευμένοι στη δομή της λιγνίνης (Pointing, [2001](#)).

Τα κυριότερα λιγνινολυτικά ένζυμα των μυκήτων λευκής σήψης είναι η λιγνίνη υπεροξειδάση (Lignin peroxidase - LiP), η εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση (Manganese peroxidase - MnP), η λακκάση (Laccase - Lac) και η «ευέλικτη» υπεροξειδάση (versatile peroxidase - VA) (Asgher et al., [2008](#)). Στόχος τις έκκρισης αυτών των ενζύμων είναι η διάσπαση σύνθετων πολυμερών και πρόσληψη από τους μύκητες σε απλούστερη μορφή (Maciel & Ribeiro, [2010](#); Wong, [2009](#)). Γι' αυτό το λόγο, τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών και κυρίως αζώτου (Pointing, [2001](#)).

Η **LiP** ανήκει στις οξειδοοξειδοκτάσες, παράγεται από είδη βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων και απαιτεί σχετικά χαμηλό pH (2-5). Περιέχει μια ομάδα αίμης και υψηλή οξειδοαναγωγική δράση που εξαρτάται από το H₂O₂. Δεν έχει απαιτήσεις ως προς το υπόστρωμα, αποδομεί ποικιλία ενώσεων κι όχι μόνο φαινολικές ομάδες (Maciel & Robeiro, [2010](#)). Δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων (π.χ. veratryl alcohol) δρουν ως αναγωγικοί μεσολαβητές στην ενεργοποίηση του LiP παρουσία H₂O₂ (Asgher et al., [2008](#); Pointing, [2001](#)). Συγκεκριμένα, οξειδώνει τη βερατρυλική αλκοόλη η οποία στη συνέχεια οξειδώνει μη φαινολικές αρωματικές ομάδες του μορίου της λιγνίνης παράγοντας ελεύθερες ρίζες αρυλίου (aryl cations). Οι τελευταίες καταλύουν διάφορες αντιδράσεις όπως οξειδώσεις βενζολικών αλκοολών, διασπάσεις

απλών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα, υδροξυλίωσης, διμερισμού ή πολυμερισμού φαινολών και απομεθυλίωσης (Pointing, [2001](#)). Οι ιδανικές συνθήκες για την οξειδωτική δραστηριότητα της βερατρυλικής αλκοόλης είναι σε pH=2,5 οι 25°C ενώ σε χαμηλότερες τιμές pH απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία (Tuisel et al., [1990](#)).

Η **MnP** είναι επίσης οξυδορεδουκτάση που οξειδώνει το Mn^{+2} σε Mn^{+3} παρουσία H_2O_2 (Pointing, [2001](#)). Το Mn^{+3} , με τη σειρά του, συνδέεται με το οξαλικό ή άλλο οξύ και μετατρέπει τις φαινολικές δομές σε φαινόξυ ρίζες (Maciel & Robeiro, [2010](#)). Όπως και το προηγούμενο, περιέχει μια ομάδα αίμης. Ως ένζυμο έχει ταυτοποιηθεί σε περισσότερα είδη μυκήτων από το LiP, αλλά έχει μικρότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Maciel & Robeiro, [2010](#)). Η οξείδωση του Mn^{+2} γίνεται και απουσία H_2O_2 με την αξιοποίηση ριζών $-OH^{\cdot}$ από άλλα οξέα (Wong, [2009](#)). Συνεπάγεται ότι η παρουσία Mn^{2+} είναι απαραίτητη για τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου και η κατάλληλη οξύτητα είναι pH=4,5 (Kuwahara et al., [1984](#)). Στη μελέτη των Périé & Gold ([1991](#)), η προσθήκη $MnSO_4$ ευνόησε την ενεργότητά του σε καλλιέργειες *Dichomitus squalens*. Έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες και η ανεξάρτητη του Mn υπεροξειδάση (Mn Independent Peroxidase - MnIP) (Pointing, [2001](#)).

Οι **λακκάσες (Lac)**, δομικά είναι πρωτεΐνες που περιέχουν άτομα χαλκού (Cu) και καταλύουν την οξείδωση των φαινολικών μειώνοντας το οξυγόνο στο νερό. Ο τρόπος δράσης τους βασίζεται στη δημιουργία ελευθέρων ριζών σε μεσολαβητές (mediators) όπως είναι το ABTS (Pointing, [2001](#)). Με την οξείδωση των αρωματικών δημιουργούνται φαινόξυ- ρίζες που είτε πολυμερίζονται είτε γίνεται μια p-υποκατάσταση. Αυτή η αξιοποίηση του οξυγόνου για κατάλυση της λιγνίνης τις καθιστά κατάλληλες για βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις και διαχείριση ξενοβιοτικών ουσιών (Baldrian, [2006](#)). Παράγονται από όλους τους μύκητες λευκής σήψης (Wong, [2009](#)) αλλά και από κάποια είδη φυτών, εντόμων και βακτηρίων (Maciel & Robeiro, [2010](#)). Σε πείραμα με το είδος *Trametes trogii* η ενεργότητα της λακκάσης ήταν μέγιστη σε θερμοκρασία 50°C και pH=3,4 αλλά σταθερή για 5 ημέρες σε 30°C και pH=4,4 (Levin et al., [2002](#)). Σε παρόμοιες τιμές pH σταθεροποιήθηκε η δράση του και σε καλλιέργειες *P. eryngii* (Munoz et al., [1997](#)). Σύμφωνα με άλλη μελέτη, η λακκάση είναι κατά πολύ δραστικότερη σε αλκαλικά pH και ιδανικές θερμοκρασίες από 45 έως 65°C (Baldrian, [2004](#)). Γενικά, το συγκεκριμένο ένζυμο δρα κάτω από μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (5-80°C) αλλά ιδανικοί θεωρούνται οι 45°C ενώ σε χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες η ενεργότητά του είναι μειωμένη (Haritash & Kaushik, [2009](#)).

Η **VP** όταν αρχικά απομονώθηκε χαρακτηρίστηκε ως MnP καθώς οξειδώνει δισθενή ιόντα μαγγανίου (Mn^{2+}). Από την άλλη, λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού και της μη εξάρτησης από την παρουσία Mn^{+2} παρομοιάστηκε και με LiP. Αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα και θεωρείται ένα υβρίδιο των δυο παραπάνω ενζύμων (Maciel & Ribeiro, [2010](#); Wong, [2009](#)).

Η δράση αυτών των ενζύμων, όπως φαίνεται και παραπάνω, δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τις ενώσεις του υποστρώματος. Έτσι χρησιμοποιούνται, είτε μέσω της καλλιέργειας των μυκήτων είτε απομονωμένα, σε περιπτώσεις επιβαρυσμένων βιομηχανικών αποβλήτων με ξενοβιοτικές ενώσεις (φυτοπροστατευτικά προϊόντα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, χρωστικές, συντηρητικά ξύλου κ.α) (Haritash & Kaushik, [2009](#); Forgacs et al., [2004](#); Gianfreda & Rao, [2004](#); Pointing, [2001](#)). Επιπλέον, το χαρακτηριστικό αυτό, τους επιτρέπει να μπορούν να διασπών διάφορους ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους με δομικές ομοιότητες ως προς τη λιγνίνη, όπως είναι και οι φαινολικές ενώσεις των αποβλήτων των ελαιοτριβείων (Hatakka, [1994](#)).

Η παραγωγή των παραπάνω ενζύμων από τους μύκητες θεωρείται ότι ευνοείται από διάφορες παραμέτρους. Ένα παράδειγμα είναι η προσθήκη αζώτου στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Από πέντε στελέχη μυκήτων λευκής σήψης, στα τέσσερα η επάρκεια αζώτου ευνόησε την ενζυμική δραστηριότητα και μόνο στο είδος *Ph. chrysosporium* συνέβη το αντίθετο (Kaal et al., [1995](#)). Για το είδος *Ph. chrysosporium* υπόστρωμα φτωχό σε άνθρακα και άζωτο επισπεύδει την σύνθεση MnP και LiP (Singh & Chen, [2008](#)). Σε άλλη μελέτη (Robinson et al., [2001](#)), η επάρκεια N ευνόησε την παραγωγή Lac σε σχέση με την απουσία αλλά όχι την MnP και LiP στον ίδιο βαθμό, ούτε, τελικά, τον αποχρωματισμό τεχνητών χρωμάτων. Επίσης φαίνεται πως το άζωτο οργανικής προέλευσης ευνοεί την έκκριση ενζύμων καλύτερα από τις ανόργανες μορφές (Mikiashvili et al., [2005](#), [2006](#)). Αν και θα πρέπει να σημειωθεί η υπόθεση ότι η επάρκεια αζώτου δεν ευνοεί άμεσα τα λιγνολυτικά ένζυμα αλλά έμμεσα μέσω της ανάπτυξης μεγαλύτερης βιομάζας του μύκητα (Mikiashvili et al., [2006](#)). Επίσης, η παρουσία άνθρακα (ξυλάνη, γλυκόζη, κελοβιόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη) στο υπόστρωμα επιδρά, θετικά, στην παραγωγή ενζύμων (Mikiashvili et al., [2005](#), [2006](#)).

Την ενεργότητα των λιγνολυτικών ενζύμων μπορεί να επηρεάσει και η παρουσία μετάλλων όπως του χαλκού (Cu). Οι Levin et al. ([2002](#)), πρόσθεσαν $CuSO_4$ σε διάφορες συγκεντρώσεις και διαπίστωσαν πως ευνοήθηκε η έκκριση των ενζύμων

από το είδος *T. trogii*. Επιπλέον, για το είδος *Daedalea quercina* η προσθήκη Cu^{2+} ευνόησε την δράση της λακκάσης (Baldrian, [2004](#)). Γενικότερα, το ένζυμο MnP απαιτεί την παρουσία Mn^{2+} στο υπόστρωμα, διαφορετικά αναστέλλεται η παραγωγή του. Αντίθετα, η LiP (Singh & Chen, [2008](#)) και η λακκάση (Baldrian, [2004](#)), παρεμποδίζονται από την παρουσία Mn^{2+} και εκκρίνονται κυρίως σε συνθήκες έλλειψης του.

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες καλλιεργούνται οι μύκητες λευκής σήψης επηρεάζουν και την ενεργότητα των λιγνολυτικών τους ενζύμων. Εκτός από τη θερμοκρασία, που αναφέρθηκε συγκεκριμένα σε κάποια ένζυμα, σημαντική παράμετρος είναι και η ανακίνηση των υγρών καλλιεργειών. Η ανακίνηση, γενικά, ευνοεί την ανάπτυξη του μυκηλίου αλλά ο έντονος ρυθμός δρα ανασταλτικά. Ο κυριότερος λόγος που συμβαίνει αυτό είναι πως με την έντονη ανακίνηση το διαλυμένο οξυγόνο στο υγρό μέσο ανάπτυξης δυσχεραίνει τη διαδικασία λόγω οξειδωτικών φαινομένων (Singh & Chen, [2008](#)).

Σε μια προσπάθεια αξιολόγησης 46 στελεχών μυκήτων λευκής σήψης, ως προς την ικανότητα ανάπτυξης σε υγρό απόβλητο, τα 13 από αυτά ήταν ικανά. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *Pycnoporus coccineus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Coriolopsis polyzona* και *Lentinus tigrinus* αποχρωμάτιζαν και μείωσαν το COD, με αποτελεσματικότερα τα δυο πρώτα (Jaouani et al., [2003](#)). Οι Koutrotsios & Zervakis ([2014](#)), αξιολόγησαν 43 διαφορετικά είδη ξυλοσηπτικών μυκήτων ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε απόβλητα ελαιοτριβείων. Από αυτά, το είδος *Abortiporus biennis* μείωσε σε μεγαλύτερο βαθμό το φαινολικό φορτίο (92%) και το χρώμα (64%) και ακολουθούν τα *Pleurotus djamor* και *Irpex lacteus*. Σε υγρό απόβλητο τριφασικού ελαιοτριβείου αναπτύχθηκαν 38 είδη μυκήτων λευκής σήψης και η μείωση των φαινολικών ενώσεων ήταν μεγαλύτερη του 60% και το ποσοστό του αποχρωματισμού έφτασε το 70% (Ntougias et al., [2015](#)).

Στην ίδια κατηγορία μυκήτων, έντονο ενδιαφέρον έχει η χρήση του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*. Σε σύγκριση με δυο είδη του γένους *Aspergillus* ήταν καλύτερος όσο αναφορά την απομάκρυνση των φαινολών (Garcia et al., [2000](#)). Σε άλλη μελέτη, μείωσε το χρώμα και τις φαινολικές ουσίες πάνω από 50%, σε 6 και 9 ημέρες, σε διάλυμα αποβλήτου 20% και 50%, αντίστοιχα, όταν το *Pleurotus ostreatus* απαιτούσε 12 μέρες (Kissi et al., [2001](#)). Οι Ahmadi et al. ([2006](#)), με το ίδιο είδος, σε αραιωμένο και εμπλουτισμένο απόβλητο ελαιοτριβείου, κατέγραψαν 90% μείωση φαινολικών ενώσεων, 50% του COD και έως 60% αποχρωματισμό. Σε

πείραμα αγρού, ενσωματώθηκαν στο έδαφος απόβλητο ελαιοτριβείου (dry olive cake), πηγή φωσφόρου (P) και ενδομυκορριζικός μύκητας καθώς και τα είδη *Ph. chrysosporium* ή *Aspergillus niger*. Τα φυτά είχαν μεγαλύτερη βιομάζα, περισσότερο P, μεγαλύτερο αριθμό φυματίων και καλύτερο εποικισμό από την ενδόμυκορριζα στην περίπτωση του *Ph. chrysosporium* υποδεικνύοντας πως αποτοξικοποίησε το απόβλητο έναντι του άλλου είδους (Medina et al., [2010](#)).

Ένα άλλο είδος μακρομύκητα, συγκεκριμένα το *Hericium erinaceus*, σε διαλύματα τριφασικού αποβλήτου σε διάφορες αναλογίες, συντέλεσε στην μείωση των φαινολικών κατά 47%, του χρώματος κατά 65% και της φυτοτοξικότητας κατά 52% (Koutrotsios et al., [2016](#)).

Εκτός του βαθμού αραίωσης, διάφοροι παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καλλιέργεια των μυκήτων με σκοπό την αποτοξικοποίηση Υ.Α.Ε. Για παράδειγμα, ο αερισμός με μορφή φυσαλίδων στην υγρή καλλιέργεια βοήθησε περισσότερο από την απλή ανακίνηση, το είδος *Panus tigrinus* στην μείωση του COD, των φαινολικών και της έντασης του χρώματος (D' Annibale et al., [2006](#)). Ο αερισμός και η αραίωση του αποβλήτου ευνόησε και την ανάπτυξη της βιομάζας του είδους *Geotrichum candidum* και κατ' επέκταση τη διάσπαση των πολυφαινολών και τον αποχρωματισμό (Assas et al., [2000](#)). Επίσης, οι Duarte et al ([2012](#)), εφάρμοσαν μια μέθοδο τριών σταδίων όπου αρχικά έγινε προσρόφηση, στη συνέχεια επεξεργασία είτε με το είδος *Pleurotus sajor-caju* είτε με το *Trametes versicolor* (αποτελεσματικότερο) και τελικά διάχυση των αποδομημένων ενώσεων.

Μια προσέγγιση είναι η καλλιέργεια και παραγωγή εδώδιμων μανιταριών σε υπόστρωμα όπου περιέχεται το απόβλητο. Οι Sanjust et al. ([1991](#)), ήταν από τους πρώτους που καλλιέργησαν τέσσερα είδη του γένους *Pleurotus* sp. σε υπόστρωμα που περιείχε περλίτη και υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων. Η ανάπτυξη καρποφοριών και η παραγωγή ήταν ικανοποιητική και συνοδεύτηκε από υψηλή παραγωγή λακκάσης. Η υγρή χρωματογραφία καθώς και η δοκιμή σε ανθρώπινα κύτταρα υπέδειξαν μείωση των φαινολικών και άλλων τοξικών συστατικών. Επίσης σε είδη του ίδιου γένους (*Pleurotus sajor-caju*, *P. citrinopileatus*) η προσθήκη διαλύματος αποβλήτου με περιεκτικότητα 25% έδωσε την καλύτερη παραγωγή μανιταριών (Kalmış & Sargin, [2004](#)). Οι Zervakis et al. ([1996](#)), καλλιέργησαν τα είδη *Pleurotus eryngii* και *P. pulmonarius* χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τα στερεά παραπροϊόντα τριφασικού ελαιοτριβείου (olive press-cake) με προσθήκη διαλυμάτων της υγρής φάσης. Όταν η αναλογία ήταν 25% απόβλητο η παραγωγή μανιταριών ήταν

ικανοποιητική και, όπως διαπιστώθηκε από τις δοκιμές σε σπόρους μαρουλιού, είχε μειωθεί σημαντικά και η φυτοτοξικότητα.

Τα εξωκυτταρικά ένζυμα των παραπάνω μυκήτων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αλλά και στην διαδικασία αποτοξικοποίησης του αποβλήτου. Η δραστικότητα της λακκάσης από το είδος *Lentinula edodes* οδήγησε σε αποχρωματισμό και μείωση των πολυφαινολών κατά 90% (D' Annibale et al., [1999](#)). Οι Tsioulpas et al. ([2002](#)), παρατήρησαν πως η παραγωγή λακκάσης από είδη του γένους *Pleurotus* ήταν ανάλογη της μείωσης των φαινολικών ενώσεων. Παρόλα αυτά, η μειωμένη φυτοτοξικότητα του αποβλήτου δεν ήταν ανάλογη της παραπάνω μείωσης. Σε αποξηραμένα απόβλητα ελαιοτριβείων, δυο είδη μυκήτων λευκής σήψης (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Coriolopsis rigida*) παράγαγαν λακκάση η οποία σχετίστηκε με την απομάκρυνση του φαινολικού φορτίου κατά 73%, της μείωσης της φυτοτοξικότητας και την αύξηση του ξηρού βάρους φυτών τομάτας στην τελική αξιολόγηση του αποβλήτου (Aranda et al., [2006](#)). Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις, επιλέγεται η απευθείας χρήση των ενζύμων. Οι Casa et al. ([2003](#)), χρησιμοποίησαν το ένζυμο λακκάση, απομονωμένο από μύκητες, και μείωσαν το ολικό φαινολικό φορτίο κατά 65%. Στη συνέχεια, με εφαρμογή επεξεργασμένου αποβλήτου σε σπόρους σίτου ο δείκτης βλαστικότητας ήταν μεγαλύτερος και η έκπτυξη των φυτών γρηγορότερη από ότι με το αρχικό απόβλητο.

Οι Jaouani et al. ([2006](#)), χρησιμοποίησαν το είδος *Coriolopsis polyzona* και στα διαλύματα του αποβλήτου πρόσθεσαν βερατριλική αλκοόλη (veratryl alcohol - VA) για επαγωγή των ενζύμων. Με 5mM VA παράχθηκε λιγνίνη υπεροξειδάση (LiP) και με 10 mM λακκάση (laccase) και υπεροξειδάση εξαρτώμενη του Mn (MnIP). Η λακκάση είχε αρνητικό αντίκτυπο στον αποχρωματισμό καθώς ευνοούσε τον σχηματισμό πολυμερών αρωματικών ενώσεων. Η παραγωγή λακκάσης, Mn-υπεροξειδάσης και υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του Mn (MnIP) σχετιζόταν με τη ελάττωση των φαινολικών ενώσεων, τον αποχρωματισμό και την αύξηση του δείκτη βλαστικότητας για τα είδη *H. erinaceus*, *Ph. chrysosporium*, *Pleurotus*, *A. biennis* και *I. lacteus* (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)).

1.3.3.3 Συνδυασμοί Αερόβιας και Αναερόβιας Επεξεργασίας

Υπάρχουν και περιπτώσεις συνδυασμού αερόβιας και αναερόβιας επεξεργασίας με τη μια από τις δύο να έχει το ρόλο της προετοιμασίας του αποβλήτου. Αρχικά οι Hamdi et al. (1992b) επεξεργάστηκαν διαδοχικά το απόβλητο σε αερόβια καλλιέργεια με *Aspergillus niger*, μετά σε αναερόβια και τέλος πάλι αερόβια με λυματολάσπη. Η τελική μείωση της οργανικής ουσίας έφτασε το 90% αλλά χωρίς να καταγραφεί σημαντική μεταβολή του χρώματος. Λόγω της παραμονής αρωματικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους μετά την αναερόβια διαδικασία, δοκιμάστηκε αερόβια επεξεργασία με μίγμα βακτηρίων (*Ralstonia* sp., *Pseudomonas putida*) που αποτοξικοποίησαν περαιτέρω το απόβλητο (Bertin et al., 2001). Προεπεξεργασία με αερόβια μέθοδο για δυο μήνες πριν την αναερόβια συντέλεσε κατά 25% στην τελική αποτοξικοποίηση (Bertin et al., 2006). Στη μελέτη των (Dhouib et al., 2006b), προηγήθηκε μια σύντομη αερόβια μέθοδος, η οποία ακολουθήθηκε από έξι μήνες αναερόβιας και τελικά υπερ-διήθησης. Κατά το στάδιο της αναερόβιας επεξεργασίας σημειώθηκε μείωση της τοξικότητας κατά 36% και με την υπερ-διήθηση απομακρύνθηκαν οι πολυφαινόλες. Το τελικό τεστ φυτοτοξικότητας σε σπόρους τομάτας υπέδειξε μεγαλύτερο δείκτη βλαστικότητας και ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο αλλά και τον μάρτυρα (νερό).

Οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν να εφαρμοστούν και στο στάδιο της προεπεξεργασίας πριν την αναερόβια μέθοδο. Έτσι, το είδος *Phanerochaete chrysosporium* αναπτύχθηκε για μόλις 2-5 μέρες, πριν την κύρια αναερόβια επεξεργασία, και η τοξικότητα μειώθηκε έως 26% (Dhouib et al., 2006a). Παρόμοια, είτε το είδος *Phanerochaete chrysosporium* είτε το *Trametes versicolor* μείωσαν το οργανικό φορτίο και την τοξικότητα του αποβλήτου πριν την αναερόβια διαδικασία (Dhouib et al., 2006b).

Μια άλλη προσέγγιση είναι η ανάμιξη με αστικά λύματα όπου αρχικά επεξεργάζονται αναερόβια και μετά αερόβια. Κατά την αναερόβια μέθοδο η παραγωγή CH₄ ήταν 3-4L/gCOD και η συγκέντρωση του COD μειώθηκε από 1800-4800mg/L σε 400-600mg/L με και τελικά στην αερόβια σε 85-175 mg/L (Gizgis et al., 2005).

2 Στόχος της Εργασίας

Πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της επίδρασης του λιγνολυτικού μύκητα *Abortiporus biennis* σε βασικές ρυπαντικές παραμέτρους των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (δηλ. συγκέντρωση ολικών φαινολικών, χρώμα και φυτοτοξικότητα) και στην παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων μέσω της ανάπτυξης του σε σχετικά μέσα καλλιέργειας (αποστειρωμένα διαλύματα 25% v/v υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων εμπλουτισμένα ή μη με πηγές αζώτου, χαλκού και μαγγανίου σε διάφορες συγκεντρώσεις).

Δεύτερος στόχος ήταν η αξιολόγηση των παραπάνω υγρών μέσων καλλιέργειας του μύκητα ως προς τη μείωση του φαινολικού φορτίου και της έντασης του χρώματος σε μη αποστειρωμένο διάλυμα 25% v/v υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων μετά από επώαση επί 4, 24 ή 48 ώρες, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα τους (χωρίς την παρουσία του μύκητα) στη συγκεκριμένη διαδικασία αποτοξικοποίησης.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βιολογικό Υλικό

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο βασιδιομύκητας *Abortiporus biennis* (στέλεχος ABL436) από τη συλλογή μυκητιακών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Καλλιεργήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C.

3.2 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Agar – PDA

Σε κωνική φιάλη με 1L απιονισμένο νερό προστέθηκαν 39g σκόνης PDA και τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη εστία με συνεχή ανάδευση. Όταν προέκυψε ένα ομοιογενές μίγμα μοιράστηκε σε φιάλες με βιδωτό πώμα (500mL) και αποστειρώθηκε για 20 λεπτά στους 121°C και πίεση 1,1 atm.

3.3 Υγρό Απόβλητο Ελαιοτριβείου

Υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου από τριφασικό σύστημα διαχωρισμού προήλθε από το χωριό Καθενοί, του δήμου Διρφύων - Μεσσαπίων του νομού Ευβοίας και αποθηκεύτηκε στους 4° C.

Κατά την προετοιμασία του για να αποτελέσει υγρό μέσω καλλιέργειας του μύκητα αρχικά διηθήθηκε με χρήση φίλτρου για τη συγκράτηση των μεγάλων στερεών σωμάτων. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH με τη βοήθεια πεχαμέτρου και διαλύματος CaO 1 M, ώστε η τελική του τιμή να είναι 6. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 5000 g και διατήρηση του υγρού υπερκείμενου. Το

υγρό αυτό αραιώθηκε με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3 ώστε η τελική περιεκτικότητα σε Υ.Α.Ε. να είναι 25% v/v.

Ακολούθησε η προσθήκη NH_4NO_3 , CuSO_4 και MnSO_4 ώστε το μέσο καλλιέργειας να εμπλουτιστεί σε άζωτο (N), χαλκό (Cu) και μαγγάνιο (Mn), αντίστοιχα. Επίσης διατηρήθηκε διάλυμα χωρίς την προσθήκη των παραπάνω ενώσεων που αποτέλεσε τον μάρτυρα. Το υπόλοιπο χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη ίσου όγκου όπου στο πρώτο δεν προστέθηκε καθόλου πηγή αζώτου και στα υπόλοιπα τρία ποσότητες που να αντιστοιχούν σε 0,2, 0,8 και 3,2 g/L αζώτου. Στη συνέχεια, το κάθε διάλυμα από τα παραπάνω τέσσερα, χωρίστηκε στα τρία ώστε να προστεθούν τα συν-ένζυμα. Στο πρώτο μέρος δεν έγινε καθόλου προσθήκη μετάλλων και στα υπόλοιπα δυο μέρη ποσότητες που αντιστοιχούσαν σε 4 και 16 mg/L μαγγανίου και χαλκού. Έτσι προέκυψαν διαλύματα που θα αποτελούσαν το μέσο ανάπτυξης του μύκητα και τοποθετήθηκαν σε φιάλες των 250 mL με βιδωτό πώμα και αποστειρώθηκαν για 40 λεπτά στους 121°C και πίεση 1,1 atm. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός της κάθε φιάλης (εκτός του μάρτυρα) με μύκητα από τις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο PDA (βλ. 5.1 Βιολογικό Υλικό).

3.4 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού φορτίου του αποβλήτου

Η μέθοδος Folin-Ciocaltau βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον με μείγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέως (Singleton & Rossi, [1965](#))

Υλικά:

- Απιονισμένο νερό
- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocaltau (Merck)
- Διάλυμα 20% w/v Na_2CO_3
- Συριγγικό οξύ (Alfa Aesar)
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Eppendorf tubes (2mL)
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)

Διαδικασία:

Αρχικά έγινε προσθήκη 790μL απιονοσμένου νερού σε φιαλίδιο erpendorf και 800μL για το δείγμα αναφοράς. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10μL δείγματος βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου και 50μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocaltau και ακολούθησε ανάδευση. Μετά από 1 λεπτό, προστέθηκαν 150μL διαλύματος 20% w/v Na₂CO₃ και αναδεύτηκε καλά το κάθε δείγμα. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 2 ώρες για την ανάπτυξη του χρώματος. Μετά το πέρας των 2 ωρών, πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση του κάθε δείγματος στα 750nm σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

Στο τέλος, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς με χρήση συριγγικού οξέως (0, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 μg συριγγικού οξέως/mL)

3.5 Εκτίμηση της μείωσης του χρώματος του αποβλήτου

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό ως δείγμα αναφοράς
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)

Διαδικασία:

Προσθήκη δείγματος από κάθε επέμβαση σε κυψελίδες με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας, φωτομέτρηση στα 525nm και καταγραφή της απορρόφησης.

3.6 Εκτίμηση της ενεργότητας των ενζύμων

3.6.1 Λακκάση

Ο υπολογισμός της ενεργότητας της λακκάσης βασίζεται στην οξείδωση του υποστρώματος ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) σύμφωνα με τη μέθοδο των Bourbonnais et al. (1990).

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Διάλυμα τρυγικού νατρίου 0,1 M (pH 4,5)
- Αντιδραστήριο ABTS (MP Biomedicals)

Διαδικασία:

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα τρυγικού νατρίου συγκεντρώσεως 0,1 M και ρυθμίστηκε το pH στο 4,5 με τη βοήθεια πεχαμέτρου. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα 1,5 M ABTS. Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 600μL διαλύματος τρυγικού νατρίου και 400μL βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου. Στο δείγμα αναφοράς το απόβλητο αντικαταστάθηκε με απιονισμένο νερό. Η έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 200μL ABTS. Με τη βοήθεια φωτόμετρου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 425nm για 2 min.

Τέλος, υπολογίστηκε η ενεργότητα της λακκάσης μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$\text{Laccase activity} = dA_{425\text{nm}} / dt (\text{min}) \times E (\text{L/mol}\cdot\text{cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{mL}) / V_{\text{sample}} (\text{mL})$$

$$\text{Όπου } E = 36 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$$

Η μονάδα μέτρησης της ενεργότητας των ενζύμων είναι το U, δηλαδή ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1μmol υποστρώματος / min.

3.6.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn (MnIP) και Mn-υπεροξειδάση (MnP)

Η ενεργότητα αυτών των ενζύμων υπολογίζεται με βάση τη μέθοδο των Ngo & Lenhoff (1980). Χρησιμοποιώντας το $MnSO_4$ ως υπόστρωμα, το Mn (II) οξειδώνεται σε Mn (III). Αρχικά εκτιμάται η παρέμβαση του υποστρώματος (background activity - AL) σε μίγμα αντίδρασης χωρίς $MnSO_4$ και H_2O_2 . Έπειτα η AP ενεργότητα (background activity + ενεργότητα MnP) σε μείγμα χωρίς $MnSO_4$. Τελικά εκτιμάται η AR ενεργότητα σε ένα πλήρες μίγμα με $MnSO_4$ και H_2O_2 .

3.6.2.1 Εκτίμηση της παρέμβασης του υποστρώματος (background activity) στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτώμενη του Mn και Mn-υπεροξειδάση

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Ηλεκτρικό οξύ για παρασκευή διαλύματος 0,1 M με pH 4,5 (Alfa Aesar)
- Γαλακτικό νάτριο (Sigma – Aldrich)
- Διάλυμα 25mM DMAB (3 - dimethylaminobenzoic acid) (Alfa Aesar)
- Διάλυμα 1mM MBTH (3 - methyl - 2 - benzothiazolinon - hydrazon - hydrochloride) (Alfa Aesar)

Διαδικασία:

Στην αρχή παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 0,1M ηλεκτρικού οξέως, 25mM DMAB και 11mM MBTH. Για την ρύθμιση του pH=4,5 στο διάλυμα 0.1M ηλεκτρικού οξέως, προστέθηκε γαλακτικό νάτριο. Σε κυψελίδα προσθέτουμε 500μL διαλύματος 0.1 M ηλεκτρικού οξέως, 100μL διαλύματος 25mM DMAB και 50μL διαλύματος 1mM MBTH. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 330μL

βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v. Έπειτα, στο φωτόμετρο μετρήθηκε η απορρόφηση στα 590nm για 2 min.

Ο υπολογισμός της παρεμβολής του υποστρώματος έγινε μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$\text{Background Activity} = dA_{590\text{nm}}/dt \text{ (min)} \times E \text{ (L/mol}\cdot\text{cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (mL)}/V_{\text{reaction}} \text{ (mL)}$$

Όπου $E = 32.9 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$

3.6.2.2 Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP)

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Ηλεκτρικό οξύ για παρασκευή διαλύματος 0,1 M με pH 4,5 (Alfa Aesar)
- Γαλακτικό νάτριο (Sigma – Aldrich)
- Διάλυμα 25mM DMAB (3 - dimethylaminobenzoic acid) (Alfa Aesar)
- Διάλυμα 1mM MBTH (3 - methyl - 2 - benzothiazolinon - hydrazon - hydrochloride) (Alfa Aesar)
- 10mM H₂O₂

Διαδικασία:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 25mM DMAB, 1mM MBTH, 10mM H₂O₂ και 0,1M ηλεκτρικού οξέως. Για το τελευταίο η ρύθμιση του pH=4,5 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη γαλακτικού νατρίου. Σε κυψελίδα προστέθηκαν 500μL διαλύματος 0.1M ηλεκτρικού οξέως, 100μL διαλύματος 25mM DMAB, 50μL διαλύματος 1mM MBTH και 330μL βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 5μL διαλύματος H₂O₂ 10mM. Στο φωτόμετρο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 590nm για 2 min.

Υπολογισμός της δραστηρότητας του ενζύμου MnIP έγινε μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$AP = MnP + \text{Background Activity} = dA_{590nm} / dt \text{ (min)} \times E \text{ (L/mol}\cdot\text{cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (mL)} / V_{\text{reaction}} \text{ (mL)}$$

$$\text{Όπου } E = 32.9 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$$

Στη συνέχεια, η MnIP υπολογίστηκε από το AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος ως εξής:

$$MnIP = AP - \text{Background Activity}$$

3.6.2.3 Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Mn – υπεροξειδάση (MnP)

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Ηλεκτρικό οξύ για παρασκευή διαλύματος 0,1 M με pH 4,5 (Alfa Aesar)
- Γαλακτικό νάτριο (Sigma – Aldrich)
- Διάλυμα 25mM DMAB (3 - dimethylaminobenzoic acid) (Alfa Aesar)
- Διάλυμα 1mM MBTH (3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride) (Alfa Aesar)
- 10mM H₂O₂ (Carlo Erba Reactifs – SDS)
- 20 mM MnSO₄

Διαδικασία:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 25mM DMAB, 1mM MBTH, 10mM H₂O₂, 20mM MnSO₄ και 0,1M ηλεκτρικού οξέως. Για το τελευταίο έγινε ρύθμιση του pH=4,5 με διάλυμα γαλακτικού νατρίου. Σε κυψελίδα τοποθετήθηκαν 500μL διαλύματος 0.1 M ηλεκτρικού οξέως, 100μL διαλύματος 25mM DMAB, 50μL διαλύματος 1mM MBTH, 330μL βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v και 5μL

διαλύματος 20mM MnSO₄. Η έναρξη της αντίδρασης σημειώθηκε με την προσθήκη 5μL διαλύματος H₂O₂ 10mM. Μέσω φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 590nm για 2 min.

Υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου MnP έγινε μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$AP = MnP + MnIP + \text{Background Activity} = dA_{590nm} / dt \text{ (min)} \times E \text{ (L/mol}\cdot\text{cm)} \times V_{\text{reaction}} \text{ (mL)} / V_{\text{reaction}} \text{ (mL)}$$

$$\text{Όπου } E = 32.9 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$$

Στη συνέχεια, η MnIP υπολογίζεται από το AR με αφαίρεση του AP ως εξής:

$$MnIP = AR - AP$$

3.6.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση (LiP)

Η μέτρηση της LiP βασίζεται στη μεταβολή της απορρόφησης του φωτός σε μήκος κύματος 310 nm λόγω της οξειδωσης της βερατρυλικής αλκοόλης (veratryl alcohol) σε βερατρυλική αλδεϋδη (veratryl aldehyde). Η παρακάτω μέθοδος βασίζεται σε εκείνη των Tien & Kirk ([1988](#)).

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης
- Διάλυμα 0,1 M τρυγικού νατρίου (pH=3)
- 54 mM H₂O₂ (Carlo Erba Reactifs – SDS)

Διαδικασία:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 20mM βερατρυλικής αλκοόλης, 10mM H₂O₂ και 0,1 M τρυγικού νατρίου. Για το τελευταίο έγινε ρύθμιση του pH=3 με διάλυμα γαλακτικού νατρίου. Σε κυψελίδα τοποθετήθηκαν 800μL διαλύματος 0,1 M

τρυγικού νατρίου, 400μL βιοεπεξεργασμένου δείγματος και 35mM διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης 20 mM. Η εκκίνηση της αντίδρασης σημειώθηκε με την προσθήκη 15μL διαλύματος H₂O₂ 54 mM. Μέσω φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 310 nm για 2 min.

Υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου LiP έγινε μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$\text{LiP}_{\text{activity}} = dA(310 \text{ nm}) / dt (\text{min}) \times E (\text{L/mol}\cdot\text{cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

όπου $E = 9300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3.6.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης (VAO)

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου 25% v/v από κάθε επέμβαση
- Απιονισμένο νερό
- Αυτόματη πιπέτα και ακρορύγχια
- Κυψελίδες φασματοφωτόμετρου
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2001 spectrophotometer)
- Διάλυμα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης
- Διάλυμα 0,1 M τρυγικού νατρίου (pH=3)

Διαδικασία:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 20mM βερατρυλικής αλκοόλης και 0,1 M τρυγικού νατρίου. Για το τελευταίο έγινε ρύθμιση του pH=3 με διάλυμα γαλακτικού νατρίου. Σε κυψελίδα τοποθετήθηκαν 800μL διαλύματος 0,1 M τρυγικού νατρίου και 400μL βιοεπεξεργασμένου δείγματος. Η εκκίνηση της αντίδρασης σημειώθηκε με την προσθήκη 35 μL διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης 20 mM. Μέσω φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 310 nm για 2 min.

Υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου VAOx έγινε μέσω του μαθηματικού τύπου:

$$\text{VAOx}_{\text{activity}} = dA(310 \text{ nm}) / dt (\text{min}) \times E (\text{L/mol}\cdot\text{cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

όπου $E = 9300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3.7 Μέτρηση Βιομάζας

Μετά το πέρας των 5 εβδομάδων και το τέλος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της βιομάζας του μύκητα που αναπτύχθηκε σε κάθε επέμβαση.

Υλικά:

- Διηθητικό χαρτί
- Βιοεπεξεργασμένα δείγματα υγρών αποβλήτων
- Ξηραντήριο
- Ζυγός ακριβείας

Διαδικασία:

Οι κατάλληλης διαμέτρου δίσκοι διηθητικού χαρτιού ξεράθηκαν για 12 ώρες σε ξηραντήριο και μετά ζυγίστηκαν. Με τη βοήθεια αντλίας κενού τα στερεά υλικά συγκρατήθηκαν στο διηθητικό χαρτί και η υγρή φάση συλλέχθηκε για επιπλέον μετρήσεις. Οι δίσκοι διηθητικού χαρτιού με τον μύκητα τοποθετήθηκαν στο ξηραντήριο για 48h στους 70°C (έως σταθερού βάρους). Τέλος ζυγίστηκε το συνολικό βάρος τους από όπου αφαιρέθηκε το βάρος του διηθητικού και του μάρτυρα.

3.8 Μέτρηση pH

Στο υλικό που συλλέχθηκε μετά τη μέτρηση της βιομάζας μετρήθηκε το pH με τη βοήθεια πεχαμέτρου για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

3.9 Μέτρηση Αγωγιμότητας

Αρχικά έγινε καλιμπράρισμα του οργάνου (J.P. Selecta CD-2005) με διάλυμα γνωστής αγωγιμότητας 1314 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για κάθε βιοεπεξεργασμένο δείγμα, με βύθιση του ηλεκτροδίου στο υγρό διάλυμα και καταγραφή των τιμών.

3.10 Μέτρηση του Δείκτη Βλαστικότητας

Υλικά:

- Δείγματα βιοεπεξεργασμένων υγρών αποβλήτων
- Σπόροι μαρουλιού
- Απιονισμένο νερό
- Διηθητικό χαρτί
- Τρυβλία
- Αυτόματη πιπέτα 1000 μL και αποστειρωμένα ακρορύγχια

Διαδικασία:

Σε τρυβλία petri, διαμέτρου 9cm, τοποθετήθηκαν τρεις (3) δίσκοι διηθητικού χαρτιού ανάλογης διαμέτρου και 3mL δείγματος ή απιονισμένου νερού για τον μάρτυρα. Στη συνέχεια, στην επιφάνεια κάθε τρυβλίου σκορπίστηκαν 20 σπόροι μαρουλιού. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25°C.

3.11 Πειραματική Διαδικασία

Το είδος *Abortiporus biennis* αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητά του να αποτοξικοποιεί το ΥΑΕ. Το αραιωμένο απόβλητο (25% v/v σε νερο) εμπλουτισμένο με πηγές αζώτου (N), χαλκού (Cu) και μαγγανίου (Mn) ανάλογα την επέμβαση (βλ. 5.3 «Υγρό Απόβλητο Ελαιοτριβείου» και [Πίνακα 2.1](#)) αποστειρώθηκε για 40 λεπτά στους 121°C και πίεση 1,1 atm. Ο εμπλουτισμός με N θεωρήθηκε απαραίτητος ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση του στην ανάπτυξη του μύκητα αλλά και την ενεργότητα

των ενζύμων. Η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων μετάλλων έγινε γιατί δρουν ως συνένζυμα ειδικά στη λακκάση και την εξαρτημένη του Mn υπεροξειδάση.

Οι καλλιέργειες του μύκητα τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενη τράπεζα με σταθερή θερμοκρασία 27°C και 100 στροφές/λεπτό. Κάθε 7 ημέρες για 5 εβδομάδες γινόταν μέτρηση της μεταβολής των φαινολικών συστατικών και του χρώματος καθώς και της ενεργότητας των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση εξαρτημένη του Mn και ανεξάρτητη του Mn. Μετά το πέρας των 5 εβδομάδων, μετρήθηκαν η βιομάζα του μύκητα, το pH, η αγωγιμότητα και η φυτοτοξικότητα (μέσω της αξιολόγησης του δείκτη βλαστικότητας σπόρων). (βλ. [Σχεδιάγραμμα1](#))

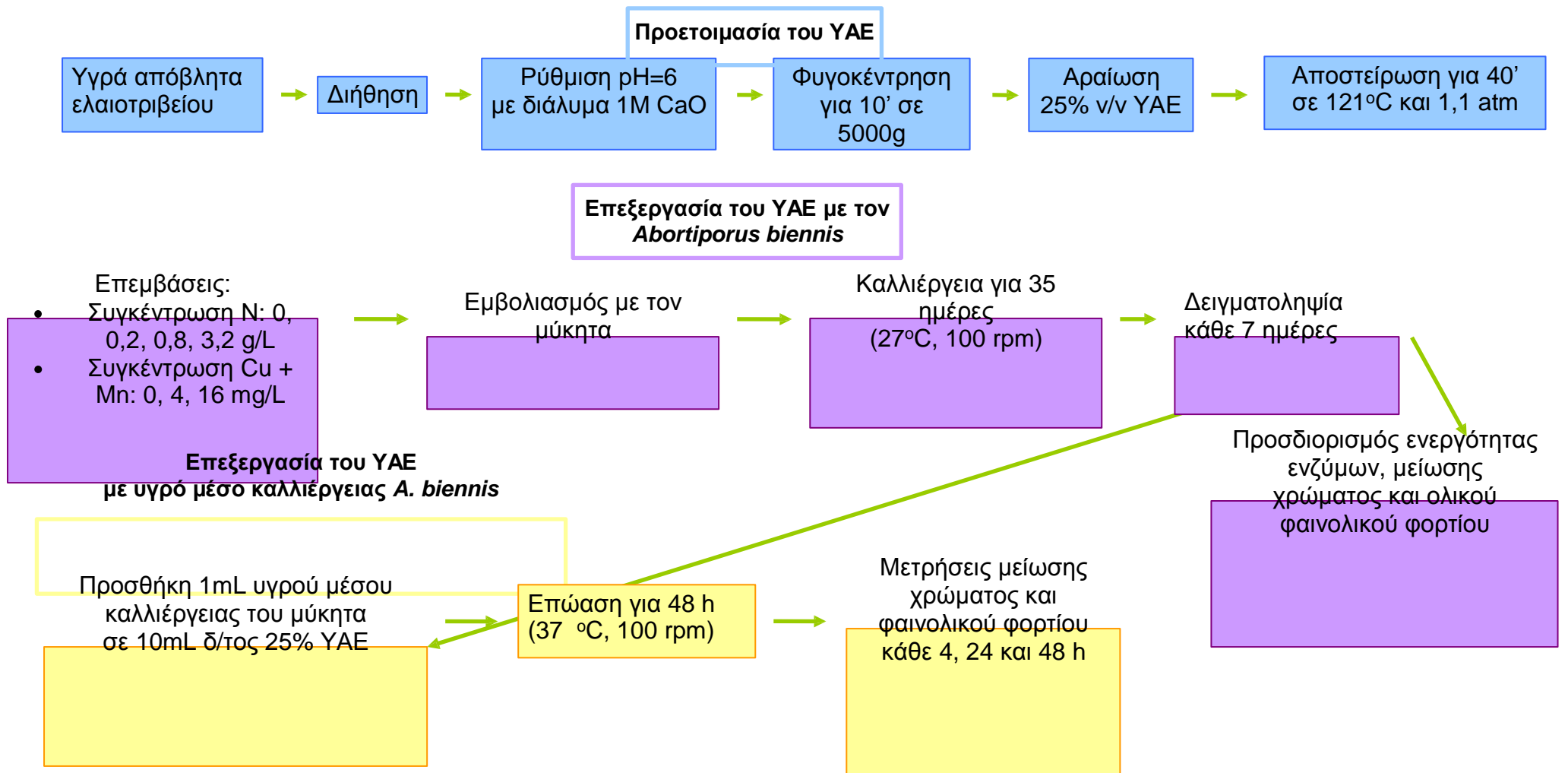
Παράλληλα, πραγματοποιούνταν και το πείραμα αξιολόγησης της δραστηριότητας του υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα. Για αυτό το σκοπό 1 mL από το συγκεκριμένο μέσο παραλαμβάνονταν κάθε 7 ημέρες (ημέρα: 7, 14, 21, 28, 35) και μεταφέρονταν σε 10mL μη αποστειρωμένου διαλύματος ΥΑΕ (25% v/v) και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης στους 37°C και σε συνθήκες ανάδευσης (100 στροφές/λεπτό) για χρονικό διάστημα 4, 24 και 48 h. Ακολουθούσε μέτρηση των ολικών φαινολικών ενώσεων και της μεταβολής του χρώματος. (βλ. [Σχεδιάγραμμα1](#))

3.12 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του SPSS Statistics 23. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα. Για την αξιολόγηση της συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Pearson, σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0,05$.

Πίνακας 2.1: Κωδικοποίηση και περιεχόμενο επεμβάσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πρώτης πειραματικής φάσης.

Επεμβάσεις Α/Α	Υπόστρωμα (25% v/v Υ.Α.Ε.)	N (g/L)	Cu + Mn (mg/L)
Μάρτυρας	Απουσία του μύκητα	0	0
1	Παρουσία του μύκητα	0	0
2			4
3			16
4		0,2	0
5			4
6			16
7		0,8	0
8			4
9			16
10		3,2	0
11			4
12			16

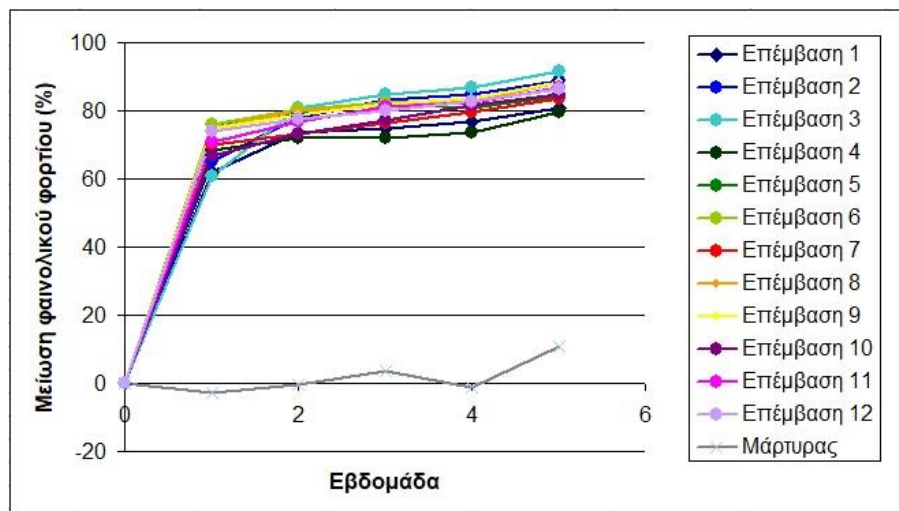


Σχεδιάγραμμα1: Σχεδιασμός πειραματικής πορείας

4 Αποτελέσματα

4.1 Μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου του αποβλήτου παρουσία του μύκητα

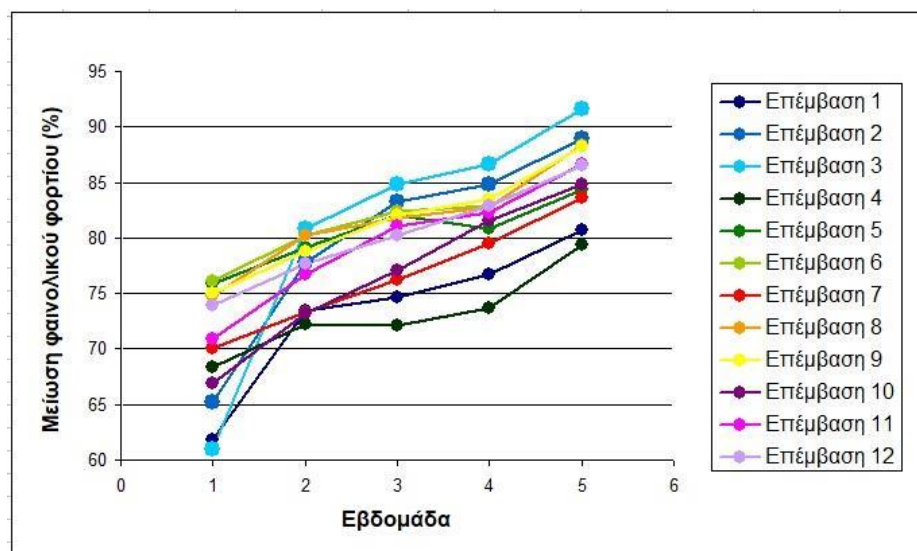
Καταρχήν μελετήθηκε η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου λόγω της παρουσίας του μύκητα *Abortiporus biennis*, σε διαλύματα με περιεκτικότητα σε υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου 25% v/v και διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου (N), μαγγανίου (Mn) και χαλκού (Cu). Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό (%) μείωση των ολικών φαινολικών (σε σχέση με το αρχικό – μη βιοπεξεργασμένο υλικό) σε όλες τις επεμβάσεις πλην εκείνης του μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 4.1: Μείωση ολικών φαινολικών των Υ.Α.Ε. (25% v/v), εκφρασμένη επί τοις εκατό σε σχέση με το αρχικό – μη εμβολιασμένο απόβλητο, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* για συνολική χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

Στο Διάγραμμα 3.2, απεικονίζονται μόνο οι επεμβάσεις όπου αναπτυσσόταν ο μύκητας. Από την πρώτη εβδομάδα η μείωση των ολικών φαινολικών είναι μεγαλύτερη του 60% και φθάνει μέχρι το 76%. Την τελευταία εβδομάδα των μετρήσεων (35^η μέρα), η μείωση κυμάνθηκε από 79,4% (4^η επέμβαση) έως 91,6% (3^η επέμβαση). Οι επεμβάσεις με τις μεγαλύτερες μειώσεις ολικών φαινολικών (>86,5%)

ήταν εκείνες που περιείχαν μέταλλα, με μειούμενη σειρά 3^η, 2^η, 8^η, 9^η, 11^η, 12^η. Για την 3^η Επέμβαση η μείωση του φαινολικού φορτίου την τελευταία μέρα μετρήσεων είναι στατιστικά υψηλότερη από τις 2, 8 και 9, που ακολουθούν, αλλά μεταξύ τους δεν διαφέρουν σημαντικά (Παράρτημα Αποτελεσμάτων, Πίνακας 7.1).



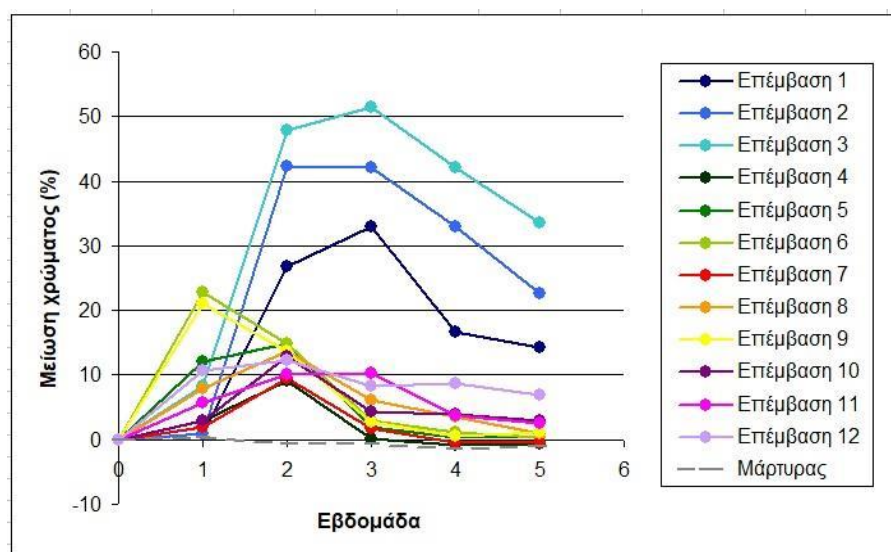
Διάγραμμα 4.2: Μείωση ολικών φαινολικών των Υ.Α.Ε. (25% v/v), εκφρασμένη επί τοις εκατό σε σχέση με το αρχικό – μη εμβολιασμένο απόβλητο, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* για συνολική χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

Στη συνέχεια ακολουθούν οι επεμβάσεις στις οποίες δεν είχε γίνει προσθήκη μετάλλων με εξαίρεση την 5^η επέμβαση. Η 4^η Επέμβαση εμφάνισε μικρότερο και στατιστικά σημαντικότερο ποσοστό μείωσης φαινολικών από τις 1, 7, 5 και 10, που ακολουθούσαν. Επίσης, διακρίνεται ότι η 3^η Επέμβαση (0 g/L N, 16 mg/L Mn & Cu), ενώ παρουσιάζει τη μικρότερη μείωση σε σχέση με τις υπόλοιπες την πρώτη ημέρα των μετρήσεων, εμφανίζει την υψηλότερη μείωση από όλες την τελευταία μέρα των μετρήσεων. Με άλλα λόγια, στη συγκεκριμένη επέμβαση κατά τη διάρκεια του πειράματος, καταγράφηκε η μεγαλύτερη διαφορά, κατά 30,6%, μεταξύ της πρώτης και τελευταίας μέτρησης. Στην 5^η Επέμβαση (0,2 g/L N, 4 mg/L Mn & Cu), η διαφορά μεταξύ της 7^{ης} και 35^{ης} ημέρας, όσον αφορά τα φαινολικά, δεν ξεπερνά τις 8,5 ποσοστιαίες μονάδες και αποτελεί τη μικρότερη διαφορά που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια υλοποίησης του πειράματος μεταξύ όλων των επεμβάσεων. Από το Παράρτημα των Αποτελεσμάτων (Πίνακας 7.1) φαίνεται πως η μείωση του

φαινολικού φορτίου διέφερε σημαντικά από την 7^η έως την 35^η μέρα στατιστικά σημαντικά για όλες τις επεμβάσεις. Οι διαφορετικές ποσότητες πηγής αζώτου (0,2, 0,8, 3,2 g/L), χωρίς την παρουσία μετάλλων, φαίνεται να είναι ανάλογες και ως προς την μείωση του φαινολικού φορτίου. Τα ποσοστά μειώσεων ήταν 79,4% για την 4^η, 83,6% για την 7^η και 84,8% για την 10^η Επέμβαση και μεταξύ των τιμών υπάρχουν στατιστικά μεγάλες διαφορές (Πίνακας 7.1).

4.2 Μεταβολή του χρώματος του αποβλήτου παρουσία του μύκητα

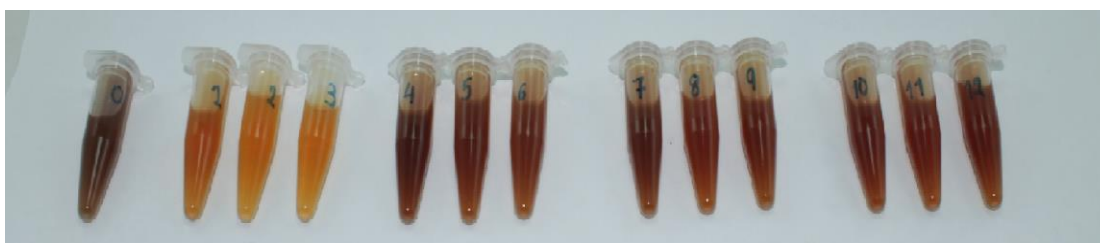
Η μείωση του χρώματος όπως υπολογίστηκε σύμφωνα με την απορρόφηση σε μήκος κύματος 525 nm και απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3.3. Φαίνεται πως στις επεμβάσεις χωρίς άζωτο (N), σημειώθηκε ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός.



Διάγραμμα 4.3: Αποχρωματισμός των Υ.Α.Ε. (25% v/v), εκφρασμένη επί τοις εκατό σε σχέση με το αρχικό – μη εμβολιασμένο απόβλητο, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* για συνολική χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

Συγκεκριμένα, την 21^η μέρα, η 3^η Επέμβαση (0 N, 16mg/L Mn&Cu), σημείωσε ποσοστό αποχρωματισμού 51,36%, η 2^η 42,3% και στην 1^η, 32,9%. Οι διαφορετικές τιμές των παραπάνω επεμβάσεων είχαν και στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ

τους (Πίνακας 7.1). Για τις υπόλοιπες επεμβάσεις, οι μέγιστες τιμές κυμάνθηκαν από 22,9% έως 9,1%. Στο διάλυμα των επεμβάσεων 6 και 9, δηλαδή με 16 mg μετάλλων και 0,2 g/L ή 0,8 g/L αζώτου, αντίστοιχα, η μεγαλύτερη μείωση της έντασης του χρώματος παρουσιάστηκε στην 1^η εβδομάδα. Για υπόλοιπες, ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός σημειώθηκε την 2^η ή 3^η εβδομάδα. Παρόλα, αυτά μετά και την 3^η εβδομάδα, σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε αύξηση της έντασης του χρώματος. Μάλιστα, στις επεμβάσεις με προσθήκη αζώτου, φαίνεται ότι το χρώμα, με το πέρασμα των 5 εβδομάδων, επανήλθε πολύ κοντά στο αρχικό (Εικόνα 4.1). Οι χαμηλότερες τιμές αποχρωματισμού την τελευταία μέρα μετρήσεων, για της επεμβάσεις 4-9, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 7.1). Στις επεμβάσεις, που δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αζώτου, η μείωση του χρώματος την τελευταία μέρα ήταν 14,2 έως 33,5% και ήταν τα μεγαλύτερα τελικά ποσοστά με σημαντικές διαφορές αναμεταξύ τους (Πίνακας 7.1). Η παρουσία ή μη των ιχνοστοιχείων, δεν φαίνεται να επηρεάζει με κάποιο τρόπο τον αποχρωματισμό κι ούτε παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους (Πίνακας 7.1). Τέλος, στον μάρτυρα, δεν σημειώθηκε μείωση της έντασης του χρώματος.



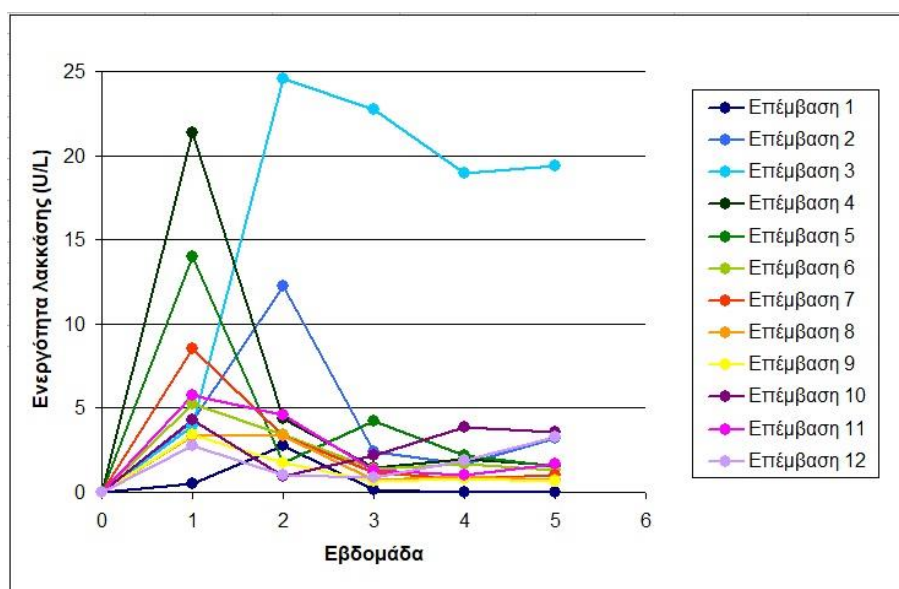
Εικόνα4.1: Χρώμα των βιοεπεξεργασμένων ή μη δειγμάτων μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας του μύκητα (35^η μέρα). Οι αριθμοί που αναφέρονται στην επιφάνεια των φιαλιδίων παραπέμπουν στον αριθμό της κάθε επέμβασης (βλ. Πίνακα 2.1).

4.3 Παραγωγή Ενζύμων

4.3.1 Λακκάση

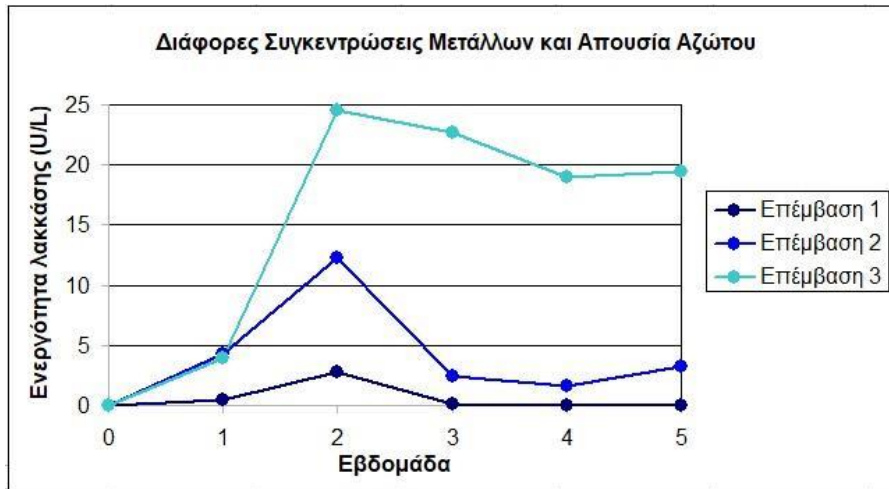
Στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου της λακκάσης εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), δηλαδή στην ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό (Διάγραμμα 4.4). Η μεγαλύτερη τιμή (24,5 $\mu\text{mol}/\text{min}$)

σημειώνεται την 14η μέρα χωρίς την προσθήκη αζώτου και με προσθήκη 16 mg/L μετάλλων (3η Επέμβαση). Για την ίδια επέμβαση η ενεργότητα της λακκάσης παραμένει υψηλή, σε σχέση με τις υπόλοιπες, μέχρι και την τελευταία μέτρηση και οι τιμές μεταξύ τους δεν διαφέρουν σημαντικά (Πίνακας 7.1). Η επέμβαση με 0,2 g/L άζωτο και χωρίς μέταλλα (4η Επέμβαση), σημείωσε τη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή (21,3 $\mu\text{mol}/\text{min}$) στο πείραμα, αλλά οι επόμενες μετρήσεις, για λακκάση, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες (Πίνακας 7.1).

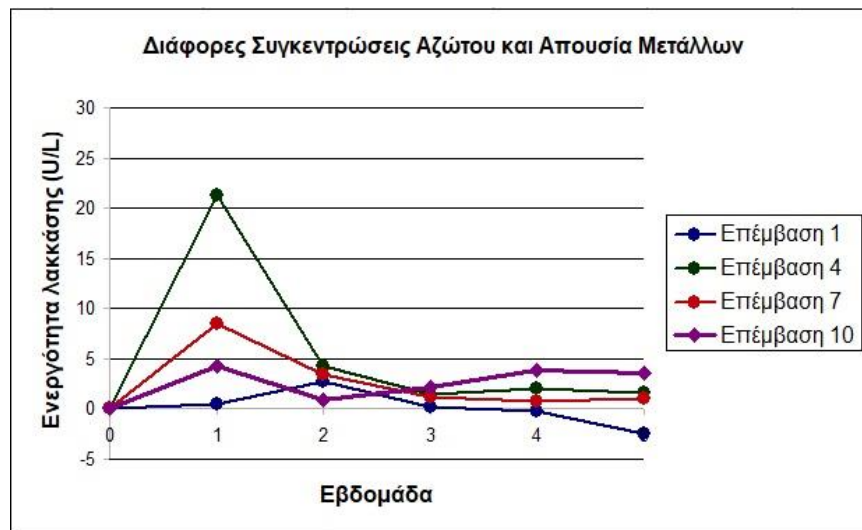


Διάγραμμα 4.4: Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης, εκφρασμένη ως Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε., για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

Γενικά, φαίνεται πως η παραγωγή του συγκεκριμένου ενζύμου ήταν εντονότερη κατά τις δυο πρώτες εβδομάδες του πειράματος. Ειδικότερα, την 7^η μέρα, σημειώθηκε η μεγαλύτερη ενεργότητα για τις επεμβάσεις 4-12 και για τις υπόλοιπες (1-3), που δεν υπήρχε προσθήκη N, την 2^η εβδομάδα. Στο Διάγραμμα 4.5, φαίνεται πως η ενεργότητα του ενζύμου αυξανόταν ανάλογα με την ποσότητα της προσθήκης μετάλλων στις καλλιέργειες. Όσον αφορά το άζωτο, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καθώς και η απουσία δεν ευνοούν την παραγωγή λακκάσης ενώ μικρή ποσότητα (0,2 g/L) φαίνεται να επιδρά θετικά (Διάγραμμα 4.6).



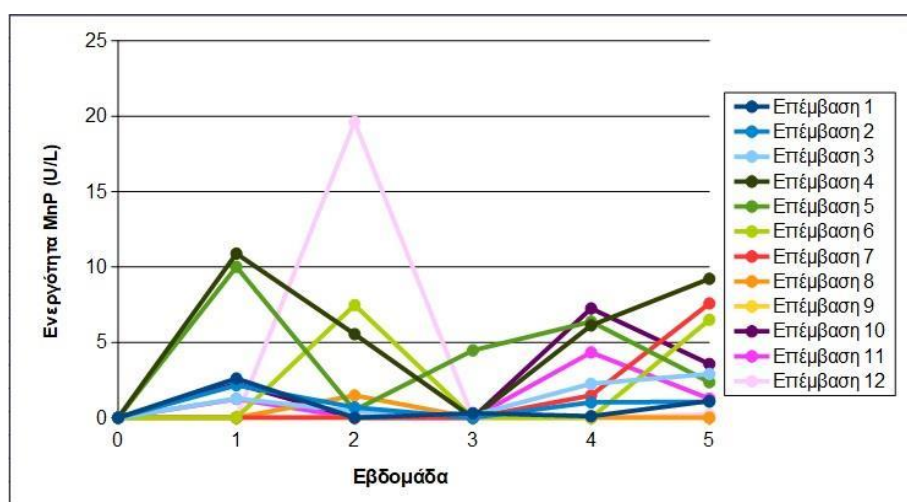
Διάγραμμα 4.5: Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης, εκφρασμένη ως Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 4, 16 mg Mn και Cu, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).



Διάγραμμα 4.6: Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάσης, εκφρασμένη ως Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 0,2, 0,8 και 3,2 mg αζώτου, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

4.3.2 MnP

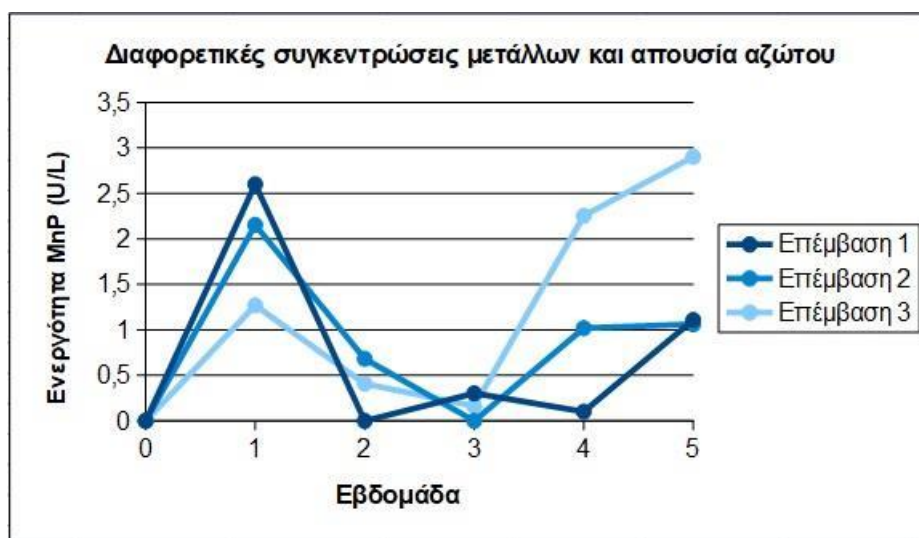
Στο Διάγραμμα 4.7, απεικονίζεται η ενεργότητα της Mn-υπεροξειδάσης για την κάθε επέμβαση κατά τη διάρκεια των 5 εβδομάδων. Μια γενική εικόνα δείχνει πως η παραγωγή του ενζύμου είναι γενικά χαμηλή. Την μεγαλύτερη ενεργότητα (19,6 $\mu\text{mol}/\text{min}$) παρουσιάζει η 12^η Επέμβαση (3,2 g/L N, 16 mg/L Mn & Cu) την 21^η μέρα, η οποία είναι και στατιστικά σημαντικότερη από τις υπόλοιπες μετρήσεις την ίδια ημέρα (Πίνακας 7.1). Ακολουθεί η 4^η Επέμβαση (0,2 g/L N, 0 mg Mn&Cu) την 7^η και 35^η μέρα με 10,9 και 9,2 $\mu\text{mol}/\text{min}$, αντίστοιχα. Οι παραπάνω τιμές διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες τιμές των επεμβάσεων (Πίνακας 7.1). Την 21^η μέρα η ενεργότητα του ενζύμου ήταν μηδενική για όλες τις επεμβάσεις εκτός από την 5^η που όμως ήταν και επίσης χαμηλή.



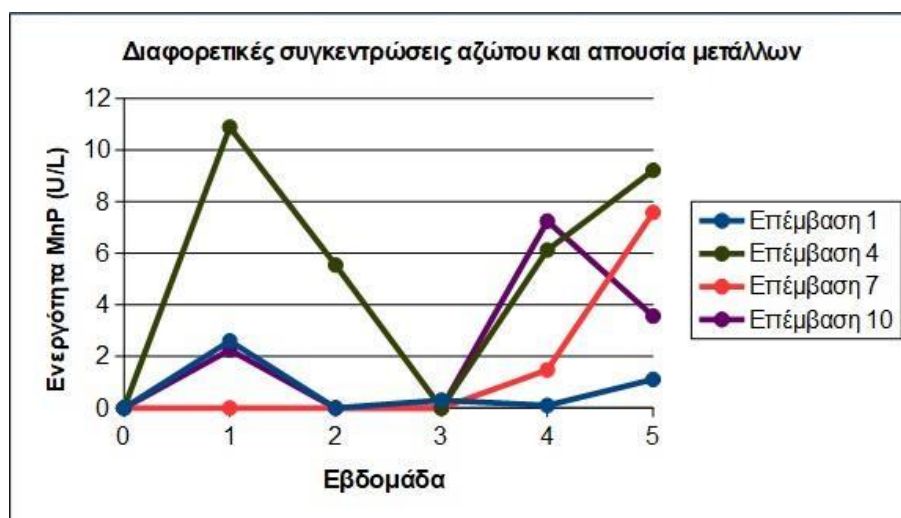
Διάγραμμα 4.7: Ενεργότητα της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnP), εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε., για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

Στο Διάγραμμα 4.8, την 7^η μέρα η υψηλότερη ενεργότητα είναι για την 1^η Επέμβαση (0 g/L N, 0 mg Mn & Cu) αλλά δεν διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τιμές των δυο επεμβάσεων (Πίνακας 7.1). Παρόλα αυτά, την 35^η μέρα, η επέμβαση με τη μέγιστη συγκέντρωση μετάλλων (3^η), καταγράφει τη στατιστικά σημαντική υψηλότερη ενεργότητα από τις υπόλοιπες δυο επεμβάσεις (Πίνακας 7.1). Με την προσθήκη 0,2 g/L αζώτου και απουσία μετάλλων, η παραγωγή του ενζύμου MnP ήταν μεγαλύτερη

και στατιστικά σημαντική σε σχέση 0,8 ή 3,2 g/L για την 7^η και 35^η μέρα (Διάγραμμα 4.9, Πίνακας 7.1).



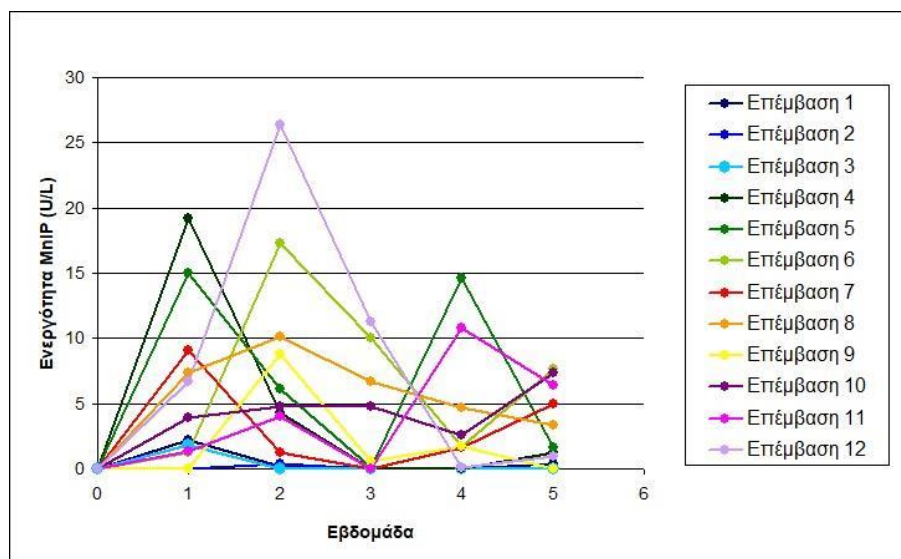
Διάγραμμα4.8: Η ενεργότητα της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnP), εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 4, 16 mg Mn και Cu, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).



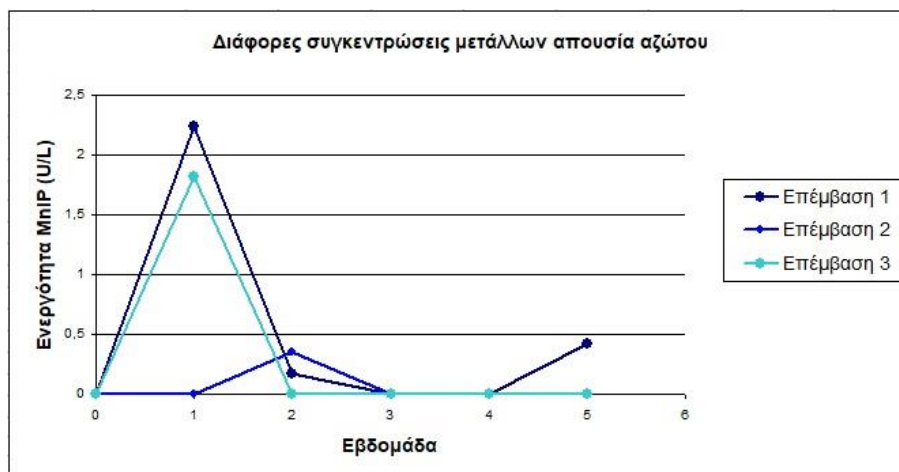
Διάγραμμα4.9: Η ενεργότητα της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnP), εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 0,2, 0,8 και 3,2 mg αζώτου, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

4.3.3 MnIP

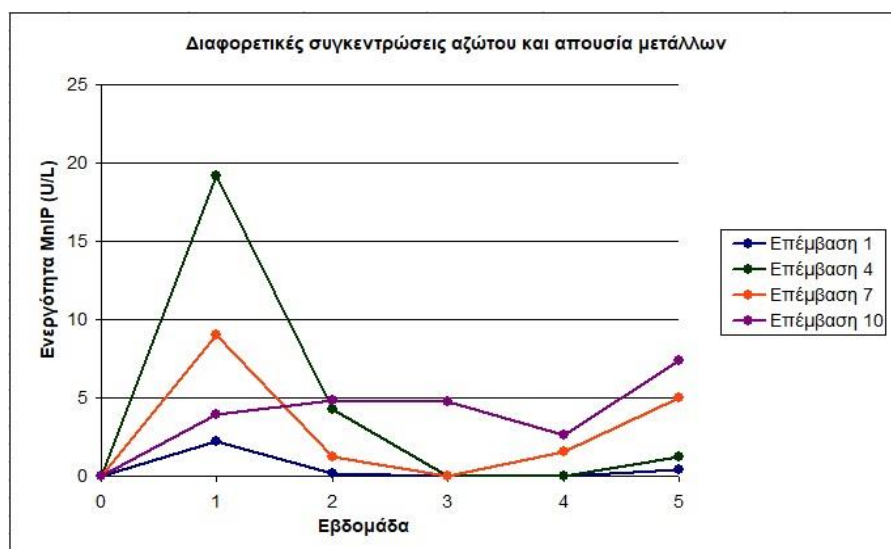
Από το Διάγραμμα 4.10 φαίνεται η μεταβολή της ενεργότητας του ενζύμου κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αρχικά, φαίνεται πως η ανώτερη ενεργότητα σημειώθηκε στην επέμβαση με 3,2 g/L N και 16 mg μέταλλα (12^η Επέμβαση) την 14^η μέρα με 26,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες της ίδια μέρας (Πίνακας 7.1). Ακολουθούν οι 4^η (0,2 g/L N, 0 mg Mn & Cu) και 5^η Επέμβαση (0,2 g/L N, 4 mg Mn & Cu) με τιμές 19,2 και 14,9 $\mu\text{mol}/\text{min}$ την 7^η μέρα που δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσά τους (Πίνακας 7.1). Επιπλέον φαίνεται η 5^η επέμβαση να παρουσιάζει δυο φορές μέγιστα, την 7^η και 28^η μέρα. Η γενική άποψη του διαγράμματος δείχνει ότι στις περισσότερες επεμβάσεις η ενεργότητα του MnIP ήταν εντονότερη τις πρώτες εβδομάδες (7^η και 14^η μέρα). Από το Διάγραμμα 4.11, μόνο η προσθήκη μαγγανίου και χαλκού, δεν φαίνεται ευνοεί την παραγωγή του ενζύμου παρόλα αυτά ο συνδυασμός τους με πηγή αζώτου, όπως στην 12^η Επέμβαση δίνει υψηλές τιμές ενεργότητας. Όσον αφορά, την προσθήκη αζώτου μόνο (Διάγραμμα 4.12), η υψηλότερη ενεργότητα σημειώθηκε την 7^η μέρα με 0,2 g/L (4^η Επέμβαση).



Διάγραμμα 4.10: Ενεργότητα της ανεξάρτητης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnIP), εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε., για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).



Διάγραμμα 4.11: Η ενεργότητα της ανεξάρτητης του μαγγανίου υπεροξειδάσης εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 4, 16 mg Mn και Cu, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).



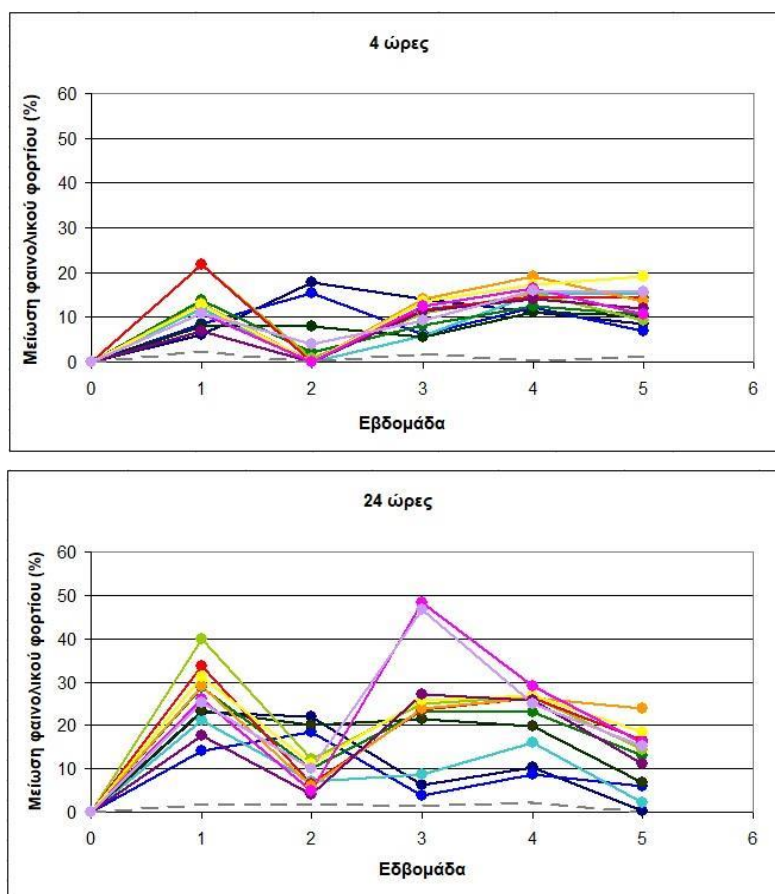
Διάγραμμα 4.12: Η ενεργότητα της ανεξάρτητης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnIP) εκφρασμένη σε Units ανά λίτρο (U/L), ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε θρεπτικό μέσο από διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με 0, 0,2, 0,8 και 3,2 mg αζώτου, για χρονική περίοδο διάρκειας πέντε εβδομάδων (οι σχετικές μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε εβδομάδα).

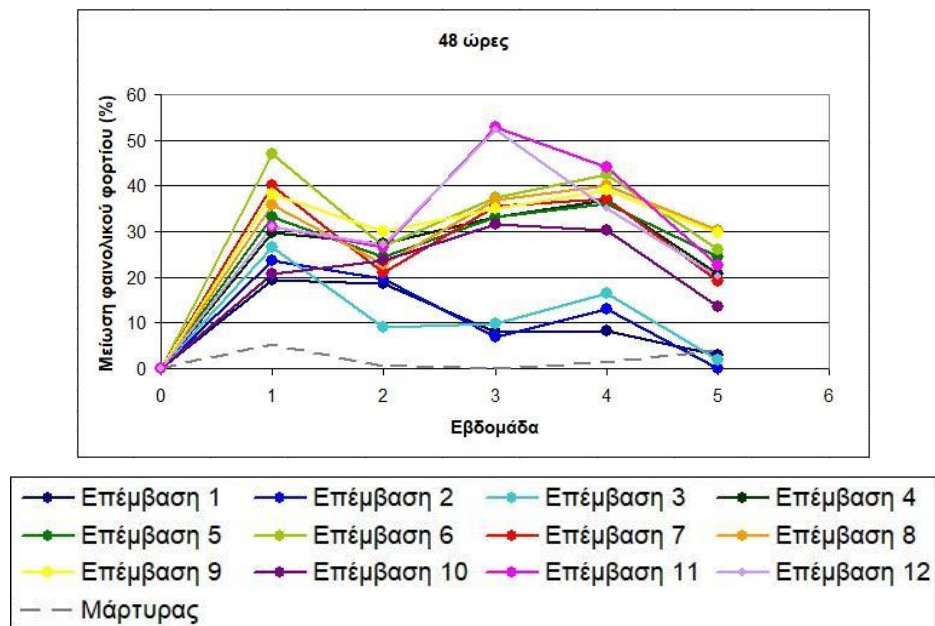
4.3.4 LiP και VAOx

Τα δυο αυτά ένζυμα δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία από τις επεμβάσεις.

4.4 Μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου με εκχύλισμα από την καλλιέργεια του μύκητα

Στην παρακάτω ομάδα διαγραμμάτων (4.13), φαίνεται η μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών σε μη αποστειρωμένο διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε. με την προσθήκη εκχυλίσματος από το υγρό μέσο καλλιέργειας του μύκητα. Αρχικά, είναι φανερό πως με την πάροδο των ωρών, δηλαδή από τις 4 έως τις 48 ώρες, η μείωση του φαινολικού φορτίου έβαινε αυξανόμενη. Έτσι η μείωση στις 24 ώρες ήταν μεγαλύτερη από εκείνη στις 4 ώρες και αντίστοιχα μικρότερη από τις 48 ώρες.



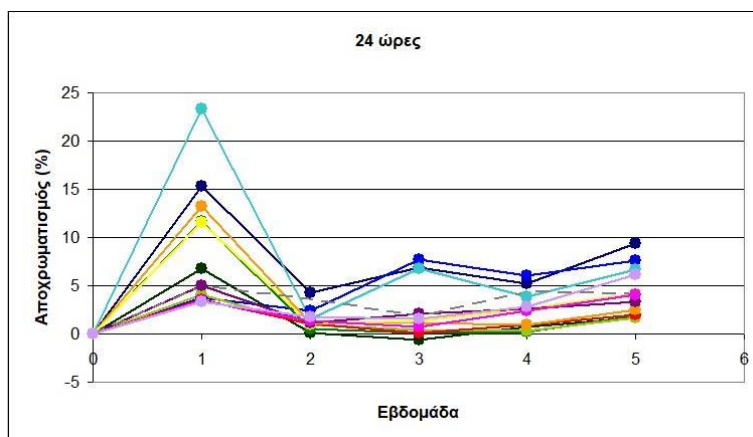
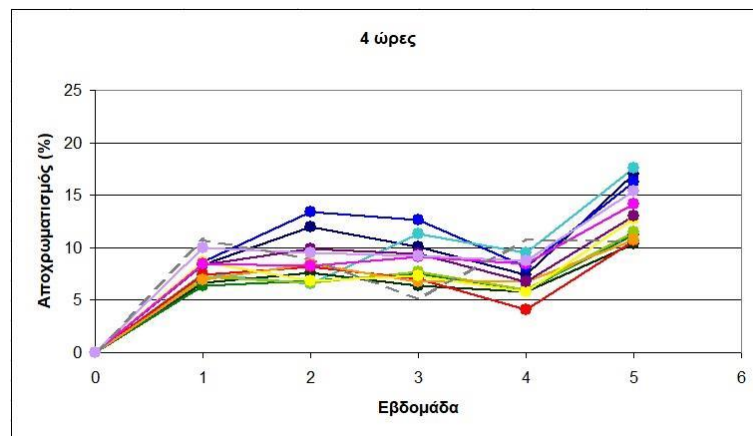


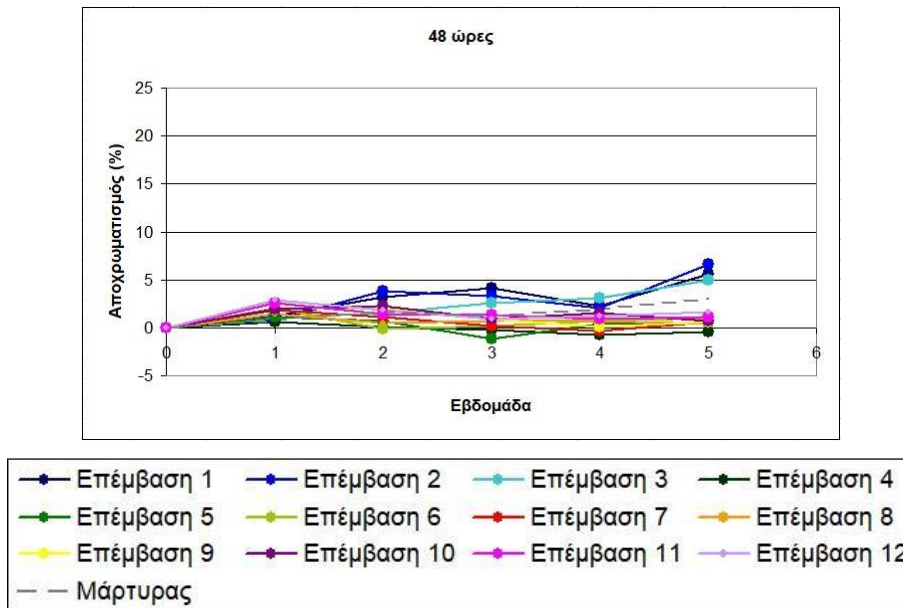
Διάγραμμα 4.13: Η μείωση του φαινολικού φορτίου μη αποστειρωμένου διαλύματος 25% v/v Υ.Α.Ε., μέσω της χρήσης του θρεπτικού διαλύματος καλλιέργειας του μύκητα *A. biennis* κάθε 7 ημέρες, εκφρασμένη ως ποσοστό επί του αρχικού δείγματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κάθε 4, 24 και 48 ώρες για 5 εβδομάδες.

Επίσης, οι καλύτερες ημέρες για τη χρήση του εκχυλίσματος ήταν την 1^η, 3^η και 4^η εβδομάδα εφόσον επέφεραν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης του φαινολικών. Αντίθετα, η προσθήκη αποβλήτου την 5^η εβδομάδα, για όλες τις επεμβάσεις, επέφερε τα χαμηλότερα ποσοστά μείωσης. Όσον αφορά τις επεμβάσεις, είναι ξεκάθαρο πως τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης σημειώθηκαν, την 3^η εβδομάδα, μετά την προσθήκη εκχυλίσματος από τις επεμβάσεις (11 & 12), με την μέγιστη προσθήκη αζώτου και παρουσία μετάλλων, (3,2 g/L N, 4 ή 16 mg Mn & Cu). Συγκεκριμένα, μετά από 48 h επώασης η μείωση έφθασε το 52,7% και 52,2% για την 11^η και 12^η επέμβαση, αντίστοιχα. Από τον Πίνακα 7.1 στο Παράρτημα των Αποτελεσμάτων φαίνεται πως τόσο μεταξύ τους όσο και από τις υπόλοιπες επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Εκτός από την 21^η μέρα, κατάλληλη για τη λήψη εκχυλίσματος είναι και η 28^η μέρα καθώς το φαινολικό φορτίο μειώθηκε ικανοποιητικά. Στην περίπτωση των επεμβάσεων που δεν υπήρχε προσθήκη αζώτου (1-3), η χρήση των αντίστοιχων μέσων καλλιέργειάς δεν φάνηκε να υποβοηθά σημαντικά στη μείωση του φαινολικού φορτίου του μη αποστειρωμένου διαλύματος Υ.Α.Ε.

4.5 Μεταβολή του χρώματος του αποβλήτου με εκχύλισμα από την καλλιέργεια του μύκητα

Στην παρακάτω ομάδα διαγραμμάτων (4.14), απεικονίζεται η μείωση του χρώματος που προκλήθηκε σε μη αποστειρωμένο διάλυμα 25% Υ.Α.Ε., από την προσθήκη θρεπτικού μέσου καλλιέργειας του μύκητα. Στο κάθε διάγραμμα φαίνονται όλες οι επεμβάσεις κατά τη διάρκεια των πέντε εβδομάδων για κάθε ώρα μέτρησης (4, 24, 48 h). Στη μέτρηση για αξιολόγηση της μεταβολής του χρώματος οι περισσότερες επεμβάσεις εμφανίζουν μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού μετά από 4 ώρες. Συγκεκριμένα, από την 7^η έως την 28^η μέρα, στις περισσότερες επεμβάσεις, ο αποχρωματισμός είναι μεταξύ 5-13% ενώ την 35^η μεταξύ 10-17% όπου είναι τα συνολικά μεγαλύτερα ποσοστά. Στις 24 h, παρατηρούνται τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης με τη χρήση του εκχυλίσματος αλλά για συγκεκριμένες επεμβάσεις (1^η, 3^η, 4^η, 5^η, 8^η, 9^η) και όχι για το σύνολό τους.

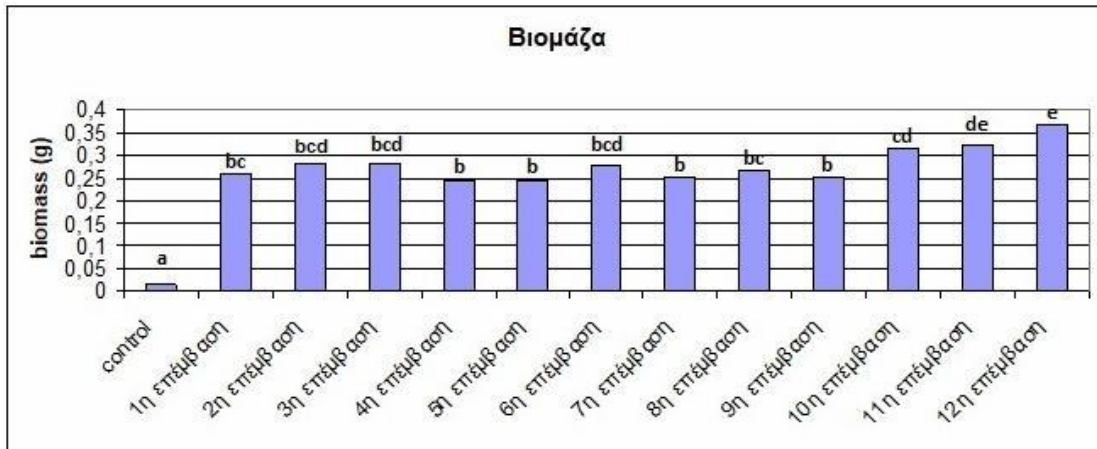




Διάγραμμα 4.14: Ο αποχρωματισμός μη αποστειρωμένου διαλύματος 25% v/v Υ.Α.Ε., μέσω της χρήσης του θρεπτικού διαλύματος καλλιέργειας του μύκητα *A. biennis* κάθε 7 ημέρες, εκφρασμένος ως ποσοστό επί του αρχικού δείγματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κάθε 4, 24 και 48 ώρες για 5 εβδομάδες.

Έτσι στις 24h, το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού (23,4%) και σημαντικά διαφορετικό από τα υπόλοιπα (Πίνακας 7.1), σημειώθηκε την 1^η εβδομάδα με τη χρήση του εκχυλίσματος από την 3^η Επέμβαση (0 g/L N, 16 mg Mn & Cu). Οι υπόλοιπες επεμβάσεις κατέγραψαν ποσοστά αποχρωματισμού, που σύμφωνα με το Παράρτημα Αποτελεσμάτων, μεταξύ τους δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας 7.1). Στις 48 h, ανεξάρτητα την εβδομάδα και την επέμβαση που λήφθηκε το εκχύλισμα, οι μειώσεις του χρώματος ήταν πολύ χαμηλές και τα περισσότερα δείγματα παρουσίασαν αύξηση της έντασης του χρώματος σε σχέση με τις 4 και 24 h. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα των καλλιεργειών όπου δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αζώτου έδωσαν καλύτερα ποσοστά αποχρωματισμού.

4.6 Προσδιορισμός Βιομάζας

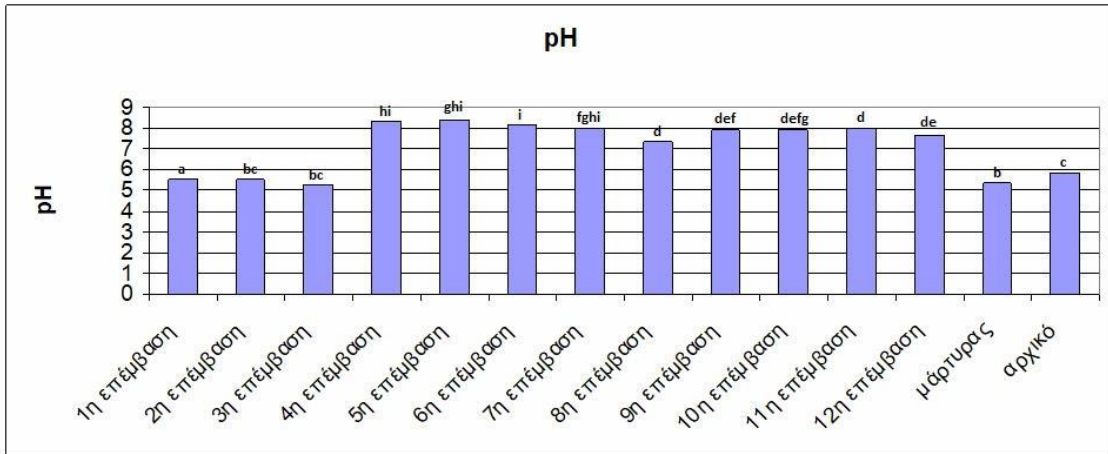


Διάγραμμα 4.15: Η βιομάζα του μύκητα *A. biennis* μετά το πέρας των πέντε εβδομάδων ανάπτυξης σε ΥΑΕ (25%, v/v). Ανόμοια γράμματα στα ιστογράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων.

Στο παραπάνω Διάγραμμα (4.15) παρουσιάζεται η ξηρή βιομάζα του μύκητα που αναπτύχθηκε σε κάθε επέμβαση. Στις επεμβάσεις με 3,2 g/L άζωτο (10, 11, 12), η βιομάζα αυξανόταν αναλόγως της προσθήκης μετάλλων και μεταξύ τους είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Έτσι, φαίνεται πως η μεγαλύτερη ανάπτυξη (0,367 g) σημειώθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 16 mg μετάλλων και 3,2 g/L αζώτου. Ακολουθούν οι επεμβάσεις 10 και 11 με 0,313 και 0,324 g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολουθούν οι επεμβάσεις χωρίς προσθήκη αζώτου αλλά με μέταλλα (2, 3) με 0,281 g. Σε παρόμοια επίπεδα, στην 6^η επέμβαση (0,2 g/L N, 16 mg Mn & Cu) η βιομάζα ήταν 0,278 g. Οι υπόλοιπες επεμβάσεις (1, 4-5, 1-9), ήταν χαμηλότερες ως προς την ξηρή βιομάζα και κυμάνθηκαν από 0,265 έως 0,244 g. Επίσης συγκριτικά με τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως στις επεμβάσεις 2-3 που η βιομάζα είναι σχετικά υψηλή η παραγωγή λακκάσης και η μείωση των ολικών φαινολικών ήταν υψηλότερη. Επιπλέον, στην επεμβάση 12 η βιομάζα είναι σημαντικά μεγαλύτερη από όλες και η ενεργότητα MnP ήταν επίσης η μεγαλύτερη.

4.7 Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH σε κάθε επέμβαση μετά το πέρας των 5 εβδομάδων παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.16. Στο αρχικό διάλυμα 25% v/v υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείου, είχε ρυθμιστεί το pH στο 6.



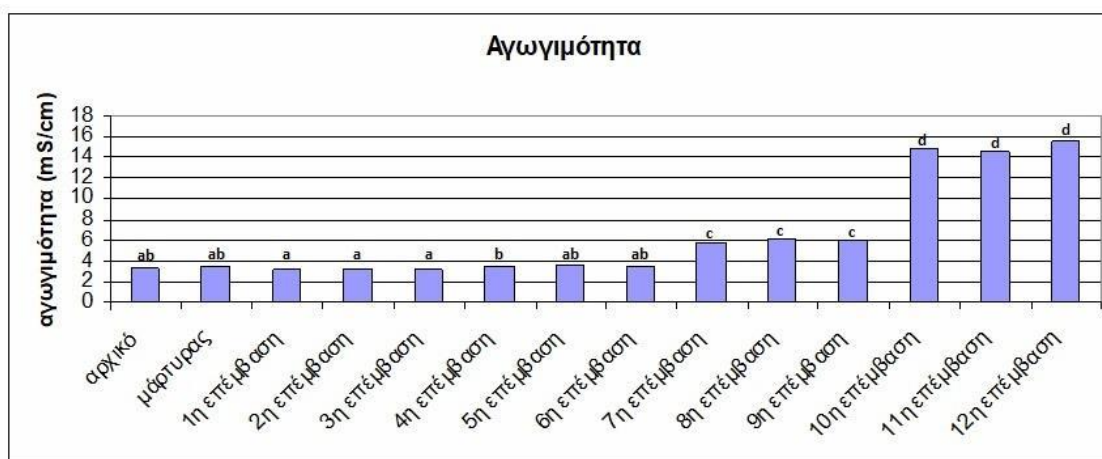
Διάγραμμα 4.16: Το pH του αρχικού διαλύματος και κάθε επέμβασης μετά από πέντε εβδομάδες ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε ΥΑΕ (25%, v/v). Ανόμοια γράμματα στα ιστογράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων.

Η γενική εικόνα είναι πως ανάλογα της προσθήκης ή μη αζώτου (N) χωρίζονται οι τελικές τιμές του pH. Στις επεμβάσεις που δεν έγινε επιπλέον προσθήκη αζώτου, δηλαδή στις τρεις πρώτες, οι τιμές κυμάνθηκαν από 5,3 έως 5,5. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις, το pH από ελαφρώς όξινο έγινε βασικό με στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 8,35 για την 4^η επέμβαση (0,2 g/L N, 0 mg Mn & Cu) έως 7,35 για την 8^η επέμβαση (0,8 g/L N, 4 mg Mn & Cu). Στον μάρτυρα όπου δεν αναπτυσσόταν ο μύκητας, το pH μετά το τέλος της επώασης το pH είχε διαμορφωθεί στο 5,4.

4.8 Προσδιορισμός Αγωγιμότητας

Στο Διάγραμμα 4.17 παρουσιάζεται η αγωγιμότητα των διαλυμάτων κάθε επέμβασης μετά από 35 ημέρες που διήρκτησε το πείραμα. Η γενική εικόνα μας πληροφορεί πως

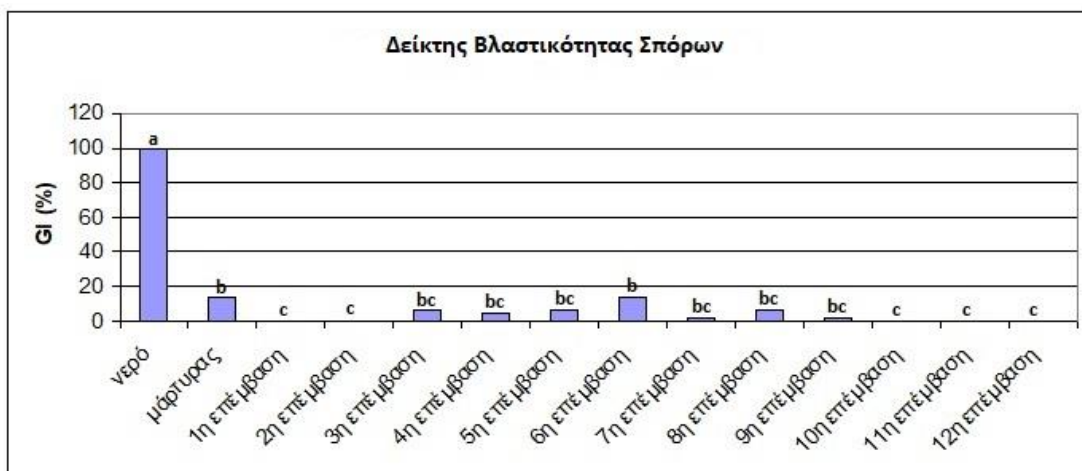
με την αύξηση της περιεκτικότητας σε άζωτο (N) η αγωγιμότητα των διαλυμάτων αυξήθηκε με στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αρχικά, στις επεμβάσεις χωρίς άζωτο, η αγωγιμότητα ήταν 3,11-3,14 mS/cm, δηλαδή χαμηλότερη από του μάρτυρα (3,47 mS/cm) και του αρχικού (3,28 mS/cm) διαλύματος. Στις επόμενες τρεις επεμβάσεις (4-6), με τη χαμηλότερη προσθήκη N (0,2 g/L), ήταν 3,43-3,56 mS/cm. Στις επεμβάσεις με 0,8 g/L N, δηλαδή 7-9, η αγωγιμότητα ήταν 5,81-6,05 mS/cm. Αντίστοιχα στις επεμβάσεις 10-12, όπου τα διαλύματα υπήρχαν 3,2 g/L N, η αγωγιμότητα κυμάνθηκε από 14,51 έως 15,45 mS/cm.



Διάγραμμα 4.17: Η αγωγιμότητα του αρχικού διαλύματος και κάθε επέμβασης μετά από πέντε εβδομάδες ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε ΥΑΕ (25%, v/v). Ανόμοια γράμματα στα ιστογράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων.

4.9 Βλαστικότητα

Μετά το τέλος του πειράματος, αξιολογήθηκε και η αποτοξικοποίηση του αποβλήτου μέσω δοκιμής βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε μόνο νερό, ο δείκτης βλαστικότητας των σπόρων έφτασε το 100% (Διάγραμμα 4.18). Σε όλες τις υπόλοιπες δοκιμές, η βλαστικότητα των σπόρων ήταν από μηδενική έως 13%. Από τα βιοεπεξεργασμένα δείγματα, το μεγαλύτερο δείκτη βλαστικότητας είχε η 6^η επέμβαση (0,2 g/L N, 16 mg Mn & Cu), με ποσοστό 13% δηλαδή όσο και του μάρτυρα όπου δεν αναπτυσσόταν μύκητας.



Διάγραμμα 4.18: Ο δείκτης βλαστικότητας του αρχικού διαλύματος και κάθε επέμβασης σε σπόρους μαρουλιού μετά από πέντε εβδομάδες ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* σε ΥΑΕ (25%, v/v). Ανόμοια γράμματα στα ιστογράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων.

5 Συζήτηση

Στόχος του παρόντος πειράματος ήταν, αρχικά, η αξιολόγηση της μείωσης του ρυπαντικού φορτίου υγρών αποβλήτων ελαιουργίας (ολικά φαινολικά, χρώμα, τοξικότητα) με την ανάπτυξη του μύκητα *Abortiporus biennis* και την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου (N), μαγγανίου (Mn) και χαλκού (Cu). Επίσης, μετρήθηκε η ενεργότητα των λιγνολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας η βιομάζα του μύκητα, καθώς και οι μεταβολές του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Σε ένα δεύτερο πλαίσιο, ποσότητα από το υγρό μέσο καλλιέργειας προστέθηκε σε μη αποστειρωμένα διαλύματα υγρού αποβλήτου ελαιουργίας (25% v/v σε νερό) και μετρήθηκε η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου και ο αποχρωματισμός.

Στην πρώτη προσέγγιση, με παρουσία του μύκητα στο Υ.Α.Ε., η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου ξεπέρασε το 91,5 %, στο τέλος του πειράματος, αποτελώντας από τις υψηλότερες μειώσεις που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, η χαμηλότερη μείωση την 35^η μέρα, εξαιρουμένου του μάρτυρα, ήταν 79,4%. Οι Koutrotsios & Zervakis (2014), αξιολογώντας 60 στελέχη ξυλοσηπτικών μυκήτων ως προς την ικανότητα αποδόμησης Υ.Α.Ε., παρατήρησαν πως το συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα, επέφερε μεγαλύτερη και γρηγορότερη μείωση φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα. Συγκεκριμένα, σε υγρό διάλυμα 25% v/v Υ.Α.Ε., μείωσε το ολικό φαινολικό φορτίο έως και 92% μέσα σε διάστημα 25 ημερών. Το ίδιο είδος, σε υγρές καλλιέργειες 25% v/v Υ.Α.Ε., μείωσε το φαινολικό φορτίο πάνω από 80% σε περίοδο 5 εβδομάδων, αλλά τα είδη του γένους *Pleurotus* spp. ήταν αποτελεσματικότερα (Ntougias et al., 2015). Αντίθετα, στα πειράματα των Koutrotsios & Zervakis (2014), τα δυο είδη *Pleurotus djamor* και *P. pulmonarius* μείωσαν τα φαινολικά σε μικρότερο ποσοστό και με πιο αργό ρυθμό, σε σχέση με το *A. biennis*. Παρόμοια, σε ελαιοκομικό απόβλητο από την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών, πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, το *A. biennis* ήταν αποτελεσματικότερο στη μείωσή τους από το *Pleurotus ostreatus* (Aggelis et al., 2002). Ένα άλλο είδος μύκητα λευκής σήψης (*Hericium erinaceus*), αναπτυσσόμενο σε 25% v/v διάλυμα Υ.Α.Ε., μείωσε κατά 50,68% το φαινολικό φορτίο (Koutrotsios et al., 2016). Όπως το παρόν πείραμα, έτσι και στο παραπάνω, με το είδος *H. erinaceus*, η μείωση των φαινολικών τις πρώτες επτά μέρες έφτασε πάνω από 50%

της τελικής μείωσης. Ο βαθμός αποδόμησης των φαινολικών δεν εξαρτάται μόνο από το είδος του μύκητα αλλά και από την φυσική προετοιμασία του αποβλήτου. Σ' αυτήν τη μελέτη το Υ.Α.Ε. αποστειρώθηκε και αραιώθηκε κατά 75%. Οι Fountoulakis et al. (2002), κατέγραψαν μεγαλύτερη μείωση όταν ήταν αποστειρωμένο και αραιωμένο απ' ότι θερμικά επεξεργασμένο και αδιάλυτο.

Η μεταβολή του χρώματος του αποβλήτου, μετρήθηκε με βάση την απορρόφηση του φωτός από το διάλυμα σε μήκος κύματος 525 nm. Το μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού ήταν πάνω από 50% την 3^η εβδομάδα. Παρόμοιο ποσοστό αναφέρουν και οι Ntougias et al. (2015) για το ίδιο είδος μύκητα, αλλά μετά το τέλος της 5^{ης} εβδομάδας. Οι Koutrotsios & Zervakis (2014), κατέγραψαν ποσοστό μείωσης του χρώματος από το είδος *A. biennis*, που έφτασε το 64% σε 25 μέρες. Το εδώδιμο είδος *H. erinaceus*, αποχρωμάτισε διάλυμα Υ.Α.Ε. κατά 64,65% (Koutrotsios et al., 2016). Αντιθέτως, σ' αυτή την μελέτη, η υψηλότερη τελική μείωση του χρώματος ήταν στο 34%. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα (Διάγραμμα 4.3), η μείωση του χρώματος δεν έβαινε συνεχώς αυξανόμενη και σε κάποιες επεμβάσεις η ένταση στο τέλος ήταν ίση ή μεγαλύτερη από την αρχική. Έτσι και τα είδη *Lentinellus castoreus*, *Tapinella panuoides* (Ntougias et al., 2015), *Bjerkandera adusta* και *Lenzites betulina* (Jaouani et al., 2003) αύξησαν την ένταση του χρώματος σε διάλυμα Υ.Α.Ε.. Σε άλλες περιπτώσεις, μπορεί να καταγραφεί, κατά τις πρώτες μέρες επώασης με τους μύκητες, μια αύξηση του χρώματος και στη συνέχεια αποχρωματισμός (Koutrotsios & Zervakis, 2014; Jaouani et al., 2003) ενώ σε άλλες μπορεί να παρουσιάσει στασιμότητα τις πρώτες και τελευταίες μέρες (Fountoulakis et al., 2002). Το φαινόμενο αύξησης της έντασης του χρώματος σε διαλύματα αποβλήτων ελαιουργείων, κατά την βιολογική επεξεργασία, μπορεί να οφείλεται σε οξείδωση και συμπύκνωση των φαινολικών ενώσεων (Thurston, 1994).

Στην 3^η επέμβαση (0 g/L N, 16mg Mn & Cu) που καταγράφηκε η υψηλότερη μείωση φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμού η συσχέτιση ανάμεσά τους ήταν σημαντική ($r = 0,658$, $p \leq 0.01$). Παρόμοια και σε άλλες μελέτες αποτοξικοποίησης Υ.Α.Ε. με μύκητες λευκής σήψης, η αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, συσχετίζεται με την μείωση του χρώματος (Koutrotsios et al., 2016; Ntougias et al., 2015; Koutrotsios & Zervakis, 2014). Για τις υπόλοιπες επεμβάσεις η συσχέτιση ήταν πιο αδύναμη ή δεν υπήρχε. Εξάιρεση αποτελεί η μελέτη των Aggelis et al. (2002), με τον μύκητα *A. biennis*, όπου η μείωση των φαινολικών έφτασε το 54,5% κι ο αποχρωματισμός μόνο το 8,4%, και δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των δυο μειώσεων.

Στον παρόν πείραμα, τα διαλύματα Υ.Α.Ε. εμπλουτίστηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου (0,2, 0,8, 3,2 g/L), σε μορφή NH_4NO_3 . Οι υψηλότερες μειώσεις φαινολικού φορτίου και χρώματος καταγράφηκαν στα διαλύματα που δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αζώτου. Παρόλα αυτά, στις επεμβάσεις που υπήρχε επιπλέον άζωτο, ευνοείται η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου με την αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου και μάλιστα οι με στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 7.1). Αντίθετα για τον αποχρωματισμό, η παρουσία αζώτου δεν συνοδεύτηκε με μείωση της έντασης του χρώματος στα διαλύματα. Σε άλλες μελέτες, διαπιστώθηκε πως ο εμπλουτισμός του Υ.Α.Ε. με άζωτο, ευνόησε τον αποχρωματισμό καθώς ξεπέρασε το 75% (Jaouani et al., [2003](#)). Επιπλέον, οι Kissi et al. ([2001](#)), διαπίστωσαν πως η προσθήκη θρεπτικών πηγών στο Υ.Α.Ε. (potato dextrose, yeast extract, μαλτόζη) διευκόλυναν την ανάπτυξη των μυκήτων στο παραπάνω υπόστρωμα. Πιο πρόσφατα οι Zerva et al. ([2017](#)), κατέγραψαν μείωση ολικού φαινολικού φορτίου και χρώματος πάνω από 80%. Ένας από τους στόχους της παραπάνω εργασίας ήταν η αξιολόγηση διαφορετικών πηγών αζώτου. Ανάμεσα σε αυτές, χρησιμοποίησαν και NH_4NO_3 όπου οδήγησε σε μεγαλύτερη του 50% μείωση των φαινολικών ενώσεων και του χρώματος. Θα πρέπει να σημειωθεί πως και στις δυο αυτές μελέτες τα ποσοστά αυτά καταγράφηκαν για άλλα είδη μυκήτων και διαφορετικές πηγές αζώτου.

Κατά τη διάρκεια των πέντε εβδομάδων και παράλληλα με τις μετρήσεις για την μεταβολή των ολικών φαινολικών και του χρώματος αξιολογήθηκε και η παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων. Όπως φαίνεται και από τα προηγούμενα κεφάλαια, τα ένζυμα αυτά ήταν η λακκάση (laccase), η εξαρτημένη του μαγγανίου (Mn) υπεροξειδάση (Manganese Peroxidase - MnP), η ανεξάρτητη του μαγγανίου (Mn) υπεροξειδάση (Mn independent Peroxidase – MnIP), η λιγνίνη υπεροξειδάση (Lignin Peroxidase – LiP) και η οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl Alcohol Oxidase – VAO). Όσον αφορά τα δυο τελευταία, δεν καταγράφηκε καθόλου παραγωγή κατά την επεξεργασία του αποβλήτου με τον είδος *A. biennis*. Το ίδιο φαινόμενο έχει καταγραφεί και σε άλλα παρόμοια πειράματα αποτοξικοποίησης αποβλήτων από την εξαγωγή ελαιολάδου (Ntougias et al., [2015](#)) και την αποπύκρωση επιτραπέζιας ελιάς (Aggelis et al., [2002](#)). Ακόμα και στην περίπτωση που το υπόστρωμα είναι εφοδιασμένο με επαγωγείς του LiP, το πολύ υψηλό φαινολικό φορτίο, ίσως, θα καθυστερήσει ή και παρεμποδίσει εντελώς την επαγωγή τους (Sayadi et al., [2000](#)). Για τα άλλα τρία ένζυμα, ο *A. biennis* σε περιβάλλον με Υ.Α.Ε. φαίνεται να παράγει

σε μεγαλύτερη ποσότητα λακκάση (Ntougias et al., [2015](#); Koutrotsios & Zervakis, [2014](#); Aggelis et al., [2002](#)). Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία, η MnIP παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές δραστηριότητας από τη λακκάση και την MnP.

Η λακκάση παράγεται, σχεδόν, σε όλες τις περιπτώσεις αποτοξικοποίησης Υ.Α.Ε. από τους μύκητες λευκής σήψης. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, σε όλες τις επεμβάσεις καταγράφηκε σε κάποιο βαθμό. Η υψηλότερη τιμή δραστηριότητας ήταν 24,5 U/L στην 3^η Επέμβαση (0 g/L N, 16 mg/L Mn & Cu) και ταυτίστηκε με τη μεγαλύτερη μείωση φαινολικών και αποχρωματισμού. Μάλιστα, ο αποχρωματισμός, στη συγκεκριμένη περίπτωση, φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με την ενεργότητα της λακκάσης με συντελεστή $r=0,966$ σε επίπεδο $p=0,01$. Οι Koutrotsios & Zervakis ([2014](#)), σημείωσαν συσχέτιση $r=0,43$, μεταξύ παραγωγής λακκάσης και μείωσης φαινολικών. Για το είδος *Pleurotus eryngii*, η ενεργότητα της λακκάσης ήταν 106,85 U/L και ο συντελεστής συσχέτισης με τον αποχρωματισμό του Υ.Α.Ε., $r=0,998$ (Ntougias et al., [2012](#)). Επίσης, για τις περισσότερες επεμβάσεις, το μέγιστο της ενεργότητας παρατηρήθηκε μετά από 7 μέρες επώασης και για τις υπόλοιπες μετά από 14. Στη συνέχεια, για όλες τις επεμβάσεις η τιμή της ενεργότητας έφθινε. Όμως, για την 3^η επέμβαση, ενώ η μέγιστη τιμή λακκάσης ήταν την 2^η εβδομάδα, ως το τέλος του πειράματος, η ενεργότητα παρέμεινε σχετικά υψηλή (19,4 U/mL). Παρόμοια, το είδος *A. biennis*, είχε μέγιστη δραστηριότητα 205 U/L την 8^η μέρα και ως την 20^η παρέμεινε μεγαλύτερη από 100 U/L, σε σχέση με άλλους μύκητες (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)) σε παρόμοιο υπόστρωμα Υ.Α.Ε.. Γενικότερα, φαίνεται πως η στιγμή ανίχνευσης αλλά και η ποσότητα της λακκάσης εξαρτάται τόσο από το είδος του μύκητα όσο και από τις πειραματικές παραμέτρους (Koutrotsios et al., [2016](#); Ntougias et al., [2015](#); Koutrotsios & Zervakis, [2014](#); Ntougias et al., [2012](#)).

Η προσθήκη κάποιων μετάλλων στα Υ.Α.Ε., όπως Cu και Mn, φαίνεται να ευνοούν την παραγωγή και τη δράση της λακκάσης. Σ' αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις των δυο μετάλλων (0, 4 και 16 mg/L), όπου και φάνηκε πως με την αύξηση τους, η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν μεγαλύτερη (Διάγραμμα 4.5). Η δράση του είδους *P. ostreatus* στην διάσπαση των φαινολών ήταν αποτελεσματικότερη με την προσθήκη θρεπτικών και CuSO_4 που θεωρείται επαγωγέας της λακκάσης (Olivieri et al., [2012](#)). Σύμφωνα με τους Palmieri et al. ([2000](#)), ο χαλκός επηρεάζει την παραγωγή της λακκάσης μέσω της μεταγραφής και μετάφρασης των κατάλληλων γονιδίων ενώ το μαγγάνιο από την άλλη επιδρά σε

μικρότερο βαθμό αλλά για διαφορετικά ισοένζυμα. Σε μελέτη σύγκρισης διαφόρων πρόσθετων για την αύξηση της παραγωγής της λακκάσης, ο Cu ήταν ο αποτελεσματικότερος με 47,5 U/mL και ακολουθούσε το Mn με 10,6 U/mL (Galhaup & Haltrich, [2001](#)).

Τα ένζυμα MnP και MnIP ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλες τις επεμβάσεις αλλά όχι όλες τις ημέρες των μετρήσεων (βλ. Παράρτημα Αποτελεσμάτων). Οι ανώτερες τιμές ήταν 19,6 U/L και 26,4 U/L για την MnP και MnIP, αντίστοιχα. Για το ίδιο είδος, σε άλλες μελέτες, υπερτερούσε η λακκάση και οι ποσότητες των υπεροξειδασών ήταν πολύ χαμηλές (Ntougias et al., [2015](#); Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)). Η έκκριση των λιγνολυτικών ενζύμων ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη μυκήτων λευκής σήψης. Έτσι για δυο είδη του γένους *Ganoderma* καταγράφηκε δράση λακκάσης και MnIP ενώ για άλλα δυο είδη *Pleurotus* λακκάσης και MnP (Ntougias et al., [2012](#)). Από την άλλη, φαίνεται πως η συγκέντρωση του Υ.Α.Ε. στο υπόστρωμα ανάπτυξης των μυκήτων καθορίζουν ευθέως ανάλογα την έκκριση MnP (Ruiz-Rodriguez et al., [2010](#)).

Η περίοδος που παράχθηκε το κάθε ένα από τα ένζυμα που ανιχνεύθηκαν, δεν ήταν συγκεκριμένη. Σε άλλες μελέτες, όμως, φαίνεται πως η παραγωγή τους έδειχνε να εντοπίζεται σε κάποια συγκεκριμένη στιγμή της επώασης. Για παράδειγμα, κατά την επεξεργασία Υ.Α.Ε. με *A. biennis* (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)) ή *H. erinaceus* (Koutrotsios et al., [2016](#)), η MnP παράχθηκε στη μέση της επώασης ενώ η MnIP προς το τέλος. Στην περίπτωση των αποβλήτων από επιτραπέζιες ελιές, η λακκάση είχε τη μεγαλύτερη ενεργότητα (57,7 U/L) για το *A. biennis* αλλά ανιχνεύθηκαν MnP και MnIP, με μέγιστο 7,9 και 13,8 U/L, αντίστοιχα (Aggelis et al., [2002](#)). Στη συγκεκριμένη, σε αντίθεση με τις άλλες αλλά και την παρούσα εργασία, η ενεργότητα των δυο υπεροξειδασών έβαινε αυξανόμενη καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Οι διαφορές στις περιόδους έκκρισης υπεροξειδασών φαίνεται και από τη μελέτη των Ntougias et al. ([2012](#)), όπου στα είδη *Ganoderma* η ενεργότητα του MnIP ήταν φθίνουσα, στο *P. ostreatus* αύξουσα και για το *P. eryngii* παρουσίασε τη μέγιστη ενεργότητα στη μέση του πειράματος.

Στο παρόν πείραμα, οι επεμβάσεις διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την προσθήκη θρεπτικών και μετάλλων και το γεγονός αυτό, ίσως, επηρεάζει και τη στιγμή έκκρισης των υπεροξειδασών. Στη μελέτη των Zerva et al. ([2017](#)), όπου αξιολογήθηκαν διάφορες πηγές αζώτου (N), φαίνεται πως απουσία αυτού, η ενεργότητα της MnP ήταν μεγαλύτερη για το είδος *P. citrinopileatus*. Ειδικότερα, την

ίδια μέρα μετρήσεων, η ενεργότητα με N ήταν 303,7 U/L, ενώ χωρίς 871,1 U/L. Όμως για το ένζυμο MnIP, η πηγή N ευνόησε την παραγωγή του, για το είδος, *Irpex lacteus*, με τιμή 674,9 U/L. Στην παρούσα μελέτη, η απουσία N και η παρουσία μετάλλων (Cu και Mn), δηλαδή στις επεμβάσεις 1-3, δεν ευνόησε την παραγωγή MnIP καθώς η ενεργότητα ήταν ανύπαρκτη ή ελάχιστη (Διάγραμμα 4.11). Παρομοίως, με την προσθήκη αζώτου (N) δεν σημειώθηκε κάποια ιδιαίτερη συσχέτιση με την ενεργότητα MnIP (Διάγραμμα 4.12). Για την MnP φαίνεται πως η χαμηλή προσθήκη αζώτου (0,2 g/L) επηρέασε θετικά την ενεργότητα της MnP (Διάγραμμα 4.9). Επίσης, μικρή ενεργότητα της MnP καταγράφηκε ανεξάρτητα της συγκέντρωσης Mn και Cu αλλά σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (Διάγραμμα 4.8). Επίσης, στις παραπάνω μελέτες, εκτός ότι υπερτερούσε η λακκάση σε σχέση με τα άλλα δυο ένζυμα, μεταξύ τους ήταν μεγαλύτερη η ενεργότητα του MnIP. Εδώ υψηλότερη ενεργότητα μετρήθηκε για την MnIP αν και δεν ήταν ένα καθολικό χαρακτηριστικό των επεμβάσεων αλλά περισσότερο μεμονωμένο. Το ίδιο ισχύει και για τη λακκάση όπου η υψηλή και σχετικά σταθερή για 35 μέρες ενεργότητα αφορούσε μόνο μια επέμβαση. Στην περίπτωση της MnP η υψηλότερη τιμή της διέφερε πολύ από την ενεργότητα του ενζύμου τις υπόλοιπες ημέρες και στις άλλες επεμβάσεις (Διάγραμμα 4.7)

Η παραγωγή των παραπάνω ενζύμων σχετίστηκε με την μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου και τον αποχρωματισμό. Εκτός από την 3^η Επέμβαση που αναφέρεται παραπάνω, και τα ποσοστά αποχρωματισμού για την 6^η ($r=0,987$, $p=0,01$) και 9^η ($r=0,964$, $p=0,01$) σχετίζονταν σημαντικά με την λακκάση. Ο αποχρωματισμός στην 8^η Επέμβαση σχετιζόταν σημαντικά ($r=0,993$, $p=0,01$) με την ενεργότητα της MnIP. Σε άλλες μελέτες, η MnP φαίνεται να σχετίζεται με τον αποχρωματισμό σε κάποια είδη μυκήτων (Aggelis et al., [2002](#)). Επιπλέον, για το είδος *Phanerochaete chrysosporium*, το συγκεκριμένο ένζυμο ήταν υπεύθυνο για τον αποχρωματισμό αποβλήτων χαρτοποιίας (Michel et al., [1991](#)). Σε άλλη περίπτωση η παρουσία MnP σχετιζόταν σημαντικά με την μείωση του φαινολικού φορτίου ($r=0,71$) (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)). Από την άλλη, η MnIP ήταν υπεύθυνη για την μείωση των φαινολικών σε Υ.Α.Ε. ($r = 0,996$) με τη χρήση του είδους *P. eryngii* (Ntougias et al., [2012](#)).

Στο τέλος των 5 εβδομάδων μετρήθηκαν κάποιες παράμετροι κι ανάμεσά τους ήταν η μεταβολή του pH από την αρχική τιμή 6. Πριν την έναρξη του πειράματος, το pH του Υ.Α.Ε. ρυθμίστηκε, όπως και σε άλλες περιπτώσεις βιοαποδόμησης με

μύκητες λευκής σήψης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα (βλ. Διάγραμμα 4.16) το pH μειώθηκε για τον μάρτυρα και τις επεμβάσεις 1-3, όπου δεν υπήρχε άζωτο (N), ενώ για όλες τις υπόλοιπες αυξήθηκε μέχρι και πάνω από το 8. Το έντονα αλκαλικό pH κάποιων διαλυμάτων, ίσως, οφείλεται στην προσθήκη πηγής αζώτου, δηλαδή το NH_4NO_3 . Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση επεξεργασίας με το είδος *Ph. chrysosporium* όπου η αρχική τιμή pH ήταν 5,00 και τελικά έφθασε το 8,10 (Mekki et al., 2006). Αντίθετα, κατά την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών σε Υ.Α.Ε., το αρχικό pH=6,00 μειώθηκε σε όλες τις επεμβάσεις (Koutrotsios & Zervakis, 2014). Το ίδιο φαινόμενο, καταγράφηκε και σε άλλη μελέτη (Koutrotsios et al., 2016) όπου από pH=5,50 μειώθηκε σε pH=4,53 αλλά και σε εκείνη των Fountoulakis et al. (2002) όπου σε κάθε επέμβαση και τους μάρτυρες το pH έγινε πιο όξινο στο τέλος.

Η αγωγιμότητα των διαλυμάτων που βιοεπεξεργάστηκαν με το είδος *A. biennis* αξιολογήθηκε με το πέρας των 35 ημερών. Έτσι, από τα αποτελέσματα, φαίνεται πως μειώθηκε σε σχέση με το αρχικό διάλυμα στις επεμβάσεις χωρίς άζωτο ενώ στις υπόλοιπες αυξήθηκε, αναλόγως, τις συγκέντρωσης του N. Στις επεμβάσεις με 3,2 g/L N, η αγωγιμότητα ήταν πολύ υψηλή κι έφτασε το 15,45 mS/cm. Αύξηση στην αγωγιμότητα μετά από την επώαση με μύκητες λευκής σήψης κατέγραψαν και οι Koutrotsios & Zervakis (2014), από 1,8 mS/cm σε 5,97 mS/cm. Η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σε επίπεδα όπως της παρούσας μελέτης, καταγράφηκε και μετά την βιοεπεξεργασία με το είδος *P. chrysosporium* όπου έφθασε τα 14,20 mS/cm αλλά η αρχική αγωγιμότητα ήταν ήδη σχετικά υψηλή (810 mS/cm) (Mekki et al., 2006). Η αύξηση της αγωγιμότητας μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ιόντων στα διαλύματα λόγω προσθήκης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αζώτου, μαγγανίου και χαλκού.

Στο τέλος της επώασης διαχωρίστηκε το μυκήλιο που είχε αναπτυχθεί από το υγρό υπόστρωμα και καταγράφηκε το ξηρό του βάρος. Από τη γενική εικόνα του αντίστοιχου διαγράμματος (βλ. Διάγραμμα 4.15) φαίνεται πως η βιομάζα μεταξύ των επεμβάσεων 1-9 δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στις επεμβάσεις με τη μέγιστη ποσότητα αζώτου (3,2 g/L N), η βιομάζα του μύκητα ήταν μεγαλύτερη και έβαινε αυξανόμενη αναλόγως της ποσότητας μετάλλων. Στα πειράματα των Zerva et al (2017), η προσθήκη αζώτου ευνόησε την ανάπτυξη της βιομάζας. Μετά το τέλος των 35 ημερών, η βιομάζα του είδους *A. biennis* κυμάνθηκε από 240-370 mg/ 100 mL υποστρώματος. Η σχετική βιβλιογραφία δείχνει πως η βιομάζα των μυκήτων σε

θρεπτικά υποστρώματα με Υ.Α.Ε. δεν παίρνει σταθερές τιμές και παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις. Περισσότερη βιομάζα φαίνεται να αναπτύχθηκε από το είδος *P. ostreatus* όπως έφθασε το 571 mg/ 100 mL θερμικά επεξεργασμένου υποστρώματος (Fountoulakis et al., [2002](#)). Στην μελέτη των Ntougias et al. ([2015](#)), η βιομάζα των διαφόρων ειδών κυμάνθηκε από 20 – 140 mg/ 100 mL και στο είδος *A. biennis* δεν ανήκε κάποια από τις μέγιστες τιμές. Μετά από 20 ημέρες ανάπτυξης σε διάλυμα 25% v/v η βιομάζα του ίδιου στελέχους έφθασε τα 210 mg/ 100 mL υποστρώματος (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)). Ακόμα μικρότερη ήταν η βιομάζα του *A. biennis* (10,9 mg/ L) σε διάλυμα ανάπτυξης με απόβλητο από την αποπύκνωση επιτραπέζιων ελιών (Aggelis et al., [2002](#)). Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι στην παρούσα εργασία το υγρό διάλυμα ανάπτυξης του μύκητα εμπλουτίστηκε με άζωτο. Η επίδραση της προσθήκης μετάλλων φαίνεται να είναι θετική, καθώς με την αύξηση της συγκέντρωσης, η βιομάζα του μύκητα μεγάλωνε (βλ. Διάγραμμα 4.15)

Η μείωση της φυτοτοξικότητας αξιολογήθηκε μέσω του δείκτη βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού (*Lectuca sativa*). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η φυτοτοξικότητα του αποβλήτου δεν μειώθηκε αλλά αντιθέτως αυξήθηκε μιας και ο δείκτης βλαστικότητας του αρχικού διαλύματος ήταν μεγαλύτερος. Όπως, στην περίπτωση της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου από την επεξεργασία ελαιόκαρπων, ο *A. biennis*, παρ' ότι μείωσε το φαινολικό φορτίο δεν αύξησε τον δείκτη βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου (Aggelis et al., [2002](#)). Για το ίδιο είδος μύκητα, στις 20 μέρες, ο δείκτης βλαστικότητας, σπόρων κάρδαμου, ήταν 30% μεγαλύτερος από εκείνον του ανεπεξέργαστου διαλύματος (Koutrotsios & Zervakis, [2014](#)) και στις 35 μέρες 20% (Ntougias et al., [2015](#)). Αυτό υποδεικνύει ότι, ίσως, οι ιδιότητες του Υ.Α.Ε. μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου βιοεπεξεργασίας. Πιο ξεκάθαρα φάνηκε όταν αξιολογήθηκε η βλαστική ικανότητα των σπόρων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά την επώαση κι όχι μόνο στο τέλος. Στις τρεις και έξι μέρες, ο δείκτης βλαστικότητας ήταν μεγαλύτερος από ότι στις 9 μέρες (Ntougias et al., [2015](#)). Αντίστοιχα στην αξιολόγηση μετά από 10, 20 και 30 μέρες επεξεργασίας, στις 10 μέρες δεν καταγράφηκε καμία βελτίωση ως προς τη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου (Ntougias et al., [2012](#)). Μια εξήγηση είναι πως με τη δράση των λιγνολυτικών ενζύμων στη διάσπαση των φαινολικών δημιουργούνται φαινόξυ ρίζες και κινονοειδή που είναι υπεύθυνα για την φυτοτοξικότητα των επεξεργασμένων Υ.Α.Ε. εφόσον τα συγκεκριμένα δεν αποδομούνται (Martirani et al., [1996](#)). Είδη του γένους *Ganoderma* δεν φαίνεται να ελάττωσαν την τοξικότητα Υ.Α.Ε., αλλά αντίθετα

την αύξησαν, παρόλη την μείωση των φαινολικών (Ntougias et al., [2012](#)). Γενικότερα, φαίνεται πως η μείωση της τοξικότητας σχετίζεται με την μείωση του φαινολικού και οργανικού φορτίου του αποβλήτου αλλά όχι αναλογικά (Tsioumpas et al., [2002](#)). Επίσης, στην παρούσα μελέτη τα διαλύματα μετά το πέρας των 5 εβδομάδων είχαν μεγάλη ηλεκτρική αγωγιμότητα που μπορεί να δυσχεραίνει επιπλέον το φύτευμα των σπόρων. Η άρδευση φυτών τομάτας και πιπεριάς με Υ.Α.Ε. μείωσε την απόδοση λόγω υψηλής αγωγιμότητας που δυσκόλεψε την πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών (Aggelis et al., [2003](#)).

Η χρήση ποσότητας εκχύλισματος σε διαλύματα 25% v/v Υ.Α.Ε. για την αποτοξικοποίησή του ήταν αποτελεσματική σε ένα βαθμό. Τα αποτελέσματα της δράσης του αξιολογήθηκαν μέσω της μείωσης του φαινολικού φορτίου και της μεταβολής του χρώματος. Ως προς τα φαινολικά η μεγαλύτερη μείωση ήταν 52,7% μετά από 48h επώασης με εκχύλισμα από την 21^η μέρα της καλλιέργειας. Οι Ntougias et al. ([2015](#)) χρησιμοποίησαν το εκχύλισμα από διαλύματα Υ.Α.Ε. όπου αναπτύσσονταν μύκητες λευκής σήψης και αξιολόγησαν τον αποχρωματισμό και τη μείωση των φαινολικών του αποβλήτου. Σε εκείνη την περίπτωση η επώαση διήρκησε 6 μέρες και η μείωση των φαινολικών ενώσεων έβαινε συνεχώς αυξανόμενη. Η μεταβολή του χρώματος στην παρούσα μελέτη παρουσίασε μείωση που έφθασε το ανώτερο στο 23,4% από την 3η Επέμβαση με την υψηλότερη δράση λακκάσης και τη καλύτερη μείωση φαινολικών και χρώματος στην καλλιέργεια. Σχετικά μεγάλα ποσοστά καταγράφηκαν την ίδια εβδομάδα στις 24h κι από άλλες επεμβάσεις όπως επίσης και την 5^η εβδομάδα στις 4h. Οι υπόλοιπες μειώσεις ήταν πολύ χαμηλές και έβαιναν συνεχώς μειούμενες από τις 4 έως τις 48 ώρες. Αντίστοιχα, οι Ntougias et al. ([2015](#)), παρατήρησαν αύξηση της έντασης για τα είδη *Agrocybe cylindracea* και *P. ostreatus*, καμία μεταβολή για το *I. andersonii* και μείωση για το *T. versicolor*. Έτσι, φαίνεται πως ο αποχρωματισμός καθορίστηκε και από το είδος του μύκητα της καλλιέργειας απ' όπου προήλθε το εκχύλισμα. Επίσης, θα μπορούσε να αναφερθεί πως η επέμβαση (3^η) με τη μεγαλύτερη μείωση του φαινολικού φορτίου και την υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης δεν αποτέλεσε το καλύτερο εκχύλισμα ως προς τη μείωση των φαινολικών. Αντίθετα οι περισσότερες επεμβάσεις την ξεπέρασαν σε ποσοστά (Διάγραμμα 4.13) Αυτά που είχαν την καλύτερη δράση, στη μείωση των φαινολικών, ήταν εκείνα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου και μετάλλων (11^η -12^η Επέμβαση).

6 Συμπεράσματα

Από την παρούσα μελέτη θα μπορούσαν να βγουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Το είδος *Abortiporus biennis* αναπτύσσεται πολύ ικανοποιητικά σε διάλυμα Υ.Α.Ε (25% v/v).
2. Από την προσθήκη αζώτου (N) φαίνεται πως ευνοήθηκε η ανάπτυξη βιομάζας του μύκητα που ήταν ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης N.
3. Στις καλλιέργειες του μύκητα, μειώθηκε σημαντικά το φαινολικό φορτίο (έως 91,6%) και σημειώθηκε αποχρωματισμός (έως 51,4%) των Υ.Α.Ε.
4. Το θρεπτικό μέσο από τις καλλιέργειες ανάπτυξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποδόμηση διαλύματος Υ.Α.Ε. Η αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων ήταν μικρότερη σε σχέση με εκείνη που παρατηρήθηκε με την ταυτόχρονη παρουσία-ανάπτυξη του μύκητα, όμως ξεπέρασε το 50% (έναντι 91,6% στις καλλιέργειες) και ήταν πολύ ταχύτερη (48 ώρες έναντι 35 ημερών).
5. Ανάμεσα στις διάφορες επεμβάσεις και τις ημέρες εφαρμογής, φαίνεται πως στις 21 ημέρες καλλιέργειας παρουσία τόσο αζώτου (N) όσο και μετάλλων (Cu & Mn) το υγρό μέσο που παραλαμβάνεται από τη μυκητιακή καλλιέργεια αποδίδει καλύτερα.
6. Η αξιοποίηση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας μυκήτων λευκής σήψης και εφαρμογή του για την αποτοξικοποίηση ΥΑΕ θα πρέπει να ερευνηθεί διεξοδικότερα ώστε να κατανοηθούν πλήρως οι δυνατότητές της. Σε μεταγενέστερο στάδιο και σύμφωνα με την παρούσα εργασία φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο λαμβάνοντας υπόψη τη χρονική διάρκεια του πειράματος (48 ώρες).

7 Παράρτημα Αποτελεσμάτων

Πίνακας 7.1: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος του αποβλήτου, καθώς και τιμές ενεργότητας ενζύμων, όπως μετρήθηκαν σε καλλιέργειες του μύκητα *Abortiporus biennis* σε ΥΑΕ (25% v/v). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (4 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση). Ανόμοιοι εκθέτες με κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων, ενώ ανόμοιοι εκθέτες με μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών από διαφορετικές χρονικές στιγμές για την ίδια επέμβαση.

N (g/L)	Mg + Cu (mg/l)	Ημέρα	Ολικά φαινολικά (mg/L)	Χρώμα	Laccase (U/L)	MnIP (U/L)	MnP (U/L)
Non inoculated		0	1845 \pm 22	1,79 \pm 0	0	0	0
		7	1845 \pm 22 ^A	1,79 \pm 0,001 ^A	0	0	0
		14	1797 \pm 74 ^A	1,81 \pm 0,01 ^A	0	0	0
		21	1726 \pm 58 ^A	1,81 \pm 0,01 ^A	0	0	0
		28	1814 \pm 43 ^A	1,82 \pm 0 ^A	0	0	0
		35	1597 \pm 64 ^A	1,82 \pm 0,03 ^A	0	0	0
0	0	0	1845 \pm 22	1,79 \pm 0	0	0	0
		7	684 \pm 26 ^{Bb}	1,78 \pm 0,01 ^{ABa}	0,49 \pm 0,5 ^{Db}	2,24 \pm 1,94 ^{DEa}	2,6 \pm 2,6 ^{Ba}
		14	476 \pm 73 ^{BCc}	1,32 \pm 0,18 ^{BCbc}	2,74 \pm 0,28 ^{CDa}	0,17 \pm 0,17 ^{Cb}	0 \pm 0 ^{Bb}
		21	453 \pm 38 ^{BCc}	1,21 \pm 0,35 ^{Bc}	0,3 \pm 0,52 ^{Bb}	0 \pm 0 ^{Db}	0,3 \pm 0,3 ^{Bb}
		28	417 \pm 32 ^{BCcd}	1,5 \pm 0,16 ^{Cb}	0,32 \pm 0,48 ^{Bb}	0 \pm 0 ^{Bb}	0,1 \pm 0,1 ^{Cb}
		35	346 \pm 77 ^{BCd}	1,54 \pm 0,1 ^{Cab}	0 \pm 0 ^{Cb}	0,42 \pm 0,42 ^{ABb}	1,11 \pm 0,61 ^{Bab}
0	4	0	1845 \pm 22	1,79 \pm 0	0	0	0
		7	624 \pm 7 ^{BCb}	1,78 \pm 0,01 ^{ABa}	4,24 \pm 1,05 ^{CDb}	0 \pm 0 ^{Eb}	2,15 \pm 0,39 ^{Ba}
		14	398 \pm 121 ^{BC} Dc	1,04 \pm 0,3 ^{CDc}	12,24 \pm 2,87 ^{Ba}	0,36 \pm 0,36 ^{Ca}	0,68 \pm 0,22 ^{Bb}
		21	300 \pm 32 ^{FGd}	1,04 \pm 0,18 ^{BCc}	3,04 \pm 3,4 ^{Bbc}	0 \pm 0 ^{Db}	0 \pm 0 ^{Bc}
		28	272 \pm 32 ^{EFde}	1,21 \pm 0,12 ^{Dbc}	2,5 \pm 2,34 ^{Bbc}	0 \pm 0 ^{Bb}	1,02 \pm 1,12 ^{BCb}
		35	198 \pm 60 ^{EFe}	1,39 \pm 0,1 ^{Db}	3,87 \pm 2,99 ^{Bbc}	0 \pm 0 ^{Bb}	1,06 \pm 0,47 ^{Bb}
0	16	0	1845 \pm 22	1,79 \pm 0	0	0	0
		7	699 \pm 12 ^{Bb}	1,65 \pm 0,28 ^{ABCa}	3,94 \pm 1,66 ^{CDb}	1,82 \pm 0 ^{Ea}	1,27 \pm 0,2 ^{Babc}
		14	344 \pm 89 ^{Dc}	0,94 \pm 0,12 ^{Dc}	24,53 \pm 6,76 ^{Aa}	0 \pm 0 ^{Cb}	0,41 \pm 0,41 ^{Bbc}

		21	273±45 ^{Gd}	0,88±0,08 ^{Cc}	22,71±12,14 ^{Aa}	0±0 ^{Db}	0,16±0,16 ^{Bc}
		28	240±34 ^{Fd}	1,04±0,1 ^{Ebc}	18,98±9,1 ^{Aa}	0±0 ^{Bb}	2,25±2,25 ^{ABCab}
		35	151±34 ^{Fe}	1,2±0,07 ^{Eb}	19,41±6,72 ^{Aa}	0±0 ^{Bb}	2,9±0,41 ^{ABa}
0,2	0	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	568±104 ^{CD} Eb	1,75±0,04 ^{ABCa}	21,34±5,07 ^{Aa}	19,17±5,94 ^{Aa}	10,89±7,38 ^{Aa}
		14	498±92 ^{Bb}	1,64±0,3 ^{ABa}	5,8±3,97 ^{Cb}	4,26±4,26 ^{BCb}	5,54±5,54 ^{Ba}
		21	500±58 ^{Bb}	1,8±0,01 ^{Aa}	1,47±0,88 ^{Bbc}	0±0 ^{Db}	0±0 ^{Ba}
		28	472±90 ^{Bbc}	1,82±0,02 ^{Aa}	2,15±1,79 ^{Bbc}	0±0 ^{Bb}	6,13±6,13 ^{ABCa}
		35	369±82 ^{Bc}	1,81±0,02 ^{Aa}	1,61±1,15 ^{BCbc}	1,26±1,26 ^{ABb}	9,22±7,66 ^{Aa}
0,2	4	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	433±102 ^{GH} b	1,58±0,19 ^{Ca}	13,96±3,7 ^{Ba}	14,98±3 ^{Aa}	10,01±10,01 ^{Aa}
		14	374±103 ^{CD} bc	1,53±0,42 ^{ABa}	2,32±1,17 ^{CDb}	6,1±6,1 ^{BCb}	0,5±0,5 ^{Ba}
		21	323±35 ^{EFGb} c	1,76±0,05 ^{Aa}	4,23±5,45 ^{Bb}	0,07±0,07 ^{Dc}	4,47±4,47 ^{Aaa}
		28	344±70 ^{DEbc}	1,79±0,04 ^{Aa}	2,21±1,46 ^{Bb}	14,65±0,55 ^{Aa}	6,37±1,5 ^{ABa}
		35	281±89 ^{CDEc}	1,79±0,03 ^{Aa}	1,51±0,9 ^{BCb}	1,59±1,59 ^{ABbc}	2,36±2,36 ^{ABa}
0,2	16	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	428±31 ^{Hb}	1,39±0,07 ^{Db}	5,27±4,85 ^{Ca}	1,23±1,23 ^{Eb}	0±0 ^{Ba}
		14	354±12 ^{Dc}	1,53±0,33 ^{ABb}	3,4±4,48 ^{CDab}	17,25±17,25 ^{ABa}	7,47±7,47 ^{Ba}
		21	316±47 ^{EFGc} d	1,75±0,05 ^{Aa}	1,42±0,23 ^{Bab}	10,07±2,79 ^{Aab}	0±0 ^{Ba}
		28	307±14 ^{DEFd}	1,78±0,02 ^{Aa}	1,67±0,76 ^{Bab}	1,7±1,7 ^{Bb}	0±0 ^{Ca}
		35	241±7 ^{DEe}	1,79±0,03 ^{Aa}	1,28±0,33 ^{BCab}	7,61±7,61 ^{Aab}	6,5±6,5 ^{ABa}
0,8	0	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	537±29 ^{CDEF} b	1,77±0,03 ^{ABCa}	11,32±2,12 ^{Ba}	9,05±3,78 ^{Ba}	0±0 ^{Bb}
		14	478±34 ^{BCc}	1,63±0,26 ^{ABa}	3,38±3,93 ^{Cdb}	1,23±1,23 ^{Cbc}	0±0 ^{Bb}
		21	425±28 ^{Cd}	1,77±0,07 ^{Aa}	1,13±0,62 ^{Bbc}	0±0 ^{Dc}	0±0 ^{Bb}
		28	367±37 ^{CDe}	1,81±0,01 ^{Aa}	0,81±0,28 ^{Bbc}	1,59±1,59 ^{Bbc}	1,48±1,48 ^{ABCab}
		35	294±32 ^{BCDf}	1,81±0,02 ^{Aa}	1±0,24 ^{BCbc}	4,96±4,96 ^{ABab}	7,58±7,58 ^{ABa}
0,8	4	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	451±61 ^{FGBb}	1,66±0,1 ^{ABCab}	3,36±2,53 ^{CDa}	7,4±4,1 ^{BCab}	0±0 ^{Bb}
		14	355±15 ^{Dc}	1,55±0,25 ^{ABb}	1,73±1,99 ^{CDab}	10,08±8,2 ^{BCa}	1,48±1,48 ^{Ba}
		21	326±15 ^{EFGc}	1,69±0,05 ^{Aab}	0,72±0,47 ^{Bb}	6,73±3,06 ^{Bab}	0±0 ^{Bb}
		28	309±32 ^{DEFc}	1,74±0,05 ^{ABa}	0,93±0,8 ^{Bb}	4,64±4,64 ^{Bab}	0±0 ^{Cb}
		35	209±18 ^{EFd}	1,78±0,02 ^{Aa}	0,72±0,47 ^{BCb}	3,32±3,32 ^{ABab}	0±0 ^{Bb}

0,8	16	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	448±51 ^{FGHb}	1,42±0,1 ^{Db}	3,43±2,34 ^{CDa}	0±0 ^{Ec}	0±0 ^{Ba}
		14	380±26 ^{CDc}	1,55±0,27 ^{ABb}	0,93±0,75 ^{CDb}	8,74±0,32 ^{BCa}	0±0 ^{Ba}
		21	322±39 ^{EFGd}	1,75±0,03 ^{Aa}	0,65±0,36 ^{Bb}	0,58±0,58 ^{Dbc}	0±0 ^{Ba}
		28	295±12 ^{DEFd}	1,79±0,01 ^{Aa}	0,77±0,43 ^{Bb}	1,7±1,7 ^{Bb}	0±0 ^{Ca}
		35	210±14 ^{EFe}	1,78±0,01 ^{Aa}	0,66±0,14 ^{BCb}	0±0 ^{Bc}	0±0 ^{Ba}
3,2	0	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	593±94 ^{CDb}	1,75±0,03 ^{ABCa}	5,71±0,84 ^{Ca}	3,96±3,96 ^{CDEa}	2,25±0,88 ^{Bab}
		14	480±55 ^{BCc}	1,57±0,23 ^{ABb}	4,59±4,32 ^{CDa}	4,81±4,81 ^{BCa}	0±0 ^{Bb}
		21	411±15 ^{CDc}	1,72±0,04 ^{Aa}	2,2±1,69 ^{Bab}	4,73±4,73 ^{BCa}	0±0 ^{Bb}
		28	330±63 ^{DEd}	1,73±0,04 ^{ABa}	3,85±2,46 ^{Bab}	2,6±2,6 ^{Ba}	7,25±7,25 ^{Aa}
		35	272±19 ^{CDEd}	1,75±0,05 ^{ABa}	3,6±2,11 ^{BCab}	7,34±7,34 ^{ABa}	3,56±3,56 ^{ABab}
3,2	4	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	522±30 ^{DEFG} b	1,7±0,04 ^{ABCab}	5,79±1,26 ^{Ca}	1,34±0,72 ^{Eb}	1,24±1,24 ^{Bab}
		14	417±29 ^{BCDc}	1,62±0,18 ^{ABb}	1±0,36 ^{CDbc}	4,02±4,02 ^{BCab}	0±0 ^{Bb}
		21	338±17 ^{EFd}	1,62±0,08 ^{Ab}	1,28±0,95 ^{Bb}	0±0 ^{Db}	0±0 ^{Bb}
		28	318±35 ^{DEd}	1,73±0,05 ^{ABab}	1,01±0,39 ^{Bbc}	10,84±9,31 ^{Aa}	4,33±4,33 ^{ABCa}
		35	240±28 ^{DEe}	1,75±0,04 ^{ABab}	1,7±0,93 ^{BCb}	6,44±6,44 ^{ABab}	1,26±1,26 ^{Bab}
3,2	16	0	1845±22	1,79±0	0	0	0
		7	480±38 ^{EFGH} b	1,61±0,13 ^{BCb}	2,74±0,68 ^{CDab}	6,68±0,52 ^{BCDb}	0±0 ^{Bb}
		14	437±74 ^{BCDb}	1,58±0,16 ^{ABb}	0,39±0,3 ^{CDd}	26,41±17,96 ^{Aa}	19,61±19,61 ^{Aa}
		21	361±21 ^{DEc}	1,65±0,05 ^{Ab}	0,9±0,14 ^{Bcd}	2,2±0 ^{CDb}	0±0 ^{Bb}
		28	308±26 ^{DEFc}	1,64±0,04 ^{Bb}	1,88±1,05 ^{Bbc}	0,06±0,06 ^{Bb}	0±0 ^{Cb}
		35	242±18 ^{DEd}	1,68±0,04 ^{Bab}	3,31±1,43 ^{BCa}	0,98±0,98 ^{ABb}	0,22±0,22 ^{Bb}

Πίνακας 7.2: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος μη αποστειρωμένων ΥΑΕ (25% v/v) μετά την προσθήκη υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Abortiporus biennis* και επώαση επί 4, 24 και 48 h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (4 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση). Ανόμοιοι εκθέτες με κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων, ενώ ανόμοιοι εκθέτες με μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών από διαφορετικές χρονικές στιγμές για την ίδια επέμβαση.

N (g/L)	Mg + Cu (mg/l)	Ημέρ α	Ολικά φαινολικά (mg/L)			Χρώμα		
			4h	24h	48h	4h	24h	48h
Non inoculated		7	1749±37 ^{Aa}	1762±9 ^{Aa}	1696±47 ^{Ab}	1,61±0,03 ^{Db}	1,71±0,03 ^{ABb}	1,79±0,01 ^{Aa}
		14	1824±51 ^{ABaC}	1764±37 ^{Aa}	1781±48 ^{Aab}	1,64±0,02 ^{BCDab}	1,73±0,02 ^{Dab}	1,77±0,02 ^{BCDEa}
		21	1760±48 ^{Aa}	1767±55 ^{Aa}	1825±69 ^{Aa}	1,71±0,05 ^{Aa}	1,77±0,01 ^{CDa}	1,78±0,01 ^{BCa}
		28	1788±94 ^{Aa}	1753±54 ^{Aa}	1769±56 ^{Aab}	1,63±0,07 ^{CDab}	1,72±0,02 ^{EFGb}	1,77±0,03 ^{CDEa}
		35	1773±127 ^{Aa}	1810±86 ^{Aa}	1718±73 ^{Ab}	1,61±0,06 ^{Ab}	1,72±0,04 ^{CDb}	1,75±0,05 ^{Ba}
0	0	7	1682±7 ^{ABa}	1380±394 ^{BCDc}	1446±15 ^{Bc}	1,65±0,01 ^{ABCa}	1,52±0,3 ^{ABa}	1,78±0,02 ^{ABCa}
		14	1474±200 ^{Da}	1399±105 ^{Ebc}	1459±33 ^{Cc}	1,58±0,02 ^{Eb}	1,72±0,02 ^{Da}	1,74±0,04 ^{EFab}
		21	1541±319 ^{Ba}	1681±22 ^{ABab}	1648±25 ^{Bb}	1,62±0,02 ^{EFab}	1,68±0,04 ^{Ea}	1,73±0,02 ^{Fab}
		28	1593±82 ^{CDa}	1606±64 ^{Bacb}	1643±27 ^{Bb}	1,61±0,04 ^{Dab}	1,71±0,03 ^{FEa}	1,76±0,01 ^{DEa}
		35	1638±18 ^{ABa}	1785±19 ^{ABa}	1740±38 ^{Aa}	1,49±0,04 ^{DEc}	1,63±0,02 ^{Fa}	1,7±0,05 ^{Cb}
0	4	7	1641±90 ^{ABa}	1537±80 ^{Bbc}	1370±87 ^{BCc}	1,64±0,02 ^{BCa}	1,73±0,07 ^{Aab}	1,78±0,01 ^{Aa}
		14	1518±179 ^{Da}	1461±69 ^{Ec}	1439±138 ^{Cc}	1,56±0,03 ^{Ec}	1,76±0,02 ^{Ca}	1,73±0,03 ^{Fc}
		21	1682±31 ^{ABa}	1722±34 ^{ABa}	1669±32 ^{Bb}	1,57±0,04 ^{Gbc}	1,66±0,04 ^{Ec}	1,74±0,02 ^{BCbc}
		28	1572±59 ^{BCa}	1635±44 ^{Bab}	1558±25 ^{BCb}	1,62±0,04 ^{CDab}	1,69±0,03 ^{Gbc}	1,76±0,01 ^{DEab}
		35	1667±68 ^{ABa}	1687±88 ^{BCa}	1820±24 ^{Aa}	1,51±0,03 ^{DEd}	1,66±0,02 ^{EFc}	1,68±0,02 ^{Cd}
0	16	7	1578±98 ^{Bb}	1413±99 ^{BCDc}	1315±167 ^{BCDc}	1,66±0,03 ^{ABa}	1,38±0,33 ^{Bb}	1,78±0,01 ^{ABa}
		14	1796±75 ^{ABCa}	1665±73 ^{ABCDa}	1632±57 ^{Bab}	1,68±0,03 ^{Aa}	1,77±0,02 ^{BCa}	1,77±0,02 ^{ABCDa}
		21	1687±27 ^{ABab}	1635±83 ^{Bac}	1617±57 ^{Bb}	1,6±0,02 ^{FGb}	1,68±0,01 ^{Ea}	1,75±0 ^{DEab}
		28	1522±46 ^{BCDb}	1506±42 ^{Cbc}	1495±22 ^{Cb}	1,61±0,02 ^{CDb}	1,73±0,02 ^{DEFa}	1,74±0,06 ^{Eab}
		35	1517±181 ^{BCb}	1751±160 ^{ABa}	1760±58 ^{Aa}	1,48±0,02 ^{Ec}	1,68±0,02 ^{Ea}	1,71±0,02 ^{Cb}
0,2	0	7	1647±145 ^{ABa}	1371±91 ^{BCDb}	1258±138 ^{CDEbc}	1,68±0,03 ^{ABa}	1,68±0,17 ^{ABb}	1,79±0,01 ^{Ab}
		14	1649±68 ^{CDa}	1434±92 ^{Ab}	1301±92 ^{EFab}	1,66±0,02 ^{ABCa}	1,8±0,01 ^{Aab}	1,8±0,02 ^{ABab}
		21	1694±49 ^{ABa}	1409±37 ^{Cb}	1195±80 ^{CDbc}	1,69±0,02 ^{ABa}	1,81±0,01 ^{Aa}	1,8±0,02 ^{ABab}
		28	1594±49 ^{Ba}	1437±26 ^{CDb}	1132±82 ^{EFc}	1,69±0,04 ^{ABa}	1,79±0,03 ^{ABab}	1,81±0,01 ^{Aa}
		35	1607±39 ^{BCa}	1673±13 ^{BCa}	1422±81 ^{BCa}	1,61±0,03 ^{Ab}	1,77±0,02 ^{Aab}	1,81±0 ^{Aab}

0,2	4	7	1543±106 ^{Bb}	1275±73 ^{CDEc}	1199±85 ^{DEFb}	1,69±0,01 ^{Aab}	1,59±0,39 ^{ABa}	1,78±0,01 ^{ABCb}
		14	1755±70 ^{ABCa}	1612±100 ^{BCDa}	1352±77 ^{CDEFa}	1,68±0,01 ^{ABab}	1,79±0,01 ^{ABa}	1,79±0,01 ^{ABCDb}
		21	1642±77 ^{ABab}	1373±40 ^{Cb}	1195±41 ^{CDb}	1,66±0,03 ^{BCEb}	1,8±0,01 ^{Aba}	1,82±0 ^{Aa}
		28	1569±61 ^{BCb}	1378±21 ^{DEb}	1146±117 ^{DEb}	1,7±0,02 ^{ABa}	1,8±0,01 ^{Aa}	1,79±0,01 ^{ABCDb}
		35	1600±81 ^{BCb}	1560±41 ^{DEa}	1354±41 ^{CDa}	1,6±0,02 ^{Ac}	1,77±0,01 ^{ABa}	1,79±0,02 ^{Ab}
0,2	16	7	1404±19 ^{Cd}	1075±35 ^{Ec}	951±49 ^{Gc}	1,67±0,01 ^{ABb}	1,73±0,08 ^{Ab}	1,76±0,01 ^{CDEc}
		14	1778±70 ^{ABCa}	1575±93 ^{Da}	1311±78 ^{DEFa}	1,68±0,02 ^{Ab}	1,78±0,02 ^{ABa}	1,8±0,01 ^{Aa}
		21	1598±48 ^{Bb}	1344±39 ^{Cb}	1123±70 ^{Db}	1,66±0,02 ^{BCEb}	1,79±0 ^{ABCa}	1,8±0,02 ^{ABCab}
		28	1517±44 ^{BCDc}	1314±35 ^{EFb}	1029±23 ^{FGc}	1,7±0,01 ^{ABa}	1,79±0 ^{Aa}	1,79±0,02 ^{ABCDAb}
		35	1626±45 ^{ABb}	1534±58 ^{DEa}	1327±64 ^{CDa}	1,59±0,01 ^{ABc}	1,77±0,01 ^{Aab}	1,78±0,01 ^{ABbc}
0,8	0	7	1402±36 ^{Cc}	1187±56 ^{DEd}	1076±50 ^{FGb}	1,67±0,02 ^{ABb}	1,74±0,04 ^{Ab}	1,77±0,01 ^{BCDc}
		14	1859±34 ^{ABa}	1676±96 ^{ABCDa}	1416±69 ^{CDa}	1,65±0,04 ^{ABCDBb}	1,78±0,01 ^{ABCa}	1,78±0,02 ^{ABCDBc}
		21	1581±42 ^{Bb}	1369±65 ^{Cc}	1156±22 ^{CDBb}	1,67±0,02 ^{ABCb}	1,8±0 ^{Aba}	1,8±0,02 ^{ABCab}
		28	1529±37 ^{BCDBb}	1322±67 ^{EFc}	1125±69 ^{EFb}	1,72±0,02 ^{Aa}	1,78±0,01 ^{ABCa}	1,81±0,01 ^{ABa}
		35	1536±93 ^{BCb}	1496±91 ^{DEb}	1451±214 ^{BCa}	1,61±0,02 ^{Ac}	1,76±0,01 ^{ABCab}	1,79±0,01 ^{Aab}
0,8	4	7	1561±101 ^{Bb}	1272±119 ^{CDEb}	1152±56 ^{EFbc}	1,67±0,04 ^{ABab}	1,56±0,2 ^{ABb}	1,77±0,01 ^{ABCa}
		14	1793±60 ^{ABCa}	1683±58 ^{ABCDa}	1382±57 ^{CDEa}	1,65±0,03 ^{ABCDBc}	1,78±0,02 ^{ABCa}	1,79±0,01 ^{ABCa}
		21	1539±38 ^{Bbc}	1365±63 ^{Cb}	1131±41 ^{Dc}	1,68±0,02 ^{ABab}	1,78±0,02 ^{BCDa}	1,79±0,02 ^{BCa}
		28	1448±30 ^{Dc}	1319±57 ^{EFb}	1073±14 ^{EFGc}	1,7±0,03 ^{ABa}	1,78±0,01 ^{ABCa}	1,79±0,02 ^{ABCDA}
		35	1551±57 ^{BCb}	1364±50 ^{Fb}	1251±137 ^{Db}	1,61±0,02 ^{Ac}	1,75±0,02 ^{ABCa}	1,79±0,01 ^{Aa}
0,8	16	7	1562±132 ^{Bb}	1233±104 ^{DEc}	1109±87 ^{EFb}	1,64±0,02 ^{BCb}	1,59±0,3 ^{ABa}	1,77±0,01 ^{CDc}
		14	1949±273 ^{Aa}	1592±46 ^{CDa}	1254±17 ^{Fb}	1,68±0,02 ^{ABa}	1,78±0,01 ^{ABCa}	1,76±0,01 ^{CDEc}
		21	1548±51 ^{Bb}	1328±71 ^{Cc}	1164±69 ^{CDab}	1,67±0,01 ^{BCEa}	1,78±0,01 ^{BCDa}	1,78±0,02 ^{BCb}
		28	1483±62 ^{CDBb}	1310±42 ^{EFc}	1091±43 ^{EFGb}	1,69±0,01 ^{ABa}	1,75±0,05 ^{BCDEa}	1,8±0 ^{ABCa}
		35	1449±158 ^{Cb}	1462±41 ^{EFb}	1259±64 ^{Da}	1,57±0,01 ^{ABCc}	1,73±0,06 ^{CDa}	1,79±0,01 ^{Aab}
3,2	0	7	1669±40 ^{ABb}	1475±89 ^{BCbc}	1420±107 ^{Bab}	1,65±0,02 ^{ABCab}	1,71±0,06 ^{ABb}	1,77±0 ^{CDbc}
		14	1901±52 ^{ABa}	1720±16 ^{ABa}	1368±28 ^{CDEbc}	1,62±0,03 ^{Db}	1,78±0,01 ^{ABCa}	1,76±0,02 ^{DEc}
		21	1588±49 ^{Bbc}	1303±198 ^{Cc}	1226±59 ^{Cd}	1,63±0,02 ^{DEFab}	1,76±0,02 ^{Da}	1,78±0,02 ^{BCab}
		28	1538±80 ^{BCDc}	1328±103 ^{EFc}	1250±137 ^{Dcd}	1,68±0,02 ^{ABa}	1,75±0 ^{BCDEa}	1,77±0,01 ^{BCDEabc}
		35	1579±91 ^{BCbc}	1592±19 ^{CDb}	1549±30 ^{Ba}	1,57±0,06 ^{ABCc}	1,74±0,01 ^{ABCab}	1,79±0 ^{Aa}
3,2	4	7	1596±74 ^{Bb}	1327±143 ^{BCDc}	1235±151 ^{CDEa}	1,65±0,03 ^{BCa}	1,74±0,01 ^{Ac}	1,75±0,01 ^{DEb}
		14	1839±35 ^{ABCa}	1705±27 ^{ABCa}	1317±48 ^{DEFa}	1,65±0,02 ^{ABCDA}	1,78±0,02 ^{ABCab}	1,77±0,01 ^{ABCDA}
		21	1567±10 ^{Bbc}	928±90 ^{Dd}	847±22 ^{Ec}	1,64±0 ^{CDEa}	1,79±0,01 ^{ABCDA}	1,78±0,01 ^{CDa}
		28	1499±58 ^{BCDc}	1272±83 ^{Fc}	1002±62 ^{Gb}	1,66±0,03 ^{BCa}	1,76±0,01 ^{BCDb}	1,78±0,01 ^{ABCDA}
		35	1602±67 ^{BCb}	1504±58 ^{DEb}	1386±116 ^{CDa}	1,54±0,05 ^{BCDBb}	1,73±0,01 ^{BCDc}	1,78±0,01 ^{ABa}
3,2	16	7	1596±30 ^{Bab}	1338±49 ^{BCDBb}	1237±38 ^{CDEbc}	1,62±0,02 ^{CDBb}	1,74±0 ^{Ab}	1,75±0,01 ^{Eb}
		14	1718±95 ^{BCa}	1613±80 ^{BCDa}	1307±41 ^{DEFb}	1,63±0,02 ^{CDBb}	1,77±0,01 ^{BCa}	1,77±0,01 ^{CDEab}
		21	1627±52 ^{ABab}	958±105 ^{Dc}	856±21 ^{Ed}	1,63±0,01 ^{DEab}	1,77±0,02 ^{BCDa}	1,78±0,02 ^{BCa}
		28	1509±23 ^{BCDa}	1343±76 ^{EFb}	1163±33 ^{DEc}	1,66±0,01 ^{BCDa}	1,75±0,02 ^{CDEb}	1,78±0,02 ^{ABCDA}

		35	1511 ± 160^{BCa}	1519 ± 78^{DEa}	1431 ± 130^{BCa}	$1,52 \pm 0,02^{CDEc}$	$1,69 \pm 0,01^{DEc}$	$1,77 \pm 0,01^{ABab}$
--	--	----	----------------------	---------------------	----------------------	------------------------	-----------------------	------------------------

Πίνακας 7.3: Οι μετρήσεις μετά το τέλος του πειράματος εκφρασμένες ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση). Ανόμοιοι εκθέτες δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ τιμών διαφορετικών επεμβάσεων.

Επέμβαση	Βιομάζα (g)	pH	Αγωγιμότητα (mS/cm)	Δείκτης Βλαστικότητας (GI%)
Νερό	-	-	-	100 ^a
Αρχικό	-	5,83 \pm 0,58 ^c	3,32 \pm 0,03 ^{ab}	-
Μάρτυρας	0,014 \pm 0,01 ^a	5,4 \pm 0,25 ^b	3,35 \pm 0,12 ^{ab}	13,04348 ^b
1	0,26 \pm 0,04 ^{bc}	5,1 \pm 0,32 ^a	3,2 \pm 0,5 ^a	0 ^c
2	0,28 \pm 0,01 ^{bcd}	5,5 \pm 0,21 ^{bc}	3,15 \pm 0,05 ^a	0 ^c
3	0,28 \pm 0,02 ^{bcd}	5,6 \pm 0,27 ^{bc}	3,26 \pm 0,12 ^a	6,521739 ^{bc}
4	0,24 \pm 0,02 ^b	8,29 \pm 0,19 ^{hi}	3,76 \pm 0,39 ^b	4,347826 ^{bc}
5	0,25 \pm 0,02 ^b	8,19 \pm 0,28 ^{ghi}	3,54 \pm 0,07 ^{ab}	6,521739 ^{bc}
6	0,28 \pm 0,05 ^{bcd}	8,38 \pm 0,13 ⁱ	3,51 \pm 0,2 ^{ab}	13 ^b
7	0,25 \pm 0,02 ^b	8,09 \pm 0,22 ^{fghi}	5,64 \pm 0,14 ^c	2 ^{bc}
8	0,27 \pm 0,02 ^{bc}	7,56 \pm 0,25 ^d	5,83 \pm 0,24 ^c	7 ^{bc}
9	0,25 \pm 0,04 ^b	7,81 \pm 0,2 ^{def}	5,91 \pm 0,17 ^c	2,173913 ^{bc}
10	0,31 \pm 0,03 ^{cd}	7,87 \pm 0,06 ^{defg}	15,57 \pm 0,58 ^d	0 ^c
11	0,32 \pm 0,01 ^{de}	8,04 \pm 0,19 ^d	15,34 \pm 0,61 ^d	0 ^c
12	0,37 \pm 0,06 ^e	7,72 \pm 0,05 ^{de}	15,63 \pm 0,27 ^d	0 ^c

8 Βιβλιογραφία

- Abid, N., Chamkha, M., Godon, J. J., & Sayadi, S. (2007). Involvement of microbial populations during the composting of olive mill wastewater sludge. *Environmental Technology*, 28(7), 751-760.
- Adhoum, N., & Monser, L. (2004). Decolourization and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 43(10), 1281-1287.
- Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tsarbopoulos, A., Gikas, E., ... & Manios, T. (2007). A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2671-2676.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., & Zervakis, G. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 353-360.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., ... & Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, 37(16), 3897-3904.
- Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mofarra, E., & Mehranian, M. (2005). Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 123(1), 187-195.
- Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mehranian, M., & Mofarra, E. (2006). Phenolic removal in olive oil mill wastewater using loofah-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 119-127.
- Aktas, E. S., Imre, S., & Ersoy, L. (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 35(9), 2336-2340.

- Albuquerque, J. A., González, J., García, D., & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, *91*(2), 195-200.
- Al-Malah, K., Azzam, M. O., & Abu-Lail, N. I. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separation and Purification Technology*, *20*(2), 225-234.
- Ammary, B. Y. (2005). Treatment of olive mill wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor. *Desalination*, *177*(1-3), 157-165.
- Andreozzi, R., Longo, G., Majone, M., & Modesti, G. (1998). Integrated treatment of olive oil mill effluents (OME): study of ozonation coupled with anaerobic digestion. *Water Research*, *32*(8), 2357-2364.
- Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (1997). Codigestion of olive oil mill wastewaters with manure, household waste or sewage sludge. *Biodegradation*, *8*(4), 221-226.
- Angelidaki, I., Ahring, B. K., Deng, H., & Schmidt, J. E. (2002). Anaerobic digestion of olive oil mill effluents together with swine manure in UASB reactors. *Water Science and Technology*, *45*(10), 213-218.
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J. A., & García-Romera, I. (2006). Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *58*(3), 176-179.
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., & Legge, R. L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, *19*(6), 771.
- Assas, N., Marouani, L., & Hamdi, M. (2000). Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering*, *22*(6), 503-507.
- Azabou, S., Najjar, W., Bouaziz, M., Ghorbel, A., & Sayadi, S. (2010). A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining wet hydrogen peroxide catalytic oxidation and biological techniques. *Journal of Hazardous Materials*, *183*(1), 62-69.
- Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., & Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *34*(3), 209-247.

- Azzam, M. O., Al-Malah, K. I., & Abu-Lail, N. I. (2004). Dynamic post-treatment response of olive mill effluent wastewater using activated carbon. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 39(1), 269-280.
- Baldrian, P. (2004). Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(5), 560-563.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242.
- Beccari, M., Majone, M., & Torrisi, L. (1998). Two-reactor system with partial phase separation for anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Water Science and Technology*, 38(4-5), 53-60.
- Beccari, M., Majone, M., Riccardi, C., Savarese, F., & Torrisi, L. (1999). Integrated treatment of olive oil mill effluents: effect of chemical and physical pretreatment on anaerobic treatability. *Water Science and Technology*, 40(1), 347-355.
- Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., Garcia, J., Domínguez, J. R., & Tierno, J. C. (2001). Degradation of olive mill wastewater by the combination of Fenton's reagent and ozonation processes with an aerobic biological treatment. *Water Science and Technology*: 44(5), 103-108.
- Benitez, F. J., Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., & Acero, J. L. (1997). Improvement of the anaerobic biodegradation of olive mill wastewaters by prior ozonation pretreatment. *Bioprocess Engineering*, 17(3), 169-175.
- Benitez, F. J., Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., & Acero, J. L. (1999). Treatment of olive mill wastewaters by ozonation, aerobic degradation and the combination of both treatments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 639-646.
- Bertin, L., Majone, M., Di Gioia, D., & Fava, F. (2001). An aerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *Journal of Biotechnology*, 87(2), 161-177.
- Bertin, L., Berselli, S., Fava, F., Petrangeli-Papini, M., & Marchetti, L. (2004a). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with granular activated carbon and “Manville” silica beads. *Water Research*, 38(14), 3167-3178.

- Bertin, L., Colao, M. C., Ruzzi, M., & Fava, F. (2004b). Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 413-423.
- Bertin, L., Colao, M. C., Ruzzi, M., Marchetti, L., & Fava, F. (2006). Performances and microbial features of an aerobic packed-bed biofilm reactor developed to post-treat an olive mill effluent from an anaerobic GAC reactor. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 16.
- Bertin, L., Lampis, S., Todaro, D., Scoma, A., Vallini, G., Marchetti, L., ... & Fava, F. (2010). Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water Research*, 44(15), 4537-4549.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519-546.
- Borja, R., Martin, A., & Alonso, V. (1992). Influence of the microorganism support on the kinetics of anaerobic fermentation of condensation water from thermally concentrated olive mill wastewater. *Biodegradation*, 3(1), 93-103.
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267(1), 99-102.
- Bouزيد, O., Navarro, D., Roche, M., Asther, M., Haon, M., Delattre, M., ... & Lesage-Meessen, L. (2005). Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochemistry*, 40(5), 1855-1862.
- Bressan, M., Liberatore, L., d'Alessandro, N., Tonucci, L., Belli, C., & Ranalli, G. (2004). Improved combined chemical and biological treatments of olive oil mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1228-1233.
- Caporaso, N., Formisano, D., & Genovese, A. (2017). Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G., & Cascio, B. L. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-966.

- Ceccon, L., Saccù, D., Procida, G., & Cardinali, S. (2001). Liquid chromatographic determination of simple phenolic compounds in waste waters from olive oil production plants. *Journal of AOAC International*, 84(6), 1739-1744.
- Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., & Garcia, D. (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 193-203.
- Cereti, C. F., Rossini, F., Federici, F., Quaratino, D., Vassilev, N., & Fenice, M. (2004). Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bioresource Technology*, 91(2), 135-140.
- Cox, L., Celis, R., Hermosin, M. C., Becker, A., & Cornejo, J. (1997). Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 65(2), 151-161.
- Dalis, D., Anagnostidis, K., Lopez, A., Letsiou, I., & Hartmann, L. (1996). Anaerobic digestion of total raw olive-oil wastewater in a two-stage pilot-plant (up-flow and fixed-bed bioreactors). *Bioresource Technology*, 57(3), 237-243.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., & Sermanni, G. G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 34(6), 697-706.
- D'Annibale, A., Quaratino, D., Federici, F., & Fenice, M. (2006). Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 243-249.
- del Bubba, M., Checchini, L., Pifferi, C., Zanieri, L., & Lepri, L. (2004). Olive Mill Wastewater Treatment by a Pilot- Scale Subsurface Horizontal Flow (SSF- h) Constructed Wetland. *Annali di chimica*, 94(12), 875-887.
- Dhouib, A., Aloui, F., Hamad, N., & Sayadi, S. (2006a). Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration. *Process Biochemistry*, 41(1), 159-167.
- Dhouib, A., Ellouz, M., Aloui, F., & Sayadi, S. (2006b). Effect of bioaugmentation of activated sludge with white- rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology*, 42(4), 405-411.
- Di Caprio, F., Altamari, P., & Pagnanelli, F. (2015). Integrated biomass production and biodegradation of olive mill wastewater by cultivation of *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, 9, 306-311.

- Di Gioia, D., Barberio, C., Spagnesi, S., Marchetti, L., & Fava, F. (2002). Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, *178*(3), 208-217.
- Drouiche, M., Le Mignot, V., Lounici, H., Belhocine, D., Grib, H., Paus, A., & Mameri, N. (2004). A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining OF and UV/H₂O₂ techniques. *Desalination*, *169*(1), 81-88.
- Duarte, K. R., Freitas, A. C., Pereira, R., Pinheiro, J. C., Gonçalves, F., Azaari, H., ... & Rocha-Santos, T. A. (2012). Treatment of olive oil mill wastewater by silica–alginate–fungi biocomposites. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*(7), 4307-4318.
- Ehaliotis, C., Papadopoulou, K., Kotsou, M., Mari, I., & Balis, C. (1999). Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, *30*(4), 301-311.
- Filidei, S., Masciandaro, G., & Ceccanti, B. (2003). Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: evaluation of wastewater organic load and phytotoxicity reduction. *Water, Air, & Soil Pollution*, *145*(1), 79-94.
- Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., & Saviozzi, A. (2002). Cocomposting of olive oil mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Compost science & utilization*, *10*(1), 63-71.
- Forgacs, E., Cserhati, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, *30*(7), 953-971.
- Fountoulakis, M. S., Dokianakis, S. N., Kornaros, M. E., Aggelis, G. G., & Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, *36*(19), 4735-4744.
- Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010). Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *85*(8), 1148-1155.
- Galhaup, C., Wagner, H., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (2001). Efficient production of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens*. *8 th ICBPPI*, 114.
- Gallardo- Lara, F., Azcon, M., & Polo, A. (2000). Phytoavailability and extractability of potassium, magnesium and manganese in calcareous soil amended with olive oil wastewater. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, *35*(5), 623-643.

- Galli, E., Pasetti, L., Fiorelli, F., & Tomati, U. (1997). Olive-mill wastewater composting: microbiological aspects. *Waste Management & Research*, 15(3), 323-330.
- García, I. G., Pena, P. J., Venceslada, J. B., Martín, A. M., Santos, M. M., & Gomez, E. R. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 35(8), 751-758.
- Georgacakis, D., & Dalis, D. (1993). Controlled anaerobic digestion of settled olive-oil wastewater. *Bioresource Technology*, 46(3), 221-226.
- Gernjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Caceres, J., Bauer, R., & Fernández-Alba, A. R. (2003). Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere*, 50(1), 71-78.
- Gernjak, W., Maldonado, M. I., Malato, S., Caceres, J., Krutzler, T., Glaser, A., & Bauer, R. (2004). Pilot-plant treatment of olive mill wastewater (OMW) by solar TiO₂ photocatalysis and solar photo-Fenton. *Solar Energy*, 77(5), 567-572.
- Ghaffar, S. H., & Fan, M. (2013). Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57, 264-279.
- Gianfreda, L., & Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 339-354.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78(2), 207-211.
- Gizgis, N., Georgiou, M., & Diamadopoulos, E. (2006). Sequential anaerobic/aerobic biological treatment of olive mill wastewater and municipal wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(9), 1563-1569.
- Gonçalves, C., Lopes, M., Ferreira, J. P., & Belo, I. (2009). Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100(15), 3759-3763.
- Hachicha, S., Sellami, F., Cegarra, J., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., & Ammar, E. (2009). Biological activity during co-composting of sludge issued from the OMW evaporation ponds with poultry manure—Physico-chemical

- characterization of the processed organic matter. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 402-409.
- Hamdi, M., & Ellouz, R. (1992a). Use of *Aspergillus niger* to improve filtration of olive mill waste- waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 53(2), 195-200.
- Hamdi M, Garcia JL and Ellouz R, (1992b). Integrated biological process for olive mill wastewater treatment. *Bioprocess Engineering* 8:79–84.
- Hamdi, M. (1996). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 31(2), 105-110.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes fungi: production and role from selected white-rot in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 125-135.
- Inan, H., Dimoglo, A., Şimşek, H., & Karpuzcu, M. (2004). Olive oil mill wastewater treatment by means of electro-coagulation. *Separation and Purification Technology*, 36(1), 23-31.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., & Parrella, A. (2004). Chemical and toxic evaluation of a biological treatment for olive-oil mill wastewater using commercial microbial formulations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 735-739.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., & Penninckx, M. J. (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 802-809.
- Jaouani, A., Tabka, M. G., & Penninckx, M. J. (2006). Lignin modifying enzymes of *Coriopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere*, 62(9), 1421-1430.
- Kaal, E. E., Field, J. A., & Joyce, T. W. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technology*, 53(2), 133-139.
- Kalmış, E., & Sargin, S. (2004). Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53(1), 43-47.

- Karageorgos, P., Coz, A., Charalabaki, M., Kalogerakis, N., Xekoukoulotakis, N. P., & Mantzavinos, D. (2006). Ozonation of weathered olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*(9), 1570-1576.
- Kestioglu, K., Yonar, T., & Azbar, N. (2005). Feasibility of physico-chemical treatment and advanced oxidation processes (AOPs) as a means of pretreatment of olive mill effluent (OME). *Process Biochemistry*, *40*(7), 2409-2416.
- Khoufi, S., Aloui, F., & Sayadi, S. (2006). Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*, *40*(10), 2007-2016.
- Khoufi, S., Aloui, F., & Sayadi, S. (2009). Pilot scale hybrid process for olive mill wastewater treatment and reuse. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *48*(2), 643-650.
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., & Sannia, G. (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*(1), 221-226.
- Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., & Kyriacou, A. (2004). The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, *26*(2), 113-121.
- Koutrotsios, G., & Zervakis, G. I. (2014). Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *BioMed Research international*, 2014.
- Koutrotsios, G., Larou, E., Mountzouris, K. C., & Zervakis, G. I. (2016). Detoxification of olive mill wastewater and bioconversion of olive crop residues into high-value-added biomass by the choice edible mushroom *Hericium erinaceus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *180*(2), 195-209.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., & Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, *169*(2), 247-250.
- Lafi, W. K., Shannak, B., Al-Shannag, M., Al-Anber, Z., & Al-Hasan, M. (2009). Treatment of olive mill wastewater by combined advanced oxidation and biodegradation. *Separation and Purification Technology*, *70*(2), 141-146.

- Levin, L., Forchiassin, F., & Ramos, A. M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, *94*(3), 377-383.
- Maciel, M. J. M., & Ribeiro, H. C. T. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(6), 14-15.
- Madejon, E., Tomati, U., & Galli, E. (1998). Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica (Italy)*.
- Mantzavinos, D., & Kalogerakis, N. (2005). Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes—an overview. *Environment International*, *31*(2), 289-295.
- Marques, I. P., Teixeira, A., Rodrigues, L., Dias, S. M., & Novais, J. M. (1998). Anaerobic treatment of olive mill wastewater with digested piggery effluent. *Water Environment Research*, *70*(5), 1056-1061.
- Marques, I. P. (2001). Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, *137*(1-3), 233-239.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., & Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, *30*(8), 1914-1918.
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O'Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *61*(2), 127-134.
- Medina, A., Roldán, A., & Azcón, R. (2010). The effectiveness of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Aspergillus niger* or *Phanerochaete chrysosporium* treated organic amendments from olive residues upon plant growth in a semi-arid degraded soil. *Journal of Environmental Management*, *91*(12), 2547-2553.
- Mekki, A., Dhouib, A., Aloui, F., & Sayadi, S. (2006). Olive wastewater as an ecological fertiliser. *Agronomy for Sustainable Development*, *26*(1), 61-67.
- Michel, F. C., Dass, S. B., Grulke, E. A., & Reddy, C. A. (1991). Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(8), 2368-2375.

- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., & Nevo, E. (2005). Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, 27(13), 955-959.
- Mikiashvili, N., Wasser, S. P., Nevo, E., & Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 999-1002.
- Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., & Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 25.
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A. T., & Martinez, M. J. (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*, 34(1), 1-5.
- Ngo, T. T., & Lenhoff, H. M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry*, 105(1), 389-397.
- 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(5), 620-626.
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautová, V., & Zervakis, G. I. (2015). Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi—Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresource Technology*, 189, 121-130.
- Olivieri, G., Russo, M. E., Giardina, P., Marzocchella, A., Sannia, G., & Salatino, P. (2012). Strategies for dephenolization of raw olive mill wastewater by means of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(5), 719-729.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920-924.
- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(9), 1475-1485.

- Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., Sánchez-Monedero, M. A., & Cegarra, J. (2000). Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biology and Fertility of Soils*, 32(3), 222-227.
- Paredes, C., Bernal, M. P., Roig, A., & Cegarra, J. (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. *Biodegradation*, 12(4), 225-234.
- Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J., & Roig, A. (2002). Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 85(1), 1-8.
- Périé, F. H., & Gold, M. H. (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2240-2245.
- Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Stanzone, M., & Temussi, F. (2003). Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnology Letters*, 25(19), 1657-1659.
- Piperidou, C. I., Chaidou, C. I., Stalikas, C. D., Soutli, K., Pilidis, G. A., & Balis, C. (2000). Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1941-1948.
- Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1), 20-33.
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Galanakis, C. M. (2014). Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 1-18.
- Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., & Garcia-Pareja, M. P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 283-290.
- Raposo, F., Borja, R., Sanchez, E., Martín, M. A., & Martín, A. (2004). Performance and kinetic evaluation of the anaerobic digestion of two-phase olive mill effluents in reactors with suspended and immobilized biomass. *Water Research*, 38(8), 2017-2026.

- Raposo, F., Borja, R., Sanchez, E., & Martín, A. (2005). A kinetic evaluation of the anaerobic digestion of two- phase olive mill effluent in batch reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(3), 241-250.
- Rinaldi, M., Rana, G., & Introna, M. (2003). Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research*, 84(3), 319-326.
- Rivas, F. J., Gimeno, O., Portela, J. R., de la Ossa, E. M., & Beltran, F. J. (2001a). Supercritical water oxidation of olive oil mill wastewater. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(16), 3670-3674.
- Rivas, F. J., Beltrán, F. J., Gimeno, O., & Acedo, B. (2001b). Wet air oxidation of wastewater from olive oil mills. *Chemical engineering & technology*, 24(4), 415-421.
- Rivas, F. J., Beltrán, F. J., Gimeno, O., & Frades, J. (2001c). Treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1873-1880.
- Robinson, T., Chandran, B., & Nigam, P. (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9), 575-579.
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Ruiz-Rodriguez, A., Soler-Rivas, C., Polonia, I., & Wichers, H. J. (2010). Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7), 638-645.
- Sabbah, I., Marsook, T., & Basheer, S. (2004). The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process Biochemistry*, 39(12), 1947-1951.
- Sánchez-Arias, V., Fernández, F. J., Villaseñor, J., & Rodríguez, L. (2008). Enhancing the co-composting of olive mill wastes and sewage sludge by the addition of an industrial waste. *Bioresource Technology*, 99(14), 6346-6353.
- Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A., & Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31(3), 223-235.

- Sarika, R., Kalogerakis, N., & Mantzavinos, D. (2005). Treatment of olive mill effluents: part II. Complete removal of solids by direct flocculation with poly-electrolytes. *Environment International*, *31*(2), 297-304.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., & Aloui, F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, *35*(7), 725-735.
- Scioli, C., & Vollaro, L. (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research*, *31*(10), 2520-2524.
- Singh, D., & Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(3), 399-417.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *The American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, pp. 144–158, 1965.
- Stasinakis, A. S. (2008). Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment—a mini review. *Global NEST Journal*, *10*(3), 376-385.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, *140*(1), 19-26.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 161, pp. 238-249). Academic Press.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L., & Volterra, E. (1995). Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management & Research*, *13*(5), 509-518.
- Tomati, U., Galli, E., Fiorelli, F., & Pasetti, L. (1996). Fertilizers from composting of olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *38*(3-4), 155-162.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., & Aggelis, G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, *84*(3), 251-257.
- Tuisel, H., Sinclair, R., Bumpus, J. A., Ashbaugh, W., Brock, B. J., & Aust, S. D. (1990). Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and stability to temperature and pH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *279*(1), 158-166.

- Turano, E., Curcio, S., De Paola, M. G., Calabrò, V., & Iorio, G. (2002). An integrated centrifugation–ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 209(2), 519-531.
- Vitolo, S., Petarca, L., & Bresci, B. (1999). Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technology*, 67(2), 129-137.
- Vlyssides, A. G., Loizidou, M., & Zorpas, A. A. (1999). Characteristics of solid residues from olive oil processing as bulking material for co- composting with industrial wastewaters. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 34(3), 737-748.
- Vossen, P. (2007). Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience*, 42(5), 1093-1100.
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174-209.
- Zenjari, B., El Hajjouji, H., Baddi, G. A., Bailly, J. R., Revel, J. C., Nejmeddine, A., & Hafidi, M. (2006). Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater–straw mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3), 433-437.
- Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, 203, 791-798.
- Zervakis, G., Yiatras, P., & Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 237-243.
- Zouari, N., & Ellouz, R. (1996). Toxic effect of coloured olive compounds on the anaerobic digestion of olive oil mill effluent in UASB- like reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66(4), 414-420.

9. Πηγές Εικόνων και Διαγραμμάτων:

Διαγράμματα 1.1-1.3: www.fao.org/faostat/

Εικόνες 1.1-1.2: <http://www.tinos-habitart.gr/events.php>

Εικόνα 1.3: <http://kivigrupp.ee/products/bms-decanter-centrifuge/>

Εικόνα 1.4: σύνθεση <http://www.ingnia.com/composting/>

<http://www.3ppartners.com/news/corporate-controller-placement-in-ca/>

https://giannouxidis.gr/oil_production/

<http://www.enet.gr/?i=news.el.article&id=398898>

<https://www.youtube.com/watch?v=IJXfZZt0Ngo>

<https://potamoulaneews.blogspot.gr/2014/11/a.html>

http://giannisargyros.blogspot.gr/2012/11/blog-post_25.html

<https://tinyurl.com/ybh35qwp>

Εικόνα 1.5: <https://tinyurl.com/yac327g5> (Μεσσηνία)

<https://tinyurl.com/ya7w7o34> (Ηλεία)

Εικόνα 1.6: Caporaso, N., Formisano, D., & Genovese, A. (2017). Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2017.1343797>

Εικόνα 1.7: <http://www.prosodol.gr/?q=it/node/498>