

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Διαχείριση Αποβλήτων ελαιουργείων και ελαίων με
τη χρήση βιοτεχνολογικών μεθόδων.

Επιβλέπων: καθηγήτρια

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Αντωνίου Ψώνη

&

Νικολάου Φιλιππόπουλου

Πάτρα 2005

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Διαχείριση Αποβλήτων ελαίου με τη χρήση
βιοτεχνολογικών μεθόδων.



Αντωνίου Ψώνη
&
Νικολάου Φιλιππόπουλου

Καλαμάτα 2005

1^{ος} Σπουδαστής:

Όνομα : Αντώνης
Επώνυμο : Ψώνης
Πατρώνυμο : Κων/νος
Ειδικότητα : Μηχανολόγος
Διεύθυνση : Βλαχόπουλο - Μεσσηνίας
Ημερ. Γεννήσεως : 10-5-1983
Ιθαγένεια : Ελληνική

2^{ος} Σπουδαστής:

Όνομα : Νικόλαος
Επώνυμο : Φιλιππόπουλος
Πατρώνυμο : Κων/νος
Ειδικότητα : Μηχανολόγος
Διεύθυνση : Βροχήτσα Ηλείας
Ημερ. Γεννήσεως : 1- 12 - 1982
Ιθαγένεια : Ελληνική

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Απόβλητα ελαιουργείου	1
1.2.1. Γενικά	1
1.2.2. Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων	1
1.2.3. Μέθοδοι διαχείρισης των αποβλήτων ελαιουργείων.....	5
1.2.4. Δυνατότητες αξιοποίησης των αποβλήτων των ελαιουργείων.....	7
1.3. Απόβλητα διεργασιών παραγωγής βρώσιμης ελιάς	8
1.3.1. Γενικά	8
1.3.2. Ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς.....	8
1.3.3. Μέθοδοι παρασκευής βρώσιμων ελιών.....	9
1.3.4. Παραγωγή αποβλήτου από την επεξεργασία των βρώσιμων ελιών.....	12
1.3.5. Μέθοδοι επεξεργασίας του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών	13
1.4. Στόχος της παρούσας διατριβής	14
2. ΧΡΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ	16
2.1. Εισαγωγή	16
2.2. Οι μύκητες ως συντελεστές αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων	17
2.2.1. Γενικά	17
2.2.2. Κατηγορίες ανώτερων βασιδιομηκίτων	17
2.2.3. Η δομή της λιγνίνης.....	18
2.2.4. Συνθήκες δράσης λιγνινολυτικών μυκήτων	20
2.2.5. Λιγνινολυτικά ένζυμα και μηχανισμοί λιγνινόλυσης.....	21
2.2.5.1. Λιγνιάσες (Lignin peroxidases, LiPs)	21
2.2.5.2. Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (Manganese peroxidases, MnPs)	21
2.2.5.3. Λακκάσες (Laccases).....	25
2.2.6. Ένζυμα που παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂).....	25
2.2.7. Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοποδόμηση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων	26

2.3. Επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών με χρήση μυκήτων λευκής σήψης	27
2.3.1. Γενικά	27
2.3.2. Μέτρηση γραμμικής αύξησης και συγκριτική αξιολόγηση στελεχών Pleurotus σε στεροποιημένο απόβλητο πράσινων βρώσιμων ελιών	31
2.3.5. Αποτελέσματα πρώτου σταδίου συγκριτικής αξιολόγησης	36
2.3.5.1. Αποτελέσματα πρώτου σταδίου συγκριτικής αξιολόγησης	38
2.4. Επίδραση του μύκητα <i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69 στην επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς	41
2.4.1. Γενικά	41
2.4.2. Αποτελέσματα	42
2.4.3. Συζήτησης και ανάλυση αποτελεσμάτων	49
2.4.3.1. Αρχική συγκριτική αξιολόγηση.....	49
2.4.3.2. Η δράση του μύκητα (<i>P. ostreatus</i> LGAM P69) σε θερμικά αποστειρωμένο και αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο βρώσιμων ελιών.....	52
2.5. Συμπεράσματα	54
2.6. Επίδραση της αλατότητας του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών στην φυτοτοξικότητα.....	55
2.6.1. Γενικά	55
2.6.2. Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	55
2.7. Ανάπτυξη του μύκητα <i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69 σε παστεριωμένο απόβλητο βρώσιμων ελιών.....	57
2.7.1. Γενικά	57
2.8. Ακινητοποίησης (immobilization) του μύκητα <i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69 σε πολυμερές πολυουρεθάνη (polyurethane foam)	60
2.8.1. Γενικά	60
2.8.2. Χαρακτηριστικά αποβλήτου ελαιουργείου	61
2.8.3. Αποτελέσματα	62
2.9. Ανάπτυξη του μύκητα <i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69 σε παστεριωμένο απόβλητο ελαιουργείου	66
2.9.1. Γενικά	66
2.9.2. Αποτελέσματα	66

3. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ.....	71
3.1. Εισαγωγή.....	71
3.2. Μικροβιολογικά και κινητική της αναερόβιας χώνευσης.....	75
3.3. Αναερόβιος μεταβολισμός της οργανικής ύλης.....	78
3.3.1. Υδρόλυση βιοπολυμερών στην αναερόβια χώνευση.....	78
3.3.2. Οξειγένεση στην αναερόβια χώνευση.....	78
3.3.3. Οξικογένεση στην αναερόβια χώνευση.....	79
3.3.4. Μεθανογένεση στην αναερόβια χώνευση.....	80
3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.....	81
3.4.1. Θερμοκρασία.....	82
3.4.2. pH.....	83
3.4.3. Χημική σύσταση τροφοδοσίας.....	84
3.4.4. Τοξικές ουσίες.....	85
3.4.5. Οργανική φόρτιση και υδραυλικός χρόνος παραμονής αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας.....	87
3.4.6. Εγκλιματισμός αναερόβιας βιομάζας.....	88
3.5. Συστήματα αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.....	89
3.5.1. Γενικά.....	89
3.5.2. Συμβατικές διατάξεις αναερόβιας χώνευσης.....	89
3.5.3. Ταχύρρυθμες διατάξεις αναερόβιας χώνευσης.....	91
3.6. Αποτελέσματα της αναερόβιας χώνευσης του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς.....	96
3.7. Συμπεράσματα και προτάσεις.....	100
4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΩΝ ΒΡΩΣΙΜΩΝ ΕΛΙΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ.....	102
4.1. Γενικά.....	102
4.2. Μικροβιολογία συστήματος ενεργού ιλύος.....	103
4.3. Οξείδωση οργανικών ενώσεων σε σύστημα ενεργού ιλύος.....	104
4.4. Ανάπτυξη αεροβίων μικροοργανισμών.....	105
4.5. Αερόβιες διατάξεις ενεργού ιλύος.....	107
4.8. Αποτελέσματα και συμπεράσματα από την αερόβια επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς.....	108

5. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΗΣ ΒΡΩΣΙΜΗΣ ΕΛΙΑΣ	110
5.1. Εισαγωγή	1 10
5.2. Αποτελέσματα και συμπεράσματα από την αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της απορροής του αναερόβιου χωνευτήρα	1 10
5.3. Επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορροής α) με χρήση μυκητών «λευκής σήψης» και β) με χρήση όζοντος.....	1 14
5.4. Αποτελέσματα από την δράση του μύκητα	1 14
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράγονται μεγάλες ποσότητες αποβλήτων, τα οποία διατίθενται σε εδαφικούς και υδάτινους αποδέκτες προκαλώντας σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Τα απόβλητα αυτού του είδους χαρακτηρίζονται από υψηλό οργανικό-ρυπαντικό φορτίο και παρουσιάζουν φυτοτοξική δράση, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν τοξικές δράσεις στους μικροοργανισμούς των βιολογικών διεργασιών.

Απόβλητο παρόμοιο με αυτό που εξάγεται κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου, είναι αυτό που προκύπτει από τις διεργασίες παρασκευής βρώσιμων (επιτραπέζιων) ελιών. Το απόβλητο αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλό οργανικό φορτίο

που σε συνδυασμό με την παρουσία πολυφαινόλων και άλλων τοξικών ενώσεων, περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας. Και ενώ περιορισμένες έρευνες έχουν γίνει για την επεξεργασία του αποβλήτου με χρήση φυσικοχημικών μεθόδων, καμμία προσπάθεια δεν έχει γίνει για αποτοξικοποίηση του αποβλήτου με χρήση βιολογικών μεθόδων.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, προσεγγίζουμε το πρόβλημα της αποτοξικοποίησης του αποβλήτου των πράσινων βρώσιμων ελιών με χρήση βιολογικών συστημάτων επεξεργασίας. Στο πρώτο μέρος εξετάζεται η ικανότητα των μυκήτων «λευκής σήψης» να βιομετατρέπουν το απόβλητο της βρώσιμης ελιάς. Η αναερόβια χώνευση αποτελεί την δεύτερη βιολογική διεργασία που εφαρμόζουμε για την επεξεργασία του αποβλήτου, ενώ στο τρίτο μέρος ερευνούμε την αερόβια επεξεργασία του- αποβλήτου σε σύστημα ενεργού ιλύος.

Η αποτελεσματικότητα της κάθε μεθόδου και η επίδραση που έχει στα χαρακτηριστικά του αποβλήτου μας δίνουν τη δυνατότητα να συνδυάσουμε τις διεργασίες αυτές μεταξύ τους, ώστε να επιτύχουμε ένα βέλτιστο αποτέλεσμα, κυρίως όσον αφορά την μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου. Τελικά, μία συνδυασμένη αποτελούμενη από τρία στάδια, προτείνεται για την ολοκληρωμένη και αποτελεσματική διαχείριση του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγές χώρες, παράγοντας το 15% της παγκόσμιας ελαιοπαραγωγής. Με την καλλιέργεια της ελιάς απασχολείται μεγάλο μέρος του αγροτικού μας πληθυσμού και το παραγόμενο προϊόν έχει μεγάλη οικονομική και κοινωνική σημασία, αφού η συνολική του αξία αντιπροσωπεύει το 12% της συνολικής αξίας της φυτικής παραγωγής της χώρας μας (Τσώνης, 1988).

Από την συνολική παραγωγή ελιών, το μεγαλύτερο μέρος οδηγείται στα ελαιουργεία για την παραγωγή του ελαιόλαδου, ενώ ένα μικρό ποσοστό (περίπου 10%) ικανοποιεί τις ανάγκες της αγοράς σε βρώσιμες ελιές. Στην Ελλάδα λειτουργούν περίπου 3500 ελαιουργεία, το 80% των οποίων βρίσκονται στην Πελοπόννησο, στην Κρήτη και στα νησιά του Ιονίου και του Αιγαίου. Η λειτουργία τους είναι εποχιακή και ανάλογα με την περιοχή, κυμαίνεται από τον Οκτώβριο μέχρι και τον Ιούνιο.

1.2 Απόβλητα ελαιουργείων

1.2.1 Γενικά

Κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου στα ελαιουργεία, παράγονται μεγάλες ποσότητες αποβλήτων, ιδιαίτερα επιβαρημένων από άποψη οργανικού φορτίου, συμβάλλοντας έτσι στην οξύτητα του προβλήματος που δημιουργούν τα υπόλοιπα αστικά, βιομηχανικά και λοιπά γεωργικά απόβλητα. Τα απόβλητα των ελαιουργείων που προκύπτουν κατά την διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου, περιλαμβάνουν τα φυτικά υγρά του ελαιοκάρπου, αναμεμιγμένα με το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις κατεργασίας του.

Αν ανατρέξει κανείς σε ότι έχει γραφτεί μέχρι σήμερα, για τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων, θα διαπιστώσει ότι οι τιμές που αναφέρονται ποικίλλουν σημαντικά. Κάτι τέτοιο όμως, είναι φυσικά αναμενόμενο, μιας και πρόκειται για φυσικό

προ ιόν που μπορεί να προκύπτει από διαφορετικές παραγωγικές διαδικασίες. Η σύσταση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων αυτών, εξαρτώνται άμεσα από την καλλιεργούμενη ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, τις κλιματολογικές συνθήκες στην περιοχή καλλιέργειας, τον τύπο του ελαιουργείου (κλασσικό-φυγοκεντρικό, Σχήμα 1.1, Γαβαλά 1998) καθώς και το σημείο όπου γίνεται η δειγματοληψία. Έτσι λοιπόν παρουσιάζονται μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων ελαιοπαραγωγικών περιοχών, όπως και μεταξύ των ελαιοκομικών περιόδων. Ανατρέχοντας σε πολλές από τις ερευνητικές εργασίες που έχουν γίνει για τα απόβλητα των ελαιουργείων, ανέκυψαν στοιχεία για τα χαρακτηριστικά τους (Πίνακας 1.1), τα οποία πράγματι παρουσιάζουν μεγάλο εύρος διακύμανσης.

Πίνακας 1.1. Μέση σύσταση αποβλήτων ελαιουργείων

<i>Χαρακτηριστικά (mg/l)</i>	<i>Τιμή</i>
Ολικά στερεά	14000-126000
Πτητικά οργανικά στερεά	12000-105000
Ολικά αιωρούμενα στερεά	400-24000
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο	25000-162000
Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο	9200-100000
Ολικό οργανικό άζωτο	9-3200
Ολικός φώσφορος	ίχνη-1400

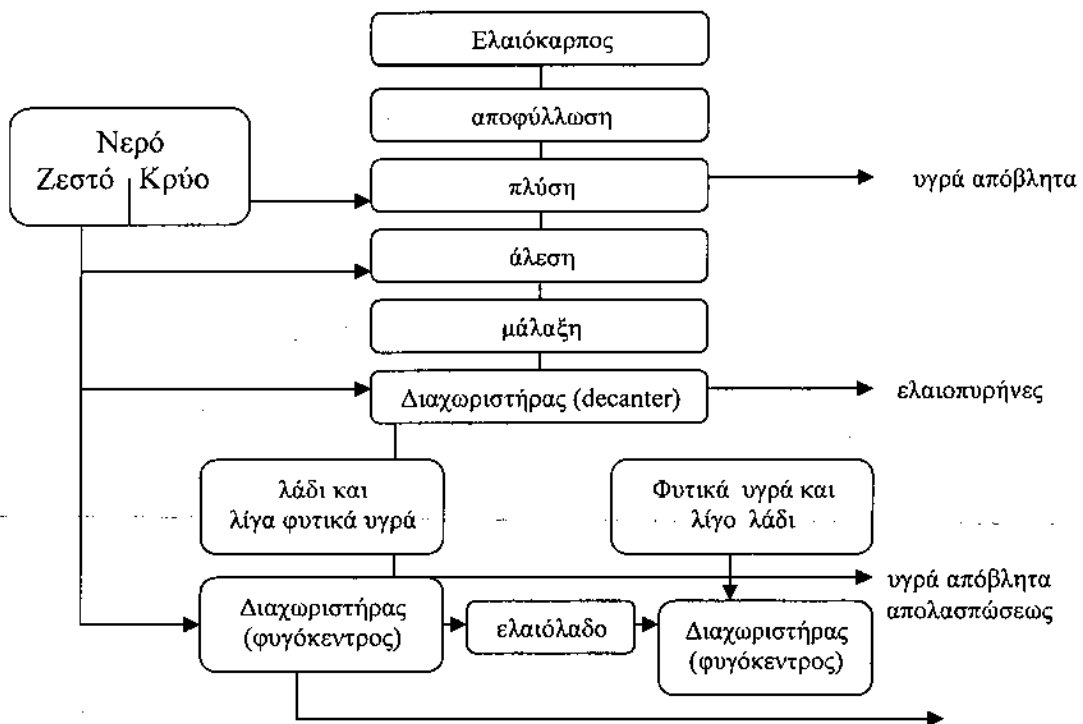
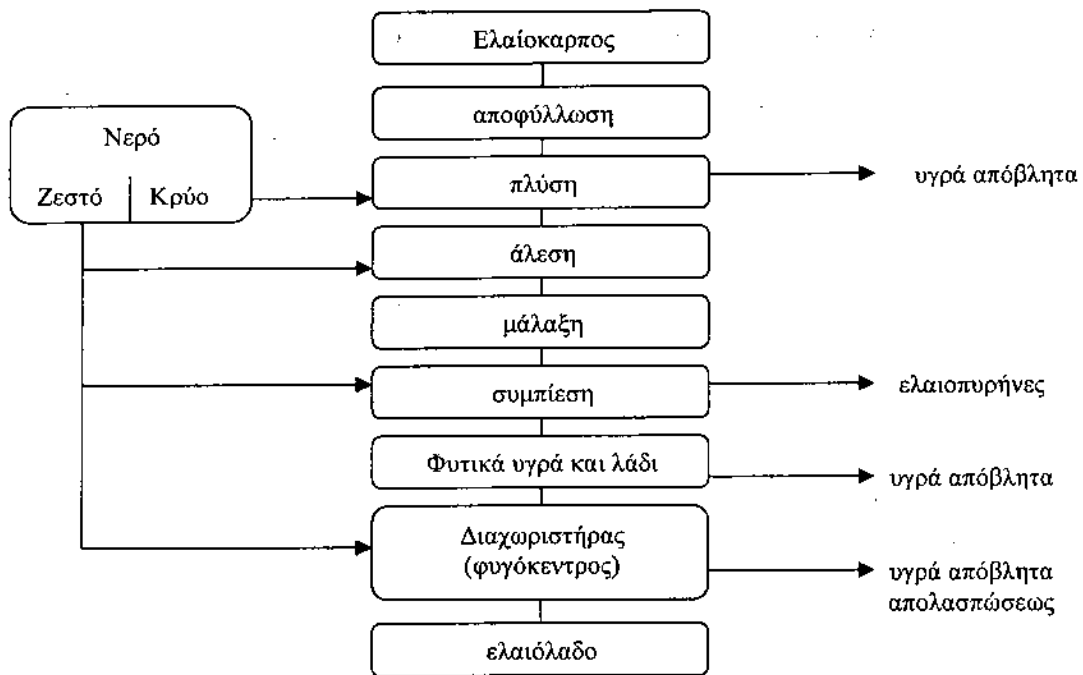
1.2.2 Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων

Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων συγκαταλέγονται στα ιδιαίτερα τοξικά, από άποψη ρυπαντικού φορτίου, αγροτοβιομηχανικά απόβλητα. Δεδομένου ότι για κάθε τόνο παραγόμενου ελαιόλαδου, παράγονται περίπου 6m³ αποβλήτων, έχει εκτιμηθεί ότι η μέση ετήσια παραγωγή αποβλήτων στην Ελλάδα, ανέρχεται περίπου σε 1.500.000 m³ (Οικονόμου, 1994). Δημιουργείται λοιπόν ένα σοβαρό πρόβλημα από την παραγωγή των αποβλήτων αυτών, μια και η επιτακτική ανάγκη για καθαρό περιβάλλον, κάνει επίκαιρη

και επείγουσα την αναζήτηση λύσης, για την ασφαλή διάθεσή τους.

Η πιο συνηθισμένη πρακτική, που ακολουθείται μέχρι σήμερα, είναι η απ' ευθείας διάθεση των αποβλήτων, σε κοντινούς στα ελαιουργεία, υδάτινους αποδέκτες, όπως ποταμούς, θάλασσες, λίμνες και χειμάρρους. Στις περιπτώσεις αυτές, εκτός από την άμεση τοξικότητα των αποβλήτων, παρατηρούνται φαινόμενα έλλειψης οξυγόνου, το οποίο καταναλώνεται για την οξείδωση των οργανικών ουσιών, από ομάδες μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και επικρατούν, στα σημεία απόρριψης των αποβλήτων αυτών. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το ισοζύγιο οξυγόνου του υδάτινου περιβάλλοντος διαταράσσεται, προκαλώντας τοξικά φαινόμενα στην υδρόβια πανίδα.

Η μη ελεγχόμενη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων στο έδαφος, με ή χωρίς προσθήκη ασβέστου, αποτελεί επίσης μία άλλη εφαρμοζόμενη τακτική. Στην περίπτωση αυτή παρουσιάζονται προβλήματα φυτοτοξικότητας στις αγροτικές καλλιέργειες, λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, της μεγάλης οξύτητας και της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών, στις οποίες έχουν αποδοθεί φυτοτοξικές ιδιότητες. Ακόμα, η απ' ευθείας διάθεση των αποβλήτων αυτών στο έδαφος, μειώνει σημαντικά την διαπερατότητά του από το νερό, ενώ έχουν παρατηρηθεί αντιμικροβιακές δράσεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους, από κάποιες ουσίες που περιέχονται στα απόβλητα των ελαιουργείων.



Σχήμα 1.1. Στάδια επεξεργασίας ελαιοκάρπου σε (α) κλασικά και (β) φυγοκεντρικά συστήματα.

Επίσης, είναι πιθανή η ρύπανση κοντινών επιφανειακών ή υπόγειων υδάτων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υγειονομικών προβλημάτων σε παραπλήσιες κατοικημένες περιοχές. Ακόμα, η μεγάλη συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων συστατικών φυτικής προέλευσης, που περιέχονται σε αυτά τα απόβλητα, μπορεί να δημιουργήσει παρενέργειες στους ζωντανούς οργανισμούς, οι οποίοι θα χρησιμοποιήσουν νερό, στο οποίο έχουν απορριφθεί τα απόβλητα και όταν οι ποσότητες οδηγούν σε συγκεντρώσεις ρύπων που ξεπερνούν τα φυσιολογικά όρια.

Τέλος τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων προκαλούν ενοχλήσεις στους κατοίκους αστικών περιοχών, λόγω δυσάρεστων οσμών, συσσώρευση εντόμων, Και τέλος μπορούν να προκαλέσουν αισθητική υποβάθμιση περιοχών τουριστικού ενδιαφέροντος.

1.2.3 Μέθοδοι διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιουργείων

Τα έντονα δυσμενή περιβαλλοντικά προβλήματα, που δημιουργεί η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων, έχουν αναγκάσει τις διάφορες ελαιοπαραγωγές χώρες να λάβουν μέτρα για την αντιμετώπιση τους. Μεταξύ των μέτρων αυτών περιλαμβάνεται και η ενίσχυση των ερευνητικών δραστηριοτήτων, που στοχεύουν σε εξεύρεση μεθόδων, για την αποτελεσματική διαχείριση των υγρών αποβλήτων.

Οι μέθοδοι αυτές από πλευρά σκοπιμότητας μπορούν να διακριθούν σε: μεθόδους που στοχεύουν στην μείωση του ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων, για να απορριφθούν στην συνέχεια στο περιβάλλον χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις και σε μεθόδους που στοχεύουν στη παραλαβή χρήσιμων ενδιάμεσων και τελικών προ ιόντων από την επεξεργασία των αποβλήτων, Π.χ χρωστικές ουσίες, μικροβιακή πρωτεΐνη για ζωοτροφές, βιοαέριο, εδαφοβελτιωτικά πρόσθετα (compost), Κ.α.

Φυσικά, τις περισσότερες φορές, οι προσπάθειες γίνονται προς την κατεύθυνση του να επιτευχθεί αποτοξικοποίηση των αποβλήτων, παραλαμβάνοντας ταυτόχρονα χρήσιμα προϊόντα, η αξία των οποίων θα μπορούσε να συμβάλλει στη μείωση του κόστους λειτουργίας της μονάδας επεξεργασίας. Από τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι

σήμερα, παρατηρείται ότι ο στόχος αυτός δεν είναι πάντα εφικτός, και αυτό αποδίδεται κυρίως σε κοινωνικούς και οικονομικούς παράγοντες.

Από άποψη μεθοδολογίας, οι κυριότερες μέθοδοι επεξεργασίας που έχουν εφαρμοστεί για τα απόβλητα των ελαιουργείων, διακρίνονται σε:

α) φυσικές-φυσικοχημικές (διήθηση, φυγοκέντριση, εξάτμιση, προσρόφηση, θρόμβωση-καθίζηση, επίπλευση, αντίστροφη ώσμωση, κ.α),

β) χημικές (εξουδετέρωση, χλωρίωση, οξείδωση, ιονίζουσα ακτινοβολία, κ.α) και

γ) βιολογικές αναερόβια-αερόβια- χώνευση, βιολογική οξείδωση σε αεριζόμενες λίμνες, βιοφίλτρα, βιοδίσκοι, composting, κ.α)

Από τις παραπάνω μεθόδους, για μεν τις φυσικοχημικές, η αποτελεσματικότητά τους είναι ανεπαρκής για τέτοιου είδους επιβαρημένα απόβλητα, ενώ οι πιο σύγχρονες τεχνολογικά μέθοδοι (υπερδιήθηση, χρήση μεμβρανών, κ.α), όπως και οι χημικές, που θα μπορούσαν να δώσουν καλύτερα αποτελέσματα, κρίνονται ιδιαίτερα αντιοικονομικές.

Όσον αφορά τις βιολογικές μεθόδους μπορούν να διακριθούν, με βάση την υπεύθυνη μικροβιακή χλωρίδα, σε αερόβιες και αναερόβιες. Στην αναερόβια επεξεργασία, παράλληλα με την αποτοξικοποίηση του αποβλήτου, επιδιώκεται και η παραγωγή ενέργειας (βιοαέριο), που μπορεί να καλύψει μέρος των ενεργειακών απαιτήσεων για τη λειτουργία της εγκατάστασης.

Κατά την αερόβια επεξεργασία, το οργανικό φορτίο του αποβλήτου διασπάται από τους αερόβιους μικροοργανισμούς, αποδίδοντας κυρίως CO₂ και μικροβιακή βιομάζα. Η διεργασία αυτή μπορεί να γίνει με διάφορες μεθοδολογίες, από τις πλέον απλές μέχρι και τις πιο σύγχρονες.

Ένας απλός τρόπος αερόβιας επεξεργασίας είναι η παροχή των αποβλήτων σε αβαθείς λίμνες (oxidation ponds) και η παραμονή τους εκεί για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι να μειωθεί σημαντικά το οργανικό τους φορτίο. Η διαδικασία αυτή μπορεί να βελτιωθεί με προσαρμογή συστημάτων αερισμού. Η μέθοδος αυτή, αν και διακρίνεται

για την απλότητα της, συναντά δυσκολίες εφαρμογής εξ' αιτίας της μεγάλης εδαφικής έκτασης που απαιτεί και που τις περισσότερες φορές δεν είναι διαθέσιμη.

Άλλες μέθοδοι αερόβιας επεξεργασίας είναι: α) ενεργού ιλύος (activated sludge) και β) βιοφίλτρων (trickling filters, percolated filters, biofilters).

Στις αερόβιες μεθόδους περιλαμβάνεται και η βιοσταθεροποίηση (composting), τεχνολογία που διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες μεθόδους αερόβιας - επεξεργασίας και έχει ως τελικό στόχο, την παραλαβή ενός χρήσιμου προϊόντος, που θα έχει χρησιμότητα ως εδαφοβελτιωτικό υλικό. Η διαδικασία αυτή διέρχεται από το στάδιο της θερμόφιλης φάσης και οι βασικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μικροχλωρίδας, από την οποία εξαρτάται και η αποτελεσματικότητά της όλης διεργασίας, είναι: α) η χημική σύνθεση του υποστρώματος (ο λόγος C/N), β) η υγρασία, γ) το pH του υλικού και δ) ο αερισμός.

1.2.4 Δυνατότητες αξιοποίησης των αποβλήτων των ελαιουργείων

Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας των αποβλήτων αυτών, σε ανόργανες και οργανικές ουσίες, γίνονται συνεχώς προσπάθειες για όσο το δυνατό μεγαλύτερη και καλύτερη αξιοποίησή τους. Ορισμένοι από τους σκοπούς για τους οποίους μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα απόβλητα των ελαιουργείων, είναι οι εξής:

α) για την παραγωγή χρωστικών (από ανθοκυάνες), φυσικών αντιοξειδωτικών (πολυφαινόλες), προ ιόντων ζύμωσης (π. Χ αλκοόλες),

β) για λίπανση, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κάλιο, άζωτο, φώσφορο και μαγνήσιο και βέβαια μετά από κατάλληλη επεξεργασία,

γ) για ενεργειακούς σκοπούς, παραγωγή καύσιμου αερίου (βιοαέριο), μετά από αναερόβια μικροβιακή ζύμωση,

δ) χρήση του πυρηνόξυλου σαν καύσιμη ύλη,

ε) για παραγωγή μικροβιακής βιομάζας, μετά από αερόβια ζύμωση σε βιοαντιδραστήρες.

Η παραγόμενη βιομάζα είναι πλούσια σε μονοκυτταρική πρωτεΐνη (single cell protein) και είναι δυνατό να αποτελέσει κατάλληλο πρόσθετο για ζωοτροφή,

ζ) ως βελτιωτικό εδάφους με βιοσταθεροποίηση (composting) των στερεών συστατικών

των αποβλήτων και των ιζημάτων που προκύπτουν στις διάφορες φάσεις κατεργασίας τους.

Από τα παραπάνω λοιπόν γίνεται φανερό ότι τα απόβλητα των ελαιουργείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς, απαιτούνται όμως πιο ολοκληρωμένες και αρτιότερα-καταρτισμένες επιστημονικές μελέτες, για την επίτευξή τους. Με συγκροτημένες προσπάθειες είναι πολύ πιθανό να υπάρξει δυνατότητα πρακτικής εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα, των συστημάτων κατεργασίας και αξιοποίησης των αποβλήτων, κάτι που μέχρι σήμερα δεν έχει αποδώσει, λόγω του απαιτούμενου υψηλού αρχικού και λειτουργικού κόστους, ενώ η όποια προσπάθεια δυσχεραίνεται ακόμα περισσότερο από τον εποχιακό χαρακτήρα των αποβλήτων.

1.3 Απόβλητα διεργασιών παραγωγής βρώσιμης ελιάς

1.3.1 Γενικά

Ο δεύτερος τύπος αποβλήτου που δημιουργείται από την αξιοποίηση του ελαιοκάρπου, είναι το απόβλητο που προκύπτει από την διεργασία παρασκευής των βρώσιμων (επιτραπέζιων) ελιών. Είναι δηλαδή το απόβλητο που παράγεται στα διάφορα στάδια αποπίκρισης του ελαιοκάρπου, πριν αυτός διατεθεί για επιτραπέζια κατανάλωση. Η ετήσια παραγωγή βρώσιμων ελιών στη χώρα μας ανέρχεται στους 85000 τόνους, ενώ την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή κατέχει η Ισπανία, με ετήσια παραγωγή 180000 τόνους (Μπαλατσούρας, 1995).

1.3.2 Ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς

Οι τυπικές ποικιλίες βρώσιμων ελιών που καλλιεργούνται στη χώρα μας και οι οποίες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για επιτραπέζια κατανάλωση, είναι κατά σειρά σπουδαιότητας οι ακόλουθες: η Κονσερβοελιά Άμφισσας, η Νυχάτη Καλαμών και η ελιά Χαλκιδικής. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι ποι)Cιλίες,- ελιά Ηγουμενίτσας και Καρυδοελιά, που καλλιεργούνται, η πρώτη στη περιοχή της Ηγουμενίτσας και η δεύτερη

στην περιοχή της Εύβοιας.

Εκτός από τις πιο πάνω κατηγορίες υπάρχουν και οι ποικιλίες «διπλής χρήσεως», των οποίων ο καρπός μεγάλου μεγέθους, υποβάλλεται σε επεξεργασία και χρησιμοποιείται για επιτραπέζια κατανάλωση, ενώ ο μικρότερου μεγέθους καρπός, χρησιμοποιείται, από τα ελαιουργεία ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ελαιολάδου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ποικιλίες, Μεγαρίτικη, Κοθρέικη και Θρουμποελιά.

Από όλες τις ποικιλίες που προαναφέρθηκαν, η Κονσερβοελιά είναι η κύρια επιτραπέζια ποικιλία ελιάς της χώρας μας αφού καλύπτει το 80-85% της συνολικής ετήσιας παραγωγής. Οι κύριες περιοχές στις οποίες καλλιεργείται βρίσκονται στην Στερεά και Κεντρική Ελλάδα και είναι, η Άμφισσα, το Αγρίνιο, η Αταλάντη, ο Άγιος Κωνσταντίνος, ο Βόλος, η Εύβοια, η Λαμία και τα Τέμπη. Θεωρείται όψιμη ποικιλία, μιας και ωριμάζει αργά, ενώ το μέρος που υφίσταται επεξεργασία ως πράσινος ελαιόκαρπος, συγκομίζεται κατά την περίοδο από τα μέσα Σεπτεμβρίου μέχρι τα μέσα Νοεμβρίου. Το χρώμα της σάρκας του καρπού αλλάζει σταδιακά ως εξής: πράσινο, πρασινοκίτρινο, ρόδινο, ερυθροιώδες, ώδες και τελικά σε βαθύ μαύρο κατά το στάδιο της υπερωρίμανσης.

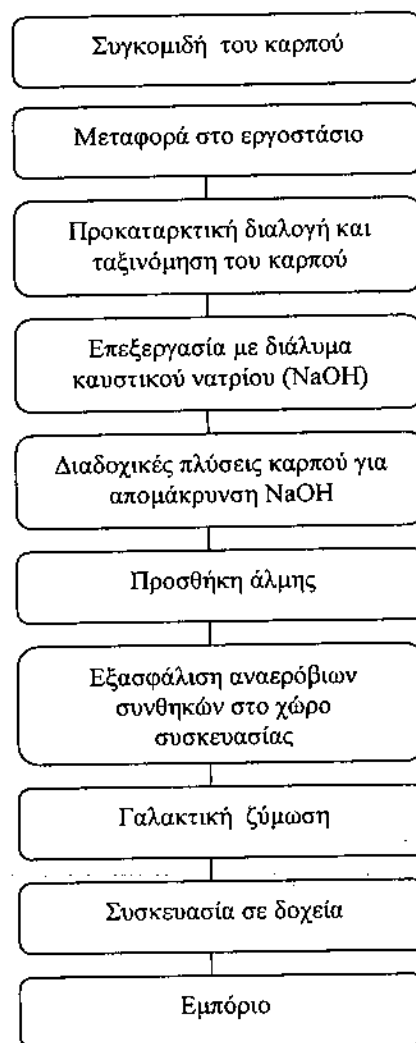
1.3.3 Μέθοδοι παρασκευής βρώσιμων ελιών

Τα στάδια επεξεργασίας από τα οποία περνούν οι βρώσιμες ελιές μέχρι και την τελική διάθεσή τους στην κατανάλωση, απεικονίζονται στο διάγραμμα ροής του Σχήματος 1.2.

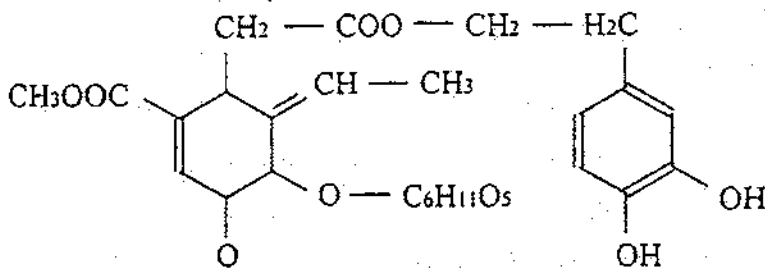
Το στάδιο της αποπίκρισης του ελαιόκαρπου, είναι ίσως το σημαντικότερο της επεξεργασίας, μια και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και άρα την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Τόσο ο πράσινος, όσο και ο μαύρος καρπός, περιέχουν, σε διάφορες αναλογίες, ποσότητες οργανικών οξέων και γλυκοζιδίων, τα οποία αποδίδουν στους καρπούς μια χαρακτηριστική πικρή γεύση.

Τα οξέα αντιπροσωπεύονται κυρίως από ταννίνες, πολυφαινόλες, λιπαρά οξέα, κ.α, ενώ η πικρή γεύση αποδίδεται κυρίως στην ελευρωπαΐνη (oleuropein) (Federici and Bonghi,

1983, Garrido-Fernandez and Vaughn, 1978, Fleming *et al.*, 1973), ουσία γλυκοζιδικής φύσεως (διπλός. εστέρας της γλυκόζης με δύο οξέα, 3,4διυδροξυβενζοϊκό και 2,6 διμέθυλο-1-υδροξυμέθυλο-1-καρβοκυκλοεξάνιο-2, Σχήμα1.3). Οι ανωτέρω ουσίες είναι διαλυτές στο νερό ενώ η υδρόλυση της ελευρωπαίνης επιταχύνεται σε αλκαλικό περιβάλλον.



Σχήμα 1.2. Στάδια επεξεργασίας του βρώσιμου ελαιοκάπρου.



Σχήμα 1.3. Το μόριο της ελευρωπαϊκής

Η αποπίκριση του ελαιόκαρπου μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους: α) με νερό, β) με ξηρή ή υγρή αλάτιση και γ) με αλκαλική διάλυση.

Η αποπίκριση με νερό είναι η απλούστερη, απαιτεί όμως μεγάλο χρονικό διάστημα (20 έως 30 ημέρες). Οι ελιές εμβαπτίζονται μέσα σε νερό το οποίο υπόκειται σε συχνές αλλαγές. Υπό αυτές όμως τις συνθήκες, ο καρπός δέχεται αλλοιώσεις, λόγω ανάπτυξης ανεπιθύμητων ζυμώσεων, που έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλής ποιότητας τελικό προϊόν.

Η αποπίκριση με αλάτιση εφαρμόζεται αρκετά στη χώρα μας και περιλαμβάνει τοποθέτηση του καρπού μέσα σε δοχεία με άλμη, όπου και παραμένει μέχρι το τέλος της διεργασίας. Λόγω των οσμωτικών φαινομένων που αναπτύσσονται, οι καρποί αποβάλλουν νερό, ενώ ταυτόχρονα απορροφούν άλας.

Τέλος, η αποπίκριση με αλκαλική διάλυση, είναι η ταχύτερη και καλύτερη μέθοδος και η μόνη η οποία έχει βιομηχανικό χαρακτήρα. Για την επεξεργασία του ελαιόκαρπου με αυτή την μέθοδο, χρησιμοποιείται διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH). Πρωτοεφαρμόστηκε στην Σεβίλλη της Ισπανίας για τα είδη Gordal και Manzanilla, που είναι τα κύρια είδη βρώσιμου ελαιόκαρπου που καλλιεργούνται εκεί.

Για το λόγο αυτό, σε αρκετά σημεία, ο ελαιόκαρπος που υφίσταται αυτή την διεργασία, αναφέρεται ως βρώσιμος ελαιόκαρπος Ισπανικού τύπου. Στη μέθοδο αυτή η συγκέντρωση του καυστικού νατρίου κυμαίνεται μεταξύ 1.6 έως 2.4% βάρους κατ' όγκο, ανάλογα με την ποικιλία και το μέγεθος του καρπού, το στάδιο ωρίμανσης και την θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου, όπου γίνεται η αποπίκριση. Πυκνότερα ή

αραιώτερα διαλύματα χρησιμοποιούνται πολύ σπάνια. Ο ελαιόκαρπος, καθ' όλη τη διάρκεια της αποπίκρισης (διαρκεί από 4-15 ώρες, ανάλογα με την περίπτωση), πρέπει να είναι πλήρως εμβαπτισμένος στο αλκαλικό διάλυμα. Αν όχι, ο καρπός που βρίσκεται στην επιφάνεια οξειδώνεται και αποκτά μαύρο χρώμα (λόγω οξείδωσης των πολυφαινολών), που μένει ανεξίτηλο και μετά τη ζύμωση. Η αποπίκριση θεωρείται ικανοποιητική, όταν το αλκαλικό διάλυμα εισχωρήσει περίπου στα 2/3 του εσωτερικού του καρπού. Αυτό ελέγχεται ως εξής: η σάρκα κόβεται κάθετα προς τον πυρήνα και επί της επιφάνειας της τομής, προστίθενται 1-2 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλείνης, προσδίδοντας ερυθρό χρώμα, στις ζώνες που έχουν απορροφήσει το αλκαλικό διάλυμα του καυστικού νατρίου.

Το στάδιο της αποπίκρισης ακολουθεί η έκπλυση του καρπού, η οποία πρέπει να είναι σύντομη (ολοκληρώνεται μέσα σε 12-14 ώρες) και περιλαμβάνει δύο έως τρία φορτία (αλλαγές) νερού. Οι πολλές πλύσεις εξαντλούν τη σάρκα σε υδατοδιαλυτά και άλλα πολύτιμα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως σάκχαρα, αζωτούχες πρωτεϊνικές ουσίες, άλατα και άλλα, τα οποία είναι χρήσιμα για την ομαλή πορεία της γαλακτικής ζύμωσης και την ανθρώπινη διατροφή.

1.3.4 Παραγωγή αποβλήτου από την επεξεργασία των βρώσιμων ελιών

Η παγκόσμια παραγωγή σε βρώσιμες ελιές ανέρχεται σε 914.000 τόνους ετησίως, εκ' των οποίων οι 360.000 τόνοι-παράγονται στις ευρωπαϊκές χώρες (Stroppiana *et al.*, 1995). Η Ελλάδα καταλαμβάνει σημαντική θέση στην παραγωγή αυτή, με 85.000 τόνους το χρόνο. Το 80% της παραγωγής αυτής καλύπτεται από τ/ν ποικιλία της Κονσερβοελιάς, με 40.000 τόνους μαύρου καρπού και 28.000 τόνους πράσινου καρπού. Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα ελαιουργεία στη χώρα μας (Kopsidas, 1992), τα οποία διέθεταν μονάδες παραγωγής και συσκευασίας επιτραπέζιων ελιών, εκτιμήθηκε η ποσότητα των αποβλήτων που παράγονται κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας του βρώσιμου ελαιοκάρπου της Κονσερβοελιάς (Πίνακας 1.2).

Είναι φανερό ότι, εκτός από τα απόβλητα που παράγονται στα ελαιουργεία κατά την διεργασία παραλαβής του ελαιολάδου, σημαντικές ποσότητες αποβλήτου παράγονται και κατά τη διεργασία παρασκευής του βρώσιμου ελαιοκάρπου. Το απόβλητο αυτό, είναι

ιδιαίτερα επιβαρημένο από άποψη οργανικού φορτίου και σε συνδυασμό με το υψηλό pH (κυμαίνεται από 11.0 έως 13.0) και την υψηλή αλατότητα, λόγω του τρόπου επεξεργασίας του (αποπίκριση με διάλυμα NaOH), προκαλεί ιδιαίτερα τοξικές δράσεις κατά την διάθεσή του, τόσο σε εδαφικούς όσο και σε υδάτινους αποδέκτες. Γίνεται επομένως επιτακτική η ανάγκη για την εύρεση λύσης, που θα οδηγήσει στην αποτελεσματική διαχείριση και αυτού του είδους των αποβλήτων.

Πίνακας 1.2. Απαιτούμενη ποσότητα νερού και τελική παραγωγή αποβλήτου, κατά την διεργασία παρασκευής του βρώσιμου ελαιοκάρπου

Στάδια επεξεργασίας ελαιοκάρπου	Απαιτούμενη ποσότητα νερού (m ³ /tn ελιών)	
	Πράσινος καρπός	Μαύρος καρπός
Αρχικό πλύσιμο	0.4-0.8	0.4-0.8
Αποπίκριση πράσινου καρπού	0.4-0.8	-
Έκπλυση μετά την αποπίκριση	2.6-4.8	-
Ζύμωση	0.4-0.8	0.4-0.8
Συσκευασία	0.3-0.6	0.3-0.6
Γενικότερη χρήση	0.1-0.3	0.1-0.3
Συνολική απαιτούμενη ποσότητα νερού (m ³ /tn ελιών)	4.2-8.1	1.2-2.5
Συνολική ποσότητα παραγόμενου αποβλήτου (m ³ /tn ελιών)	3.9-7.5	0.9-1.9

1.3.5 Μέθοδοι επεξεργασίας του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών

Ενώ, πολλές λύσεις έχουν προταθεί και εν' μέρει εφαρμοστεί, είτε σε εργαστηριακή είτε σε πιλοτική κλίμακα, για την επεξεργασία των αποβλήτων που προκύπτουν κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου, σχεδόν τίποτα ή πολύ ελάχιστα έχουν γίνει, για την επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, τόσο σε Πανελλαδικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο.

Οι ελάχιστες μελέτες που έχουν γίνει επάνω στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, αφορούν φυσικοχημικές μεθόδους επεξεργασίας, οι οποίες όμως περιορίζονται σε εργαστηριακή κλίμακα, αφού η πιλοτική εφαρμογή τους κρίνεται ιδιαίτερα αντικοινωνική.

Στις πιο πάνω μεθόδους ανήκει, η χημική οξείδωση του αποβλήτου με την απ' ευθείας χρήση όζοντος ή με συνδυασμένη δράση αυτού, με υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) ή με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Beltran *et al.*, 1999). Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομάκρυνση του οργανικού υλικού σε ποσοστό μεταξύ 80-90%, σχεδόν πλήρη αποδόμηση (τέλεια οξείδωση) των αρωματικών ενώσεων (πολυφαινολών) του αποβλήτου και πλήρης αποχρωματισμός. Επίσης παρατηρείται σημαντική μείωση του pH από 12.5 σε 7.0.

Μία δεύτερη μέθοδος που έχει εφαρμοστεί και αυτή σε εργαστηριακή κλίμακα για την επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, είναι η χημική οξείδωσή του από την χρήση του αντιδραστηρίου Fenton ($Fe^{2+} - H_2O_2$) (Filipakopoulou, 1999). Η διεργασία Fenton είναι μία μέθοδος επεξεργασίας υγρών βιομηχανικών αποβλήτων, που αφορά συνδυασμό χημικής οξείδωσης και κροκίδωσης. Πραγματοποιείται με προσθήκη στο απόβλητο, μίγματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και θεικού σιδήρου ($FeSO_4$). Το μίγμα αυτό είναι ικανό να προκαλεί οξείδωση σε ορισμένα οργανικά οξέα και άλλα οργανικά υποστρώματα, μέσω του σχηματισμού ριζών υδροξυλίου (HO). Η μέθοδος αυτή προκαλεί μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου πάνω από 90%, υψηλό αποχρωματισμό και μεγάλη απομάκρυνση λιπών και ελαίων.

1.4. Στόχος της παρούσας εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να προσεγγίσουμε το πρόβλημα της επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, με χρήση βιολογικών μεθόδων. Προς την κατεύθυνση αυτή, διερευνώνται διάφορες, αυτόνομες βιολογικές διεργασίες, ώστε να διαπιστωθεί εάν, κατά πόσο και σε ποιες ιδιότητες του αποβλήτου επιδρούν. Το δεύτερο βήμα είναι ο συνδυασμός των μεθόδων αυτών, έτσι ώστε να προκύπτει το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα για την μείωση του φαινολικού και οργανικού φορτίου, που θα οδηγήσει στη μείωση της τοξικότητάς του και άρα στην ασφαλή

διάθεση αυτού. Ταυτόχρονα, εστιάζουμε την προσοχή μας, στην εκμετάλλευση όλων των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων που παράγονται σε όλα τα στάδια των επιμέρους διεργασιών, κάτι που βοηθάει να καταλήξουμε, στην πρόταση μιας ολοκληρωμένης, αποτελεσματικής και ταυτόχρονα βιώσιμης οικονομικά λύσης για την διαχείριση του αποβλήτου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΧΡΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Ο ρόλος των μυκήτων, στην αντιμετώπιση του σημαντικού προβλήματος της αποτοξικοποίησης των αποβλήτων των ελαιουργείων, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η ικανότητα τους να βιομετατρέπουν τα υγρά απόβλητα, μπορεί να αξιοποιηθεί προς δύο κατευθύνσεις: α) μέσω της παραγωγής ενός ενδιάμεσου προϊόντος επιδεκτικού σε περαιτέρω φυσικοχημικούς και βιολογικούς χειρισμούς και β) στη παραγωγή ενός χρήσιμου τελικού προϊόντος.

Διάφορα είδη ζυμών όπως οι, *Torulopsis utilis*, *Saccharomyces lipolitica* και *Geotrichum candidum*, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο ζωοτροφών, ενώ παράλληλα μειώνουν σημαντικά το οργανικό φορτίο του αποβλήτου των ελαιουργείων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η ζύμη *Yarrowia lipolytica* χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή βιομάζας ενώ μείωσε το ΧΑΟ του αποβλήτου κατά 80%. Η εμπορική αξιοποίηση της παραγόμενης βιομάζας αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς στόχους των ερευνητών. Επίσης, ο μύκητας *Aspergillus niger* ήταν ιδιαίτερα αποδοτικός στη μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου κατά 72%, το οποίο και αποχρωμάτισε μερικώς, μειώνοντας το φαινολικό φορτίο κατά- 76% (Garcia *et al.*, 1999). Επίσης οι Sayadi *et al.*, (1993) παρατήρησαν ότι ο *Aspergillus niger* δεν επέδρασε στις μεγάλες ποσότητες πολυφαινολικές ενώσεις, παρ' ότι αποδόμησε μεγάλη ποσότητα ταννινών και άλλων αρωματικών ενώσεων.

Η αποτελεσματικότητα της χρήσης ορισμένων μυκήτων στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων, οφείλεται στην ικανότητα, να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα, μεταβολίζοντας φαινολικές ενώσεις, ταννίνες, και άλλες ενώσεις παρεμφερών δομών. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συσχέτιση της μείωσης της συγκέντρωσης των

ταννινών και των αρωματικών ενώσεων, με την αποτελεσματικότερη δράση των αναερόβιων μεθανογόνων βακτηρίων, αφού μειώνεται η παρεμποδιστική δράση του αποβλήτου ως προς αυτά (Sierra-Alvarez and Lettinga, 1990, Beccari *et al.*, 1999, Hamdi and Moctar, 1992). Ο *Aspergillus terreus* χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων (García *et al.*, 1999), επιτυγχάνοντας μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) κατά 63% και των φαινολικών ουσιών κατά 64%.

2.2 Οι μύκητες ως συντελεστές αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων

2.2.1 Γενικά

Αρκετές από τις αρωματικές ενώσεις της ομάδας των φαινολών που έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνες για την τοξικότητα των αποβλήτων των ελαιουργείων και το μαύρο χρώμα τους, έχουν δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της λιγνίνης. Οι μυκηλιακοί μύκητες είναι οι κυρίως υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για την αποδόμηση της λιγνίνης στη φύση, ενώ οι πιο αποδοτικοί αποδομητές της ομάδας αυτής είναι οι βασιδιομύκητες (Kirk and Farrell, 1987).

2.2.2 Κατηγορίες ανώτερων βασιδιομυκήτων

Υπάρχουν τρεις συγκεκριμένοι τύποι μυκήτων οι οποίοι αναπτύσσονται σαπροτροφικά στο νεκρό (σάπιο) ξύλο και αποδομούν επιλεκτικά ένα ή περισσότερα από τα συστατικά του: οι μύκητες φαιάς σήψης (brown rot), μαλακής σήψης (soft rot) και οι μύκητες λευκής σήψης (white rot).

Οι μύκητες φαιάς σήψης, αποτελούν μια σχετικά μικρή ομάδα βασιδιομυκήτων, οι οποίοι αποσυνθέτουν την κυτταρίνη και την του ξύλου, παρακάμπτοντας τη λιγνίνη. Παρ' όλο που οι μύκητες αυτοί διασπούν τις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες, τα ένζυμα που παράγουν είναι αρκετά μεγάλα, ώστε να μπορέσουν να διαπεράσουν το υλικό του κυτταρικού τοιχώματος του ξύλου, κάτι που καθιστά απαραίτητη την συνύπαρξή τους μαζί με άλλα ενζυμικά συστήματα για αποτελεσματική αποδόμηση. Το βιοχημικό σύστημα που επιτρέπει στους μύκητες αυτούς να δρουν κατ' αυτόν το τρόπο δεν έχει

ακόμα χαρακτηρισθεί.

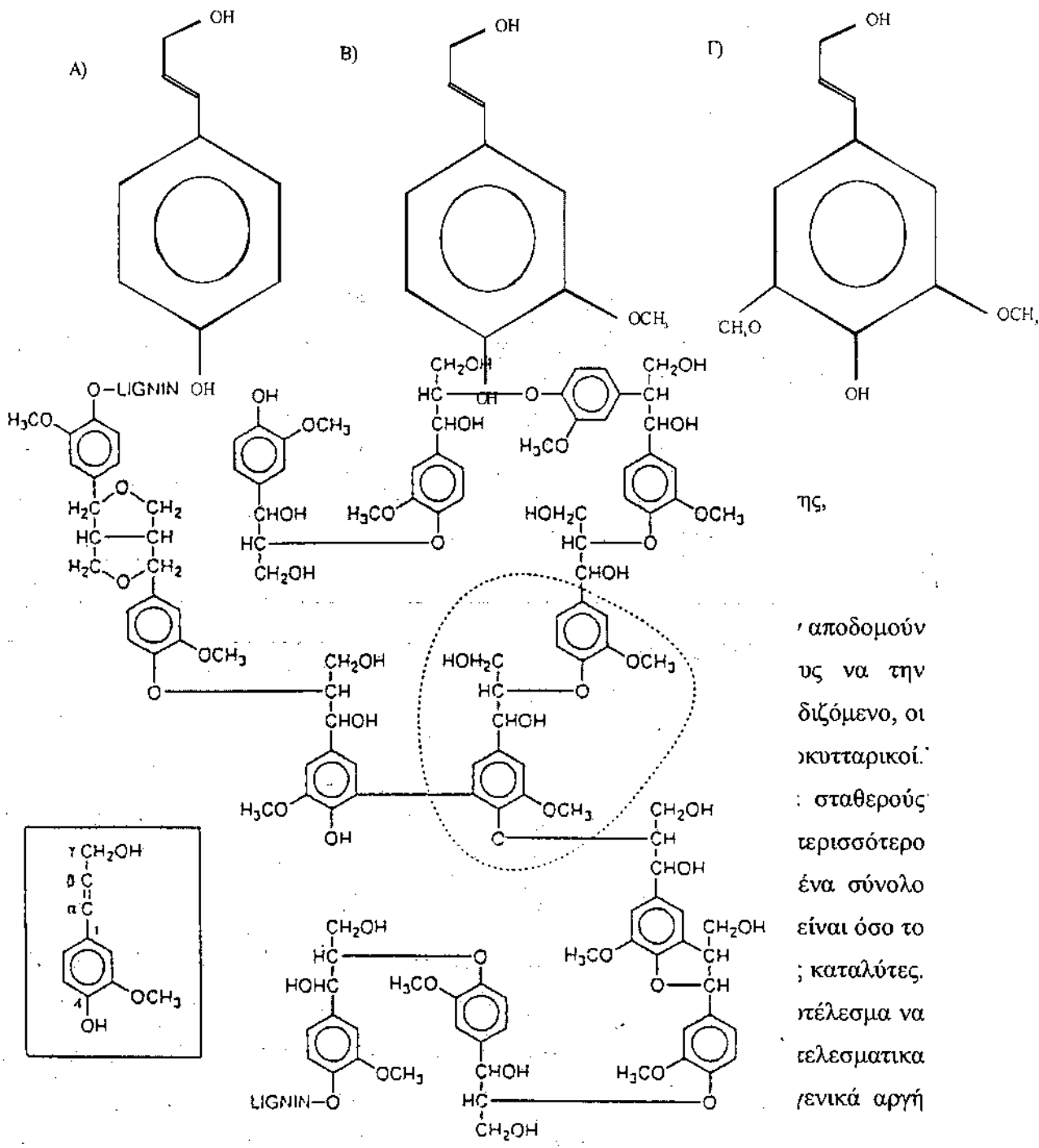
Οι μύκητες *μαλακής σήψης* (Ασκομύκητες και Δευτερομύκητες), είναι πιο αργοί και λιγότερο αποτελεσματικοί αποδομητές από τις άλλες δύο κατηγορίες μυκήτων και συνεπώς είναι μικρότερης σημασίας από ποσοτική άποψη. Αποδομούν επιλεκτικά τους πολυσακχαρίτες του ξύλου και εμφανίζουν μερική ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης (Dix and Webster, 1995). Ελάχιστη έρευνα έχει γίνει επάνω στους μύκητες μαλακής σήψης και γι' αυτό οι μηχανισμοί αποδόμησης που χρησιμοποιούν παραμένουν άγνωστοι.

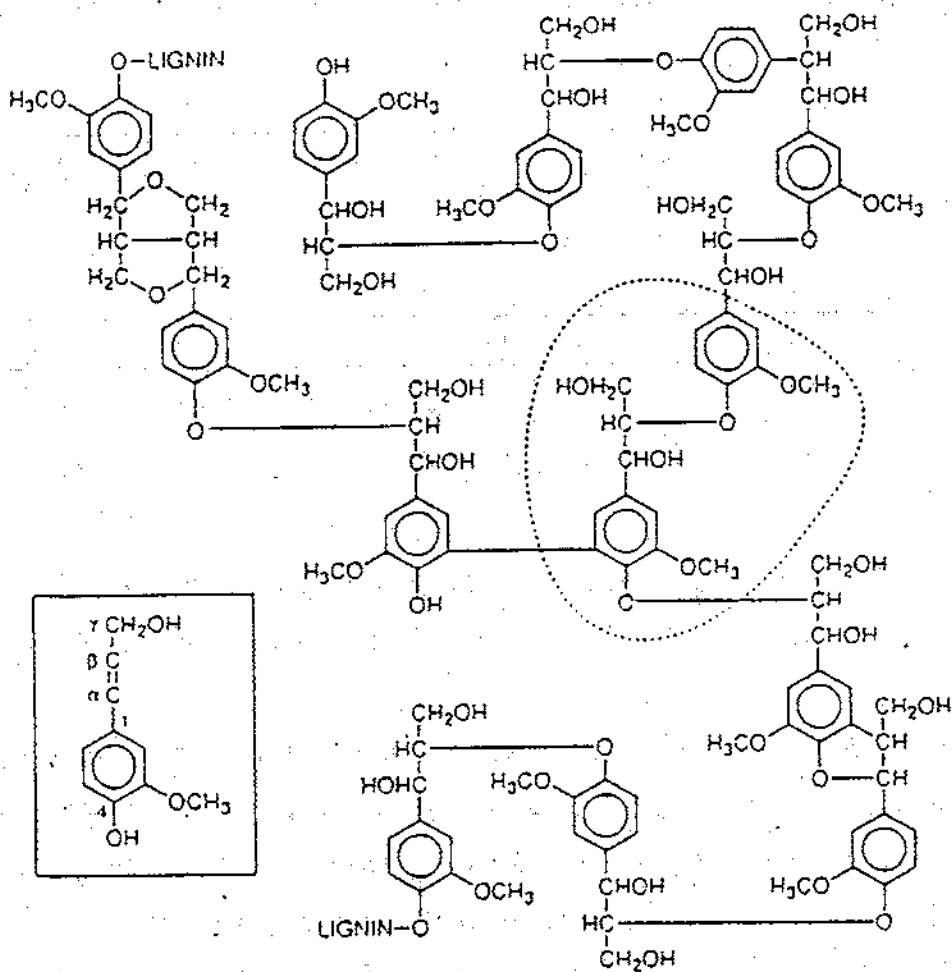
Οι μύκητες *λευκής σήψης* είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι και οι πιο αποδοτικοί αποδομητές στη φύση, οι οποίοι αποδομούν κυτταρίνη και λιγνίνη. Οι μύκητες αυτοί αποσυνθέτουν πρώτα τη λιγνίνη, ώστε να είναι πιο εύκολη η πρόσβασή τους στην κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες που προστατεύονται από αυτή. Οι ιδιαίτερες ιδιότητες του ενζυμικού συστήματος των μυκήτων λευκής σήψης, που τους καθιστούν τόσο αποδοτικούς αποδομητές φαινολικής φύσης, συσχετίζονται άμεσα με τη δομή της λιγνίνης. Πολλά είδη μυκήτων λευκής σήψης, διαφόρων γενών, που βρίσκονται σε δασικά οικοσυστήματα, έχουν ήδη ταξινομηθεί και περιγραφεί. (Rayner and Boddy, 1988, Boddy, 1992, Dix and Webster, 1995).

2.2.3 Η δομή της λιγνίνης

Το μόριο της λιγνίνης είναι ένα αρωματικό πολυμερές, το οποίο σχηματίζεται από την επανάληψη βασικών πρόδρομων μονομερών μονάδων. Υπάρχουν τρεις τέτοιες πρόδρομες μονάδες, με κοινή την δομή τύπου φαινυλο-προπανίου και διαφέρουν στον αριθμό των μεθοξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου (Σχήμα 3.1).

Οι βασικές αυτές μονάδες (coniferyl alcohol, synapyl alcohol και *p*- coumaryl alcohol) συνδέονται μεταξύ τους με σταθερούς ναθρακικούς και αιθερικούς δεσμούς, σε όλους του δυνατούς συνδυασμούς (μεταξύ δυό βενζολικών δακτυλίων, δυο πλάγιων προπανοικών αλυσίδων, πλάγιας αλυσίδας και δακτυλίου, κλπ) δημιουργώντας έτσι το ιδιαίτερα πολύπλοκο και πολύ σταθερό μόριο της λιγνίνης (Σχήμα 2.2.)





Σχήμα 2.2. Η δομή του μορίου της λιγνίνης

2.2.4 Συνθήκες δράσης λιγνινολυτικών μυκήτων

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

Στους περισσότερους από τους μύκητες που έχουν μελετηθεί, η λιγνινόλυση συμβαίνει

κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό, κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό για την παραγωγή των λιγνιολυτικών ενζύμων είναι στις περισσότερες περιπτώσεις το άζωτο, γι' αυτό και οι έρευνες για τους λιγνιολυτικούς μύκητες εστιάζονται στην καλλιέργειά τους σε φτωχά, σε άζωτο, υποστρώματα. Με δεδομένο το γεγονός ότι η λιγνίνη αποτελεί ένα δύσκολο αποδομήσιμο πολυμερές, είναι προφανές ότι οι μύκητες επιστρατεύουν ασυνήθιστους μηχανισμούς για να την αποδομήσουν. Αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει τους μηχανισμούς αυτούς και όλοι παρουσιάζουν ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό: έχουν ως βάση τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, προερχόμενων από τη λιγνίνη, όπου στη συνέχεια (εξ' αιτίας της αστάθειάς τους), λαμβάνουν μέρος σε μια σειρά αυθόρμητων αντιδράσεων διάσπασης.

2.2.5 Λιγνιολυτικά ένζυμα και μηχανισμοί λιγνιόλυσης

Πολλά από τα ένζυμα των μυκητών λευκής σήψης, που αποδομούν την λιγνίνη σε πολύ μεγάλο βαθμό, δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί. Ωστόσο, τρία οξειδωτικά ένζυμα είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος στην αποδόμηση της λιγνίνης και τα οποία παράγονται από τους μύκητες λευκής σήψης. Πρόκληση για την επιστήμη αποτελεί, η συλλογή σίγουρων πληροφοριών, όσον αφορά το ρόλο και τον τρόπο με τον οποίο δρουν τα ένζυμα αυτά πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την περιγραφή ενός ολοκληρωμένου λιγνιολυτικού ενζυμικού συστήματος. Αυτό πάντως που είναι ξεκάθαρο, είναι πως διάφοροι συνδυασμοί ενζύμων, παράγονται από τα διάφορα είδη των λιγνιολυτικών μυκήτων (Hatakka et al., 1994), καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν περισσότερες από μία «στρατηγικές» για την επιτυχή αποδόμηση της λιγνίνης.

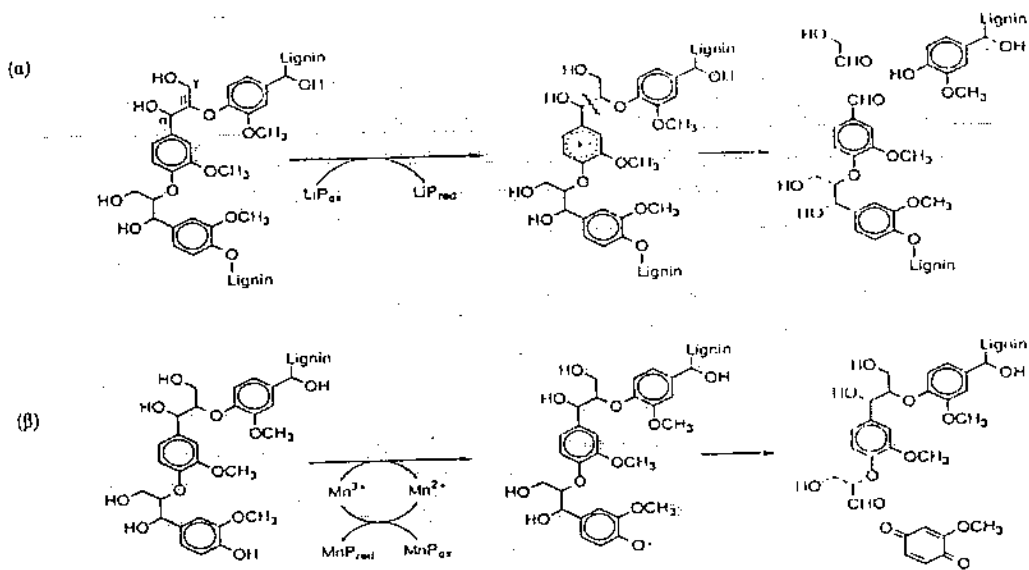
2.2.5.1 Λιγνινάσες (*Lignin peroxidases*, *LiPs*)

Από τα πρώτα λιγνιολυτικά ένζυμα των μυκήτων που ανακαλύφθηκαν, είναι οι λιγνινάσες (*LiPs*) (Glen et al., 1983, Tien and Kirk, 1983), που ανήκουν στην ομάδα των υπεροξειδασών. Η παρουσία τους έχει ανιχνευθεί (ή διαπιστωθεί) σε μύκητες λευκής σήψης όπως οι, *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk and Farrell, 1987), *Trametes versicolor* (Kaal et al., 1993), κ.α, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σε άλλα είδη όπως οι

Dichomilus squalens (Perie and Gold, 1991), *Pleurotus ostreatus* (Ruttimann-Johnson et al., 1993) και *Ceriporiopsis sllbvermispora* (Kerem et al., 1992).

Οι λιγνινάσες οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ενδιάμεση (οξειδωμένη) μορφή τους επανέρχεται στην αρχική της κατάσταση, προσλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια που της λείπουν από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος (δότης), μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι λιγνινάσες είναι πολύ ισχυροί οξειδωτές, μια και οξειδώνουν όχι μόνο τα συνηθισμένα υποστρώματα δράσης των υπεροξειδασών (πολυφαινόλες), αλλά και πολλές μη φαινολικές δομές λιγνίνης και αρωματικών αιθέρων, που μοιάζουν με την βασική μονάδα αυτής. Η οξείδωση της βερατρυλ-αλκοόλης (3,4-διμέθοξυβενζυλ-αλκοόλη) σε βερατραλδεύδη, από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους ανίχνευσης LiP, σε διάφορες καλλιέργειες μυκητών (Kirk et. Al., 1990).

Με βάση τον μηχανισμό των οξειδωτικών αντιδράσεων, οι λιγνινάσες (LiPs) οδηγούν στον αποπολυμερισμό των λιγνινοκυπαρινούχων υποστρωμάτων, με ενδιάμεσο στάδιο την δημιουργία ελευθέρων ριζών, που αντιδρούν σε μία σειρά μετενζυμικών αντιδράσεων. Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2.a η LiP επιδρά στο σπάσιμο του δεσμού (α-β), που αποτελεί την κύρια διαδικασία λιγνινόλυσης σε πολλούς μύκητες λευκής σήψης (Kirk and Farrell, 1987)



Σχήμα 2.3.: Διάσπαση του μορίου της λιγνίνης, (α) από το ένζυμο LiP (υπεροξειδάση της λιγνίνης) και (β) από το ένζυμο MnP (υπεροξειδάση του μαγγανίου).

Ωστόσο, ένα πρόβλημα που παραμένει άλυτο, στην υπόθεση ότι η LiP καταλύει την λιγνινόλυση, είναι το μέγεθος του ενζύμου, που είναι πολύ μεγάλο για να μπορεί να διεισδύει στους πόρους του ξύλου (Srebotnik *et al.*, 1988). Εάν λοιπόν το ένζυμο ξεκινάει άμεσα την λιγνινόλυση, θα πρέπει να δρα στην επιφάνεια του δευτερεύοντος κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η δράση έχει διαπιστωθεί για ορισμένα είδη μυκήτων ενώ, από παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, υποδεικνύεται ότι οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν επίσης να «μετακινούν» την λιγνίνη από το εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος, πριν την αποδομήσουν αρκετά, έτσι ώστε τα ένζυμα να μπορούν να διεισδύσουν.

Βέβαια, υπάρχει και μια υπόθεση για έμμεση δράση της LiP, η οποία παρακάμπτει το πρόβλημα της διείσδυσης. Αυτό συμβαίνει, οξειδώνοντας μικρού μοριακού βάρους υποστρώματα που μπορούν να διεισδύσουν στο λιγνινοκυτταρικό υλικό και να δράσουν τα ίδια ως οξειδωτές, σε απόσταση από το ένζυμο (Harvey *et al.*, 1986), αν και ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί ενώσεις που να παίζουν τέτοιο ρόλο.

Αυτό που αξίζει να επισημάνουμε, είναι ότι η LiP παραμένει το μόνο γνωστό οξειδωτικό μέσο των μυκήτων, που μπορεί να μιμηθεί *in vitro* την αντίδραση διάσπασης του δεσμού Ca-Cβ. Η αντίδραση αυτή αποτελεί και το χαρακτηριστικό της λιγνινόλυσης από τον μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*. Έτσι λοιπόν, η LiP μπορεί να θεωρηθεί ως πολύ σημαντικός παράγοντας στην διεργασία της λιγνινόλυσης, που όμως δρα σε συμφωνία με άλλους μικρότερους «οξειδωτές», ικανούς να διεισδύσουν και να διανοίξουν το κυτταρικό τοίχωμα.

2.2.5.2 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (*Manganese peroxidases, MnPs*)

Η υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs), είναι από τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα των υπεροξειδασών και παράγεται από τους μύκητες λευκής σήψης. Είναι οι καταλύτες, από τη δράση των οποίων μπορεί να παρέχονται τα μικρού μοριακού βάρους οξειδωτικά μέσα, στα οποία αναφερθήκαμε παραπάνω. Ο μηχανισμός οξείδωσης που ακολουθούν παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3β.

Η διαφορά της MnP από τις συμβατικές υπεροξειδάσες, είναι ότι το Mn^{2+} είναι ο υποχρεωτικός δότης, που δίνει στο ένζυμο το ένα ηλεκτρόνιο που του λείπει, για να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και ταυτόχρονα μετατρέπεται σε Mn^{3+} . Η αντίδραση αυτή απαιτεί την παρουσία χηλικών οργανικών οξέων, όπως το οξαλικό, που σταθεροποιούν το Mn^{3+} και προάγουν την ελευθέρωσή του από το ένζυμο. Δεν αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά μέσα, πράγμα που τα καθιστά ανίκανα να δράσουν στις πολύπλοκες μη φαινολικές δομές της λιγνίνης, εντούτοις οξειδώνουν αποτελεσματικά άλλες φαινολικές δομές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 10% του μορίου της λιγνίνης. Μια ενδιαφέρουσα άποψη υποστηρίζει ότι το Mn^{3+} , που προέρχεται από την MnPs, μπορεί να αποδομεί φαινολικές δομές της λιγνίνης και έτσι να κάνει δυνατή αργότερα την επίδραση της περισσότερο ισχυρής LiP. Πρέπει, ωστόσο, να παρατηρήσουμε ότι οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις λιγνινάσες (LiP) και τις υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs), δεν αποτελούν το μόνο δρόμο που ακολουθούν οι μύκητες για τη διάσπαση της λιγνίνης και παρεμφερών δομών, αφού υπάρχουν και μύκητες που χρησιμοποιούν άλλους μηχανισμούς (Srebotnik *et al.*, 1994).

2.2.5.3 Λακκάσες (*Laccases*)

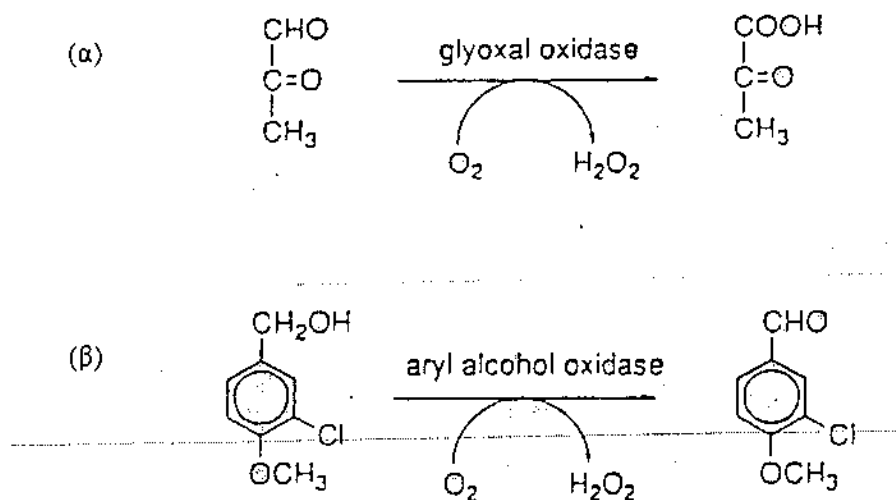
Οι λακκάσες είναι μια άλλη ομάδα λιγνινολυτικών ενζύμων, που ανήκουν στην ομάδα των φαινολοξειδάσεων και παρουσιάζουν μικρή εκλεκτικότητα στα υποστρώματα που καταλύουν. Πολλά είδη λιγνινολυτικών μυκήτων παράγουν λακκάσες, ενώ σημαντική εξαίρεση αποτελεί το είδος *Phanerochaete chrysosporium*. Πρόκειται για ένζυμα, τα οποία περιέχουν πολλαπλά άτομα χαλκού και τα οποία ανάγονται, οξειδώνοντας ταυτόχρονα τα-υποστρώματα πάνω στα οποία δρουν. Μετά από την λήψη τεσσάρων ηλεκτρονίων από ένα μόριο λακκάσης, το μόριο ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε νερό και επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Η παρουσία κάποιων τεχνητών βοηθητικών υποστρωμάτων, μπορεί να επιτείνει την δράση της λάκκας, ώστε να οξειδώνει και μη φαινολικές ενώσεις, που πιθανόν δεν θα οξειδωνε υπό διαφορετικές συνθήκες. Όμως δεν είναι γνωστό κατά πόσο, φυσικές παραλλαγές τέτοιων βοηθητικών υποστρωμάτων, δρουν *in vivo* στην βιοαποδόμηση της λιγνίνης (Bourbonnais and Paice, 1992).

2.2.6 Ένζυμα που παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Για να είναι δυνατή η δράση των ανωτέρω υπεροξειδάσων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη λιγνινόλυση, οι μύκητες λευκής σήψης χρειάζονται πηγές εξωκυτταρικού H_2O_2 . Η ανάγκη αυτή καλύπτεται από τις εξωκυτταρικές οξειδάσες, που ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε υπεροξειδίο με συνεπακόλουθη την οξείδωση του υποστρώματος (Σχήμα 2.4α). Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η γλουοξεική οξειδάση (GLOX) (Kersten, 1990) που έχει ανιχνευθεί σε πολλούς μύκητες λευκής σήψης. Η GLOX γίνεται δέκτης ηλεκτρονίων (ανάγεται) από πολλές (1-3) αλδεύδες. Οι αρυλ-αλκοοξειδάσες (AAOS, Σχήμα 2.4β) παρέχουν έναν άλλο τρόπο παραγωγής H_2O_2 σε ορισμένους μύκητες λευκής σήψης. Έτσι σε ορισμένα είδη που παράγουν LiP. Εκκρίνονται χλωριωμένες ανισιλ-αλκοόλες σαν εξωκυτταρικοί μεταβολίτες και μετά ανάγονται από συγκεκριμένες αρυλ-αλκοοξειδάσες προς παραγωγή H_2O_2 (de Jong *et al.*, 1994).

Μία διαφορετική πορεία ακολουθείται από τους μύκητες οι οποίοι στερούνται ύπαρξη LiP (π.χ *Pleurotus*). Αυτοί παράγουν και οξειδώνουν ένα μείγμα από βενζυλαλκοόλες, συμπεριλαμβανομένης και της ανισυλ-αλκοόλης, για να διατηρούν παροχή H_2O_2 (Guillen

et al., 1992). Σε άλλους μύκητες, εσωκυτταρικές οξειδάσες πιθανόν να ευθύνονται για την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Kirk and Farrell, 1987).



Σχήμα 2.4. Παραγωγή εξωκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου από (α) το ένζυμο glyoxal oxidase (γλουοξική οξειδάση) και (β) το ένζυμο aryl alcohol oxidase (αρυλαλκοόλ-οξειδάση).

2.2.7 Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοαποδόμηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων

Μύκητες που ανήκουν στην ομάδα λευκής σήψης όπως οι, *Phanerocheate chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, κ.α, έχουν κατά καιρούς αξιολογηθεί, ως προς την ικανότητα τους να βιομετατρέπουν υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Η σημαντική ικανότητα αποχρωματισμού που επέδειξε ο μύκητας *Phanerocheate chrysosporium* (Sayadi and Ellouz, 1992), συσχετίστηκε με την ταχύτητα και την ικανότητά του να αποδομεί αρωματικές ενώσεις μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους. Ο ιδιαίτερα υψηλός βαθμός αποχρωματισμού που παρατηρείται σε ορισμένους από τους μύκητες αυτούς, συσχετίζεται με τη δράση των ενζύμων LiP και MnP.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Grappelli *et al.*, (1991), όπου διαπιστώθηκε η ικανότητα του μύκητα *Lentinula edodes* να μειώνει το φαινολικό φορτίο των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων, παράγοντας ταυτόχρονα σημαντική ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας. Ο μύκητας αυτός είναι επιλεκτικός αποδομητής της λιγνίνης, αποδομώντας τη σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (Leatham and Kirk, 1983).

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus*, είναι από τους πιο αποδοτικούς, όσο αφορά την παραγωγή κυτταρινολυτικών και λιγνινολυτικών ενζύμων. Στο γένος αυτό, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την διάσπαση της λιγνίνης, είναι κυρίως οι λακκάσες, ενώ πρόσφατα αναγνώστηκε η LiP (Burla *et al.*, 1992). Ενδεικτικά αναφέρουμε, ότι κατά καλλιέργεια τεσσάρων ειδών του γένους *Pleurotus*, σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου διαπιστώθηκε ότι τα είδη αυτά που παρήγαγαν περισσότερη λακκάση, αποδομούσαν τις φαινολικές ενώσεις ταχύτερα και πληρέστερα (Sanjust *et al.*, 1991).

Έτσι διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της βιομάζας προκαλεί ταυτόχρονη αύξηση παραγωγής ενζύμου (Tomati *et al.*, 1991, Zohar Kerem *et al.*, 1992). Άρα γίνεται φανερό ότι, η λειτουργία του ενζυμικού συστήματος βιοαποδόμησης των μυκήτων του γένους *Pleurotus*, ενεργοποιείται από μία σειρά ενώσεων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων όπως οι πολυφαινόλες, οι αρωματικές αμίνες, οι διμέθυλο τριμέθυλοφαινόλες, κ.α, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων (Martirani *et al.*, 1996).

Επίσης, ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει, από πολλές ερευνητικές εργασίες, είναι ότι οι μύκητες λευκής σήψης, ανάλογα με το είδος και το γένος που ανήκουν, παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις, όσον αφορά την ικανότητα αποχρωματισμού και μείωσης των φαινολικών ουσιών των αποβλήτων των ελαιουργείων.

2.3 Επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών με χρήση μυκήτων λευκής σήψης.

2.3.1. Γενικά

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα θετικά αποτελέσματα που επιφέρει η δράση των μυκήτων «λευκής σήψης» στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων, τόσο όσο

αφορά τον αποχρωματισμό, τη μείωση των πολυφαινολών και την αποτοξικοποίηση τους, η χρήση των μικροοργανισμών αυτών είναι πολύ πιθανόν να έχει εξίσου θετικά αποτελέσματα, στην επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών και έτσι να συμβάλει σημαντικά στην μείωση της τοξικότητας του. με τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 2.2. Ξηρό βάρος παραγόμενης βιομάζας από την συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ οκτώ γενών ανώτερων βασιδιομυκήτων.

Είδη βασιδιομυκήτων	Ξηρό βάρος (mg/100ml αποβλήτου)	
	Αρχικό (0 ημέρα)	Τελικό (31 ημέρα)
<i>Abortiporus biennis</i>	8.06	9.15
<i>Dichomitus squalens</i>	8.16	12.10
<i>Inonotus hispidus</i>	7.94	12.20
<i>Irpex lacteus</i>	7.80	8.81
<i>Lentlnus tignnus</i>	8.09	13.64
<i>Panellus stipticus</i>	7.09	10.06
<i>Pleurotus ostreatus</i>	9.01	18.42
<i>Trametes hirsuta</i>	8.08	12.41

Τα πιο αποδοτικά στελέχη βασιδιομυκήτων στη μείωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου ήταν τα *P. ostrealus* (51.5%) και *A. biennis* (54.5%) και ακολούθησαν τα *P. stipticus* και *D. squalens* με αποδόμηση των φαινολικών κατά 42.2% και 36.4%, αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι τέσσερις μύκητες (*T. hirsuta*, *I hispidus*, *L. tirginus*, *I lacteus*), δεν επέδειξαν σημαντική μείωση φαινολικών κατά την διάρκεια επώασης (Πίνακας 2.3). Μόνο ο μύκητας *P. ostreatus*, επέδειξε υψηλό βαθμό αποχρωματισμού του αποβλήτου (48.9%) και ακολούθησαν τα λιγότερο αποτελεσματικά, *A. biennis* και *P. stipticus* με 9.1 % και 8,4%, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα είδη δεν αποχρωμάτισαν καθόλου το απόβλητο (Πίνακας 2.3). Είναι επίσης αξιοσημείωτο, ότι ο μύκητας *A. biennis* ήταν αποδοτικός στην μείωση των φαινολικών ενώσεων, παρ' ότι παράγαγε σημαντικά λιγότερη βιομάζα από τα υπόλοιπα, επίσης αποδοτικά είδη, των *P.ostreatus*, *D. squalens* και *P. stipticus*.

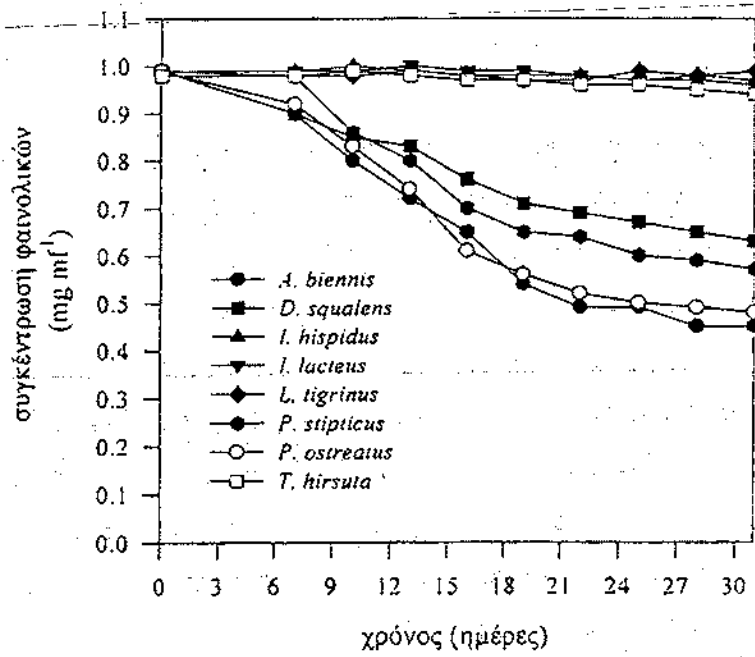
Τα στελέχη *P. ostreatus* και *A. biennis* επέδειξαν παρόμοια πορεία και απόδοση στην

αποδόμηση των φαινολικών (Σχήμα 3.5), αρχίζοντας την αποδόμηση από τις πρώτες ημέρες επώασης στο απόβλητο και επιτυγχάνοντας μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης μεταξύ 7 και 21 ημερών, αποδομώντας στο διάστημα αυτό, το 84.3% και 92.7%, του τελικά αποδομούμενου φαινολικού περιεχομένου, αντίστοιχα. Ο μύκητας *P. stipticus* παρουσίασε μια «ευδιάκριτη» φάση υστέρησης κατά τις πρώτες 7 ημέρες επώασης, ενώ ο μύκητας *D. squalens*, που ήταν ο λιγότερο αποδοτικός από αυτούς που αναφέρθηκαν προηγούμενα, παρουσίασε πολύ μικρή φάση υστέρησης (Σχήμα 2.5).

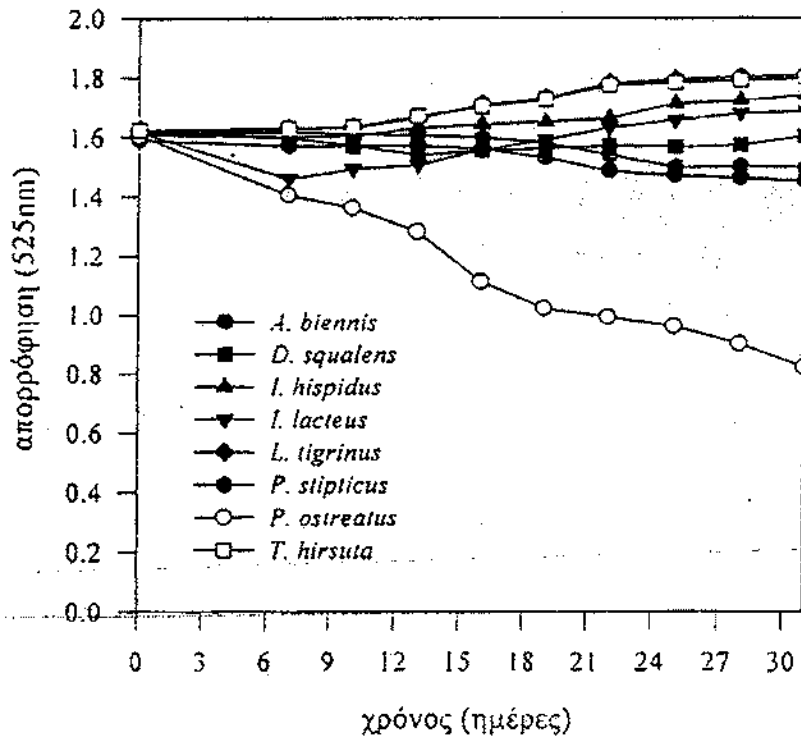
Πίνακας 2.3.3. Ποσοστά αποδόμησης ολικών φαινολικών και αποχρωματισμού του αποβλήτου, από την δράση οκτώ γενών βασιδιομυκήτων κατά τη διάρκεια 31 ημερών επώασης

Χρόνος (ημέρες)	Αποδόμηση φαινολικών (%)			Αποχρωματισμός (%)		
	10	19	31	10	19	31
Είδη βασιδιομυκήτων						
<i>Abortiporus biennis</i>	19.20	45.50	54.50	1.81	4.19	9.14
<i>Dichomitlls squalens</i>	14.10	28.30	36.40	2.36	2.86	0.37
<i>Inonotlls hispidus</i>	0,00	1.01	2.02	0.93	-1.91	-7.40
<i>Irpex lacteus</i>	0.00	0.00	3.03	7.43	1.61	-4.52
<i>Lentinus tigrinus</i>	1.01	2.02	0.00	-0.43	-6.46	-11.20
<i>Panelllls stipticus</i>	13.10	34.30	42.40	0.31	2.17	8.40
<i>Plellrotus ostreatus</i>	16.20	43.40	51.50	15.20 -	36.45	48.91
<i>Trametes hirsuta</i>	0.00	2.00	5.10	-0.68	-6.28	-10.78

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, μόνο ο μύκητας *P. ostreatus* προκάλεσε σημαντικό αποχρωματισμό του αποβλήτου, που άρχισε από τις πρώτες ημέρες επώασης και συνεχίστηκε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Σχήμα 2.6). Ο αποχρωματισμός αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από την δράση των υπόλοιπων στελεχών και μετά το τέλος της επώασης, προέκυψε απόβλητο που έδινε αρνητικές τιμές αποχρωματισμού. Αυτό οφείλεται, πιθανόν στο σχηματισμό κάποιων μεταβολιτών



Σχήμα 2.5. Πορεία αποδόμησης ολικών φαινολικών του αποβλήτου από την δράση οκτώ γενών βασιδιομυκητών κατά την διάρκεια 31 ημερών επώασης.



Σχήμα 2.6. Πορεία αποχρωματισμού του αποβλήτου από την δράση οκτώ γενών βασιδιομυκητών κατά την διάρκεια 31 ημερών επώασης

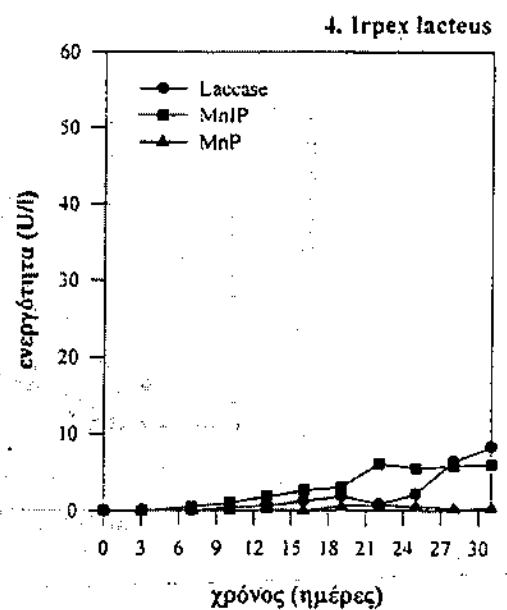
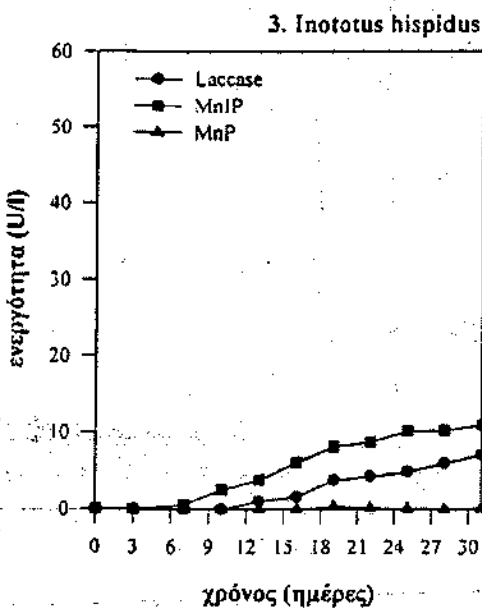
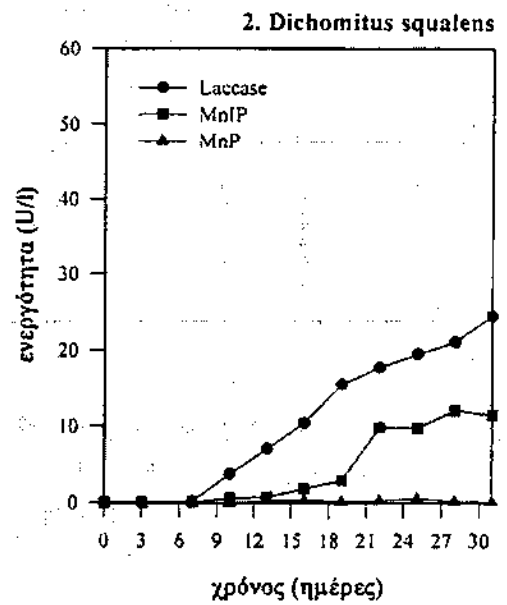
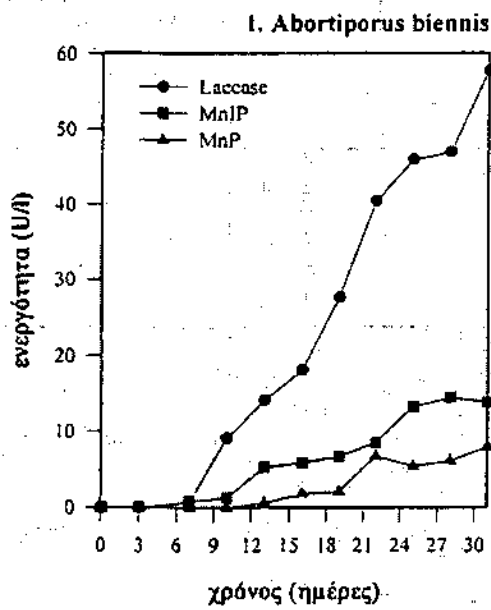
από την δράση του μύκητα στο απόβλητο, οι οποίοι «απορροφούν» περισσότερο χρώμα στο συγκεκριμένα μήκος κύματος των 525nm, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αποχρωματισμού.

Από την πλευρά της παραγωγής των ενζύμων, η λακκάση (Laccase) ήταν το ένζυμο που παρήχθη σε μεγαλύτερη ποσότητα από όλους τους μύκητες και ακολούθησε η MnIP (Manganese independent peroxidase) (Σχήματα 2.7 & 2.8). Στις καλλιέργειες των μυκήτων, *A. biennis* (Σχήμα 2.7.1) και *P. ostreatus* (Σχήμα 2.8.3), ανιχνεύθηκε πολύ υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης απ' ότι στα υπόλοιπα στελέχη που αξιολογήθηκαν (Πίνακας 2.4). Το ένζυμο MnP (Manganese peroxidase) ανιχνεύθηκε από τα αρχικά στάδια, μόνο στον μύκητα *P. ostreatus*, ενώ ανιχνεύθηκε και στον *A. biennis* στα τελευταία στάδια επώασης και σε χαμηλή ενεργότητα. Επίσης, σε κανένα από τα στελέχη δεν ανιχνεύθηκαν τα ένζυμα: υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και οξειδάση της βερατρώλαλκοόλης (VAOX).

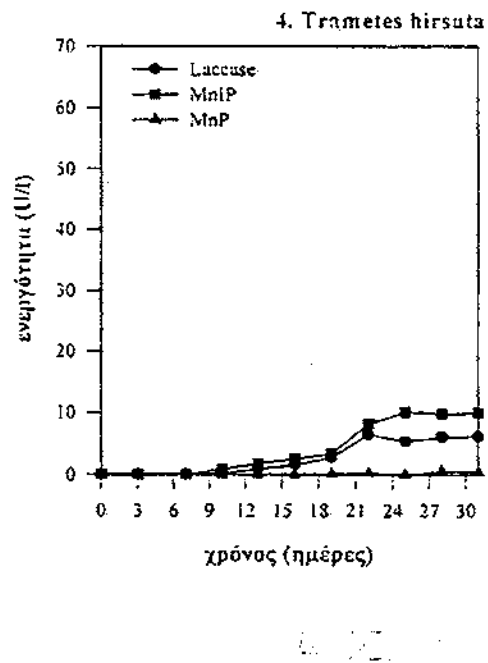
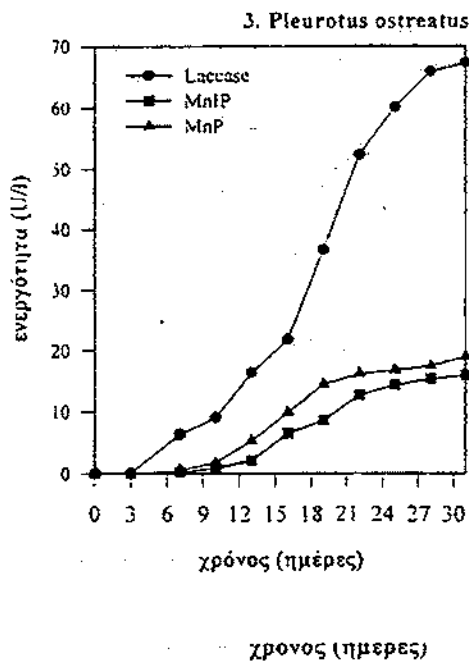
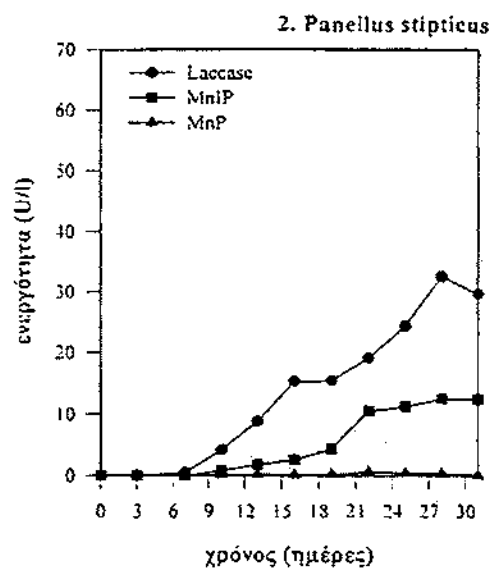
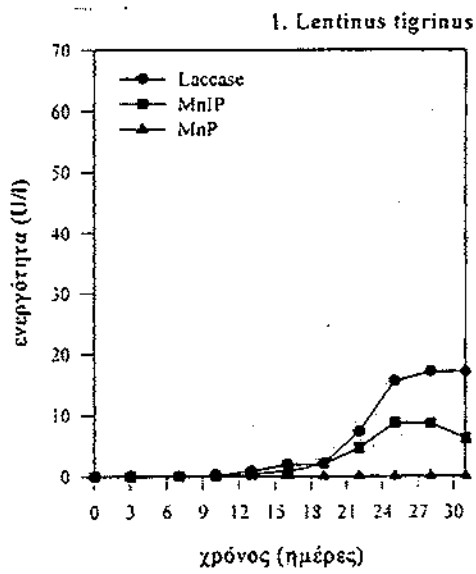
Ένα σημαντικό συμπέρασμα που προέκυψε, από τα τεστ φυτοτοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν μετά το τέλος της επώασης, είναι ότι κανένα από τα στελέχη δεν επέφερε μείωση της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου (0% δείκτης βλαστικότητας).

2.3.2 Μέτρηση γραμμικής αύξησης και συγκριτική αξιολόγηση στελεχών *Pleurotus* σε στερεοποιημένο απόβλητο πράσινων βρώσιμων ελιών.

Μετά την πρώτη συγκριτική αξιολόγηση, μεταξύ των ειδών βασιδιομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν και με βάση τα πολύ ενθαρρυντικά-αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, γίνεται φανερό ότι το είδος *Pleurotus ostreatus* των μυκήτων λευκής σήψης, είναι το πιο αποτελεσματικό για την επεξεργασία του αποβλήτου της πράσινης βρώσιμης ελιάς το είδος αυτό επέδρασε σ' όλες τις ιδιότητες του αποβλήτου που εξετάστηκαν, προκαλώντας έντονο αποχρωματισμό, υψηλή μείωση φαινολικών, πλούσια παραγωγή ενζύμων και όλα αυτά συνοδεύτηκαν από εξίσου σημαντική παραγωγή βιομάζας. Έγινε λοιπόν φανερό ότι θα έπρεπε να δοθεί μεγαλύτερη έμφαση και να γίνει πιο αναλυτική ερευνητική δουλειά, όσον αφορά την επίδραση του γένους *Pleurotus*, στην επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς.



Σχήμα 2.7. Πορεία παραγωγής των ενζύμων Laccase, MnIP και MnP από τους βασιδιομύκητες (1) *A. biennis*, (2) *D. Squalens*, (3) *I. Hispidus* και (4) *I. Lacteus*, κατά την διάρκεια 31 ημερών επώασης στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς.



Σχήμα 2.8. Πορεία παραγωγής των ενζύμων Laccase, MnIP και MnP από τους βασιδιομύκητες (1) *L. tigrinus*, (2) *P. stipticus*, (3) *P. ostreatus* και (4) *T. hirsuta*, κατά την διάρκεια 31 ημερών επώασης στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς.

Πίνακας 2.4. Τιμές ενεργότητας των ενζύμων, λακκάσης (Laccase), υπεροξειδάσης του μαγγανίου (MnP) και ανεξάρτητης του μαγγανίου υπεροξειδάσης (MnIP), από την δράση οκτώ γενών βασιδιομυκήτων κατά την διάρκεια 31 ημερών επώασης.

Χρόνος (ημέρες)	Laccase (U/l)			MnP (U/L)			MnIP (U/L)		
	10	19	31	10	19	31	10	19	31
Είδη βασιδιομυκήτων									
<i>Abortiporus biennis</i>	9.1	27.6	57.7	0.0	2.1	7.9	1.3	6.7	13.8
<i>Dichomitlus squalens</i>	3.8	15.6	24.5	0.0	0.2	0.2	0.6	3.0	11.5
<i>Inonotus hispidus</i>	0.0	3.8	7.1	0.0	0.4	0.1	2.5	8.2	11.0
<i>Irpex lacteus</i>	0.4	1.9	8.3	0.0	0.6	0.3	1.0	3.1	6.0
<i>Lentinus tigrinus</i>	0.2	2.1	17.0	0.0	0.0	0.1	0.1	2.1	6.1
<i>Panellus stipticus</i>	4.2	15.4	29.7	0.1	0.2	0.1	0.8	4.3	12.5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	9.1	36.6	67.3	1.8	14.5	19.1	0.9	8.6	16.0
<i>Trametes hirsuta</i>	0.3 ¹	2.8	6.2	0.0	0.2	0.4	0.9	3.4	10.0

Εστιάζοντας λοιπόν τη συνέχεια της έρευνας μας, σε αυτό το γένος μυκήτων λευκής σήψης, χρησιμοποιήθηκαν 45 στελέχη διαφορετικών ειδών, από την συλλογή του Ινστιτούτου Ελαίας και οπωροκηπευτικών Καλαμάτας (Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.). Τα στελέχη αυτά επελέγησαν, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν διάφορες κατηγορίες μυκήτων, όσον αφορά την γεωγραφική τους προέλευση και τα συμβατικά – φυσικά τους υποστρώματα (πίνακας 2.5). Από τα 45 αυτά στελέχη, 18 ανήκαν στο είδος *Pleurotus ostreatus*, 12 στελέχη στο είδος *Pleurotus pulmonarius* και 15 στελέχη στο είδος *Pleurotus eryngii*.

Γένος	Είδος	Στέλεχος	Υπόστρωμα	Γεωγραφική προέλευση
<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	LGAM P60	<i>Populus sp.</i>	Ελλάδα, Φθιώτιδα
		LGAM P59	<i>Populus sp.</i>	Ελλάδα, Ορεστιάδα
		LGAM P15	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P67	<i>Abies sp.</i>	Ελλάδα, Πάρνηθα
		LGAM P57	<i>Castanea sativa</i>	Ελλάδα, Τρίπολη
		LGAM P70	<i>Abies sp.</i>	Ελλάδα, Πάρνηθα
		LGAM P69	<i>Salix sp.</i>	Ελλάδα, Ορ. Χελμός
		LGAM P61	<i>Populus sp.</i>	Ελλάδα, Ορεστιάδα
		LGAM P72	<i>Abies sp.</i>	Ελλάδα, Πάρνηθα
		LGMACC 22	<i>Fagus sylvatica</i>	Γαλλία
		LGMACC 24	<i>Populus nigra</i>	Γαλλία
		LGMACC 85100 I	<i>Quercus sp.</i>	πρώην-Τσεχοσλοβακία
		LGMACC 850402	<i>Salix sp.</i>	Ουγγαρία
		CBS 29147		Γαλλία
		CBS 37551		Ιταλία
		CBS 12513		Ολλανδία
		ATCC 34675		Γερμανία
	SIEF 0508		Κίνα, Nanhui	
	<i>pulmonarius</i>	LGAM P12	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P10	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P1	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P46	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P26	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P6	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P13	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
		LGAM P41	<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ορ. Οξυά
LGAM P47		<i>Fagus sylvatica</i>	Ελλάδα, Ροδόπη	
LGMACC 850403			Γαλλία	
CBS 13285			ΗΠΑ	
A TCC 36050			πρώην-Τσεχοσλοβακία	

eryngii	LGAM PI09	<i>Ferula sp.</i>	Ελλάδα, Αγ. Ευστράτιος
	LGAM P66	<i>Ferula sp.</i>	Ελλάδα, Έβρος
	LGAM PIOI	<i>Eryngium sp.</i>	Ελλάδα, Άνδρος
	LGAM P63	<i>Eryngium sp.</i>	Ελλάδα, Κρήτη
	LGMACC 850404	<i>Eryngium sp.</i>	Ουγγαρία
	CBS 10082		πρώην-Τσεχοσλοβακία
	ATCC 36047	<i>Agρός</i>	πρώην- Τσεχοσλοβακία
	UPA 8	<i>Cachrys ferulacea</i>	Ιταλία
	UPA6	<i>Cachrys ferulacea</i>	Ιταλία
	UPA31		Ιταλία
	UPA 12	<i>Eryneium campestre</i>	Ιταλία
	UPA5	<i>Thapsia garganica</i>	Ιταλία
	UPA 9	<i>Cachrys ferulacea</i>	Ιταλία
		UPA 23	<i>Cachrys ferulacea</i>
	UPA 28	<i>Cachrys ferulacea</i>	Ιταλία

Οι προαναφερθείσες καλλιέργειες διατηρούνται στη Συλλογή Καθαρών Καλλιεργειών Μικροοργανισμών του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)

2.3.5 Αποτελέσματα πρώτου στάδιου συγκριτικής αξιολόγησης

Ο νέος ρυθμός γραμμικής αύξησης που προέκυπτε, είναι ο αντιπροσωπευτικός για την ανάπτυξη των στελεχών των μυκήτων στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς και όχι αυτός του πρώτου εμβολιασμού, δηλ. από το υλικό CYM στο απόβλητο. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι κατά τον δεύτερο εμβολιασμό, τα περισσότερα των στελεχών αναπτύχθηκαν παρουσιάζοντας μια φάση υστέρησης (lag phase), ενώ ορισμένα δεν αναπτύχθηκαν καθόλου (κυρίως από το είδος *Pleurotus eryngii*).

Συνεχίζοντας την επώαση των στελεχών αυτών, έως ότου γίνει πλήρης αποικισμός του υποστρώματος, παρατηρείται έντονος αποχρωματισμός του αποβλήτου, από τα περισσότερα στελέχη, προσδίδοντας σε αυτό ένα κιτρινωπό χρώμα αντί του αρχικού έντονου καστανού (σχεδόν μαύρο). Τα στελέχη του είδους *Pleurotus ostreatus* αναπτύχθηκαν ταχύτερα και αποχρωμάτισαν πλήρως το υπόστρωμα. Ακολούθησαν τα

στελέχη του είδους *Pleurotus pulmonarius* με μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης, αποχρωματίζοντας ικανοποιητικά το υπόστρωμα και τέλος τα στελέχη των *Pleurotus eryngii*, από τα οποία ορισμένα δεν αναπτύχθηκαν, ενώ αυτά που κατάφεραν να αναπτυχθούν με αργούς ρυθμούς προκάλεσαν ελάχιστο αποχρωματισμό. Στον πίνακα 2.6, παρουσιάζονται τα 16 στελέχη τα οποία εμφάνισαν τον μεγαλύτερο ρυθμό γαμμητικής αύξησης, τον πιο έντονο αποχρωματισμό και τη μεγαλύτερη πυκνότητα υφών και επελέγησαν από τα υπόλοιπα, προκειμένου να πραγματοποιηθούν με αυτά και υγρές καλλιέργειες του αποβλήτου (2^ο στάδιο)

Πίνακας 2.6. Ρυθμός μυκηλιακής αύξησης, αποχρωματισμός αποβλήτου και πυκνότητα υφών, των 16 επιλεγμένων στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*, από την δράση τους σε στερεοποιημένο απόβλητο βρώσιμων ελιών.

Γένος	Είδος	Στέλεχος	Ρυθμός μυκηλιακής αύξησης (cm/h)	Αποχρωματισμός	Πυκνότητα υφών
<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	LGAM P57	0.182	Μέτριος	Μεγάλη
		LGAM P59	0.199	Μέτριος	Μικρή
		LGAM P61	0.174	Ικανοποιητικός	Μεσαία
		LGAM P69	0.203	Ικανοποιητικός	Μεγάλη
		LGAM P72	0.182	Ικανοποιητικός	Μεγάλη
		A TCC 34675	0.180	Ικανοποιητικός	Μεγάλη
	<i>pulmonarius</i>	LGAM P10	0.146	Ικανοποιητικός	Μεσαία
		LGAM P12	0.130	Ικανοποιητικός	Μεσαία
		LGAM P41	0.143	Ικανοποιητικός	Μεσαία
		LGAM P46	0.133	Μικρός	Μικρή
		CBS 13285	0.116	Ικανοποιητικός	Μεγάλη
	<i>eryngii</i>	LGAM P101	0.089	Μικρός	Μεσαία
		LGAM P109	0.089	Μέτριος	Μεσαία
		LGAM P63	0.084	Μικρός	Μικρή
		UPA 12	0.106	Μικρός	Μεσαία
		ATCC 36047	0.019	Μέτριος	Μεγάλη

2.3.5.1 Αποτελέσματα δευτέρου σταδίου αξιολόγησης

Τα αποτελέσματα που έδωσαν οι υγρές καλλιέργειες των μυκήτων στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, αλλά και ο αποχρωματισμός που προκάλεσαν στο τέλος του πειράματος, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.

Όπως στις στερεές, έτσι και στις υγρές καλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη των ειδών *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* αναπτύχθηκαν πολύ πιο γρήγορα από τα στελέχη του είδους *P. eryngii*. Τα στελέχη του είδους *P. ostreatus*, ήταν αυτά που συνδύαζαν το μεγαλύτερο ρυθμό γραμμικής αύξησης, την υψηλότερη αποδόμηση φαινολικών και τον υψηλότερο αποχρωματισμό, παρουσιάζοντας και την μικρότερη

διαφοροποίηση μεταξύ τους (Πίνακας 2.8). Ακολούθησαν τα στελέχη του είδους *Pleurotus pulmonarius* με αρκετά υψηλό ποσοστό από δόμησης φαινολικών και αποχρωματισμού, ενώ στην τελευταία θέση από πλευρά αποτελεσματικότητας έρχονται τα στελέχη του είδους *P. eryngii*, τα οποία εμφάνισαν χαμηλό ρυθμό γραμμικής αύξησης, μικρότερη αποδόμηση φαινολικών σε σχέση με τα δύο προηγούμενα είδη, ενώ δεν προκάλεσαν σημαντικό αποχρωματισμό στο απόβλητο.

Έγινε λοιπόν φανερό ότι το είδος *Pleurotus ostreatus*, είναι το πιο αποδοτικό για την επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς και επιλέχθηκε για περαιτέρω έρευνα. Για την συνέχιση των δικών μας εργασιών, επιλέχθηκε το πιο αποδοτικό στέλεχος από αυτό το είδος, που ήταν το *Pleurotus ostreatus* LGAN P69.

Πίνακας 2.7. Τιμές συγκέντρωσης φαινολικών και αποχρωματισμού του αποβλήτου, από την δράση των 16 επιλεγμένων στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*

Γένος	Είδος	Στέλεχος	Συγκέντρωση φαινολικών (mg ml ⁻¹)								Απορρόφηση (525 nm)	
			15 ημέρες		21 ημέρες		26 ημέρες		33 ημέρες		33 ημέρες	
			M	K	M	K	M	K	M	K	M	K
<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	LGAM P57	0.787	0.0408	0.787	0.299	0.770	0.202	0.762	0.202	0.610	0.443
		LGAM P59	0.787	0.512	0.787	0.371	0.770	0.255	0.762	0.256	0.610	0.444
		LGAM P6 I	0.787	0.440	0.787	0.321	0.770	0.239	0.762	0.240	0.610	0.406
		LGAM P69	0.787	0.285	0.787	0.223	0.770	0.194	0.762	0.195	0.610	0.382
		LGAM P72	0.787	0.371	0.787	0.303	0.770	0.198	0.762	0.198	0.610	0.390
		A TCC 34675	0.787	0.386	0.787	0.315	0.770	0.203	0.762	0.202	0.610	0.399
	<i>pulmonarius</i>	LGAM P10	0.787	0.444	0.787	0.292	0.770	0.213	0.762	0.212	0.610	0.427
		LGAM P12	0.787	0.418	0.787	0.332	0.770	0.255	0.762	0.256	0.610	0.432
		LGAM P41	0.787	0.379	0.787	0.285	0.770	0.235	0.762	0.234	0.610	0.450
		LGAM P46	0.787	0.624	0.787	0.586	0.770	0.460	0.762	0.462	0.610	0.420
		CBS 13285	0.787	0.285	0.787	0.223	0.770	0.179	0.762	0.180	0.610	0.400
	<i>eryngii</i>	LGAM P101	0.787	0.603	0.787	0.516	0.770	0.397	0.762	0.397	0.610	0.497
		LGAM P109	0.787	0.642	0.787	0.559	0.770	0.400	0.762	0.411	0.610	0.460
		LGAM P63	0.787	0.783	0.787	0.776	0.770	0.692	0.762	0.693	0.610	0.519
		UPA 12	0.787	0.532	0.787	0.440	0.770	0.332	0.762	0.332	0.610	0.437
		ATCC 36047	0.787	0.559	0.787	0.436	0.770	0.260	0.762	0.259	0.610	0.427

(M): Μάρτυρας (control) – φιάλες χωρίς μύκητα, (K): Καλλιέργεια – φιάλες εμβολιασμένες με μύκητα.

Πίνακας 2.8. Μέσος όρος ρυθμού γραμμικής αύξησης, αποδόμησης φαινολικών και αποχρωματισμού, από τη δράση των 16 επιλεγμένων στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*.

Γένος	Είδος	Ρυθμός γραμμικής αύξησης (cm/h)		Αποδόμηση φαινολικών (%)		Αποχρωματισμός (%)	
		Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα	Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα	Μέσος Όρος	Τυπικό Σφάλμα
	<i>ostreatus</i>	0.181	$\pm 4.2857 \times 10^{-3}$	71.685	± 1.355	32.683	± 1.789
<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	0.134	$\pm 5.2487 \times 10^{-3}$	64.718	± 6.545	30.200	± 1.336
	<i>eryngii</i>	0.075	$\pm 0.0189 \times 10^{-3}$	45.076	± 9.682	24.980	± 3.382

2.4 Επίδραση του μύκητα *Pleurotus ostreatus* LGAM P69 στην επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς

2.4.1 Γενικά

Καταλήγοντας στην επιλογή του πιο αποτελεσματικού μύκητα, από ταυτούς που υπήρχαν στην βιβλιογραφία, παραθέτουμε στην συνέχεια δυο αναλυτικά πειράματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα υποστάματος. Για το πρώτο πείραμα, το απόβλητο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά, ενώ για το δεύτερο έγινε διήθηση (filter-sterilization) του αποβλήτου, με ειδικό φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Nalgene) με διάμετρο πόρων 0.2µm.

Ο σκοπός αυτού του πειράματος, ήταν να διαπιστωθούν οι αλλαγές που επιφέρει η δράση του μύκητα, σε ένα υλικό απόβλητο (filter-sterilization), το οποίο προσεγγίζει σημαντικά τις ιδιότητες του φυσικού αποβλήτου, χωρίς να μεσολαβεί η διαδικασία της αποστείρωσης, η οποία είναι μια θερμική διεργασία, που μπορεί να μεταβάλει σε σημαντικό βαθμό τα αρχικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου, λόγω φυσικοχημικών μεταβολών.

Επειδή, όλες οι έρευνες που είχαν γίνει, με τους μύκητες λευκής σήψης, στα απόβλητα των ελαιουργείων περιελάμβαναν τη διεργασία της αποστείρωσης, θεωρήσαμε σημαντικό να ελέγξουμε την δράση των μικροοργανισμών αυτών, σε διηθημένο απόβλητο βρώσιμης ελιάς, εκτιμώντας ότι αυτή η μέθοδος θα έδινε μία πραγματική εκτίμηση για την αποτελεσματικότητά τους στην επεξεργασία των αποβλήτων αυτών.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών έγιναν μετρήσεις σε ένα πλήθος ιδιοτήτων του αποβλήτου, όπως: pH, ηλεκτρική αγωγιμότητα, συγκέντρωση φαινολικών, αποχρωματισμός, χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ), παραγωγή ενζύμων, δείκτη βλαστικότητας (μέτρο φυτοτοξικής δράσης) καθώς και μέτρηση νωπής και ξηρής παραγόμενης βιομάζας. από τα αποτελέσματα των δυο αυτών πειραμάτων, καθώς και από τη μεταξύ τους σύγκριση, προκύπτουν χρήσιμα συμπεράσματα για τις δυνατότητες αυτών των μικροοργανισμών, καθώς προς ποια κατεύθυνση μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια της έρευνας.

2.4.2 Αποτελέσματα

Τα αρχικά χαρακτηριστικά των δύο υποστρωμάτων πριν τον εμβολιασμό τους με τον μικροοργανισμό, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9.

Πίνακας 2.9. Χαρακτηριστικά θερμικά αποστειρωμένου και αποστειρωμένου μέσω διήθησης αποβλήτου, πριν από την διαδικασία εμβολιασμού

	pH	ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm ²)	συγκέντρωση φαινολικών (mg/ml)	δΧΑΟ (mgO ₂ /l)	δείκτης βλαστικότητα ς (%)	απορρόφηση (525 nm)
Θερμικά αποστειρωμένο απόβλητο	6.26	6.22	1.112	10400	0	0.588
Αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο	6.32	6.07	0.686	10941	29.36	0.361

Από τον παραπάνω πίνακα γίνεται φανερό, ότι η αποστείρωση έχει σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά του αποβλήτου. Πιο συγκεκριμένα, δεν δημιουργεί σημαντικές αλλαγές στο pH, την αγωγιμότητα και το ΧΑΟ, αλλά επηρεάζει σημαντικά την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών, αποδίδοντας σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση, σε σχέση με αυτήν του διηθημένου αποβλήτου. Ταυτόχρονα αυξάνεται η φυτοτοξικότητα του- αποβλήτου στο 100% (δείκτης βλαστικότητας 0%), ενώ δημιουργεί ένα απόβλητο που είναι πολύ πιο καστανόχρωμο (σχεδόν μαύρο) σε σχέση με το διηθημένο.

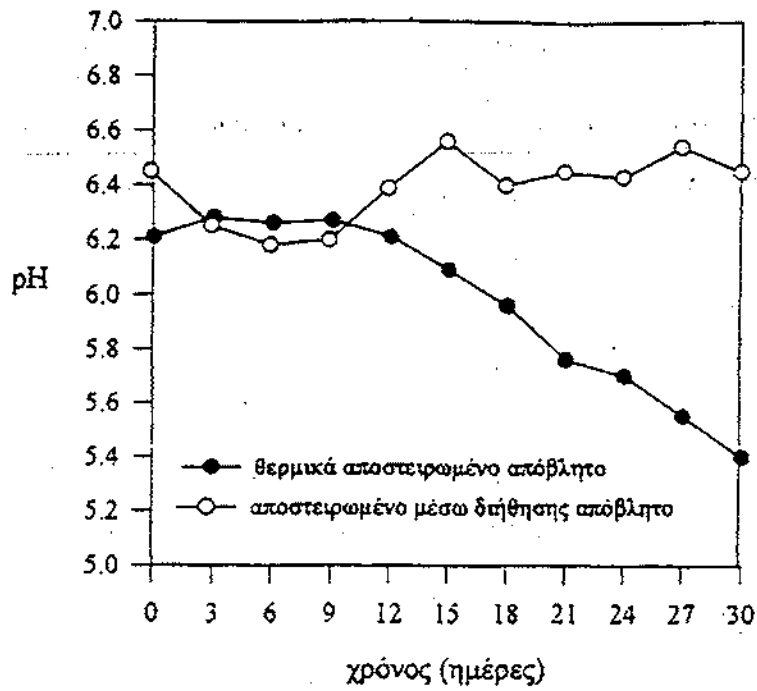
Η αύξηση των φαινολικών με την αποστείρωση, οφείλεται πιθανόν στον μερικό αποπολυμερισμό των ενώσεων αυτών, που έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότερες οξειδωμένες ρίζες (OH[•]) που αντιδρούν με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο (Folin-Ciocalteu) της μεθόδου προσδιορισμού των φαινολικών (κεφ.2, § 2.2.14) έχοντας ως αποτέλεσμα να μετράται μεγαλύτερη απορρόφηση, αποδίδοντας έτσι υψηλότερη τιμή για την συγκέντρωση των φαινολικών. Φαίνεται ακόμα, ότι οι ενδιάμεσες αυτές

οξειδωμένες φαινολικές δομές που σχηματίζονται, είναι περισσότερο φυτοτοξικές και ευθύνονται για το μαύρο χρώμα του αποβλήτου.

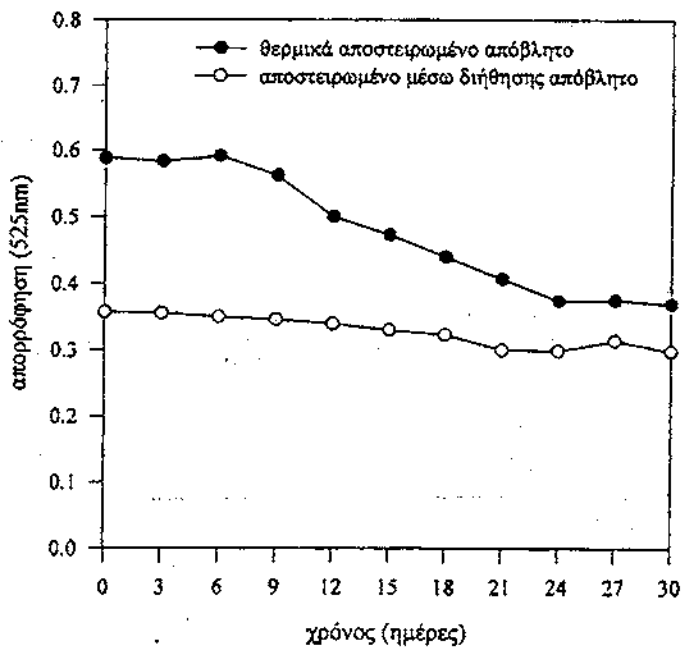
Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την επίδραση της αποστείρωσης, στις ανωτέρω ιδιότητες του αποβλήτου, είναι πολύ σημαντικά εάν σκεφτεί κανείς, ότι πλήθος ερευνητών, έχει συσχετίσει την φυτοτοξικότητα των αποβλήτων των ελαιουργείων με την παρουσία φαινολικών ενώσεων και σχεδόν όλες οι εργασίες που έχουν γίνει χρησιμοποιούν αποστειρωμένο απόβλητο. Η διεργασία λοιπόν της αποστείρωσης απαιτεί επιφυλάξεις, μια και οι πρώτες ενδείξεις οδηγούν στο ότι έχει αρνητική επίδραση και δημιουργεί ένα απόβλητο που είναι περισσότερο τοξικό από το αντίστοιχο αρχικό.

Κατά την διάρκεια επώασης, ο μύκητας επέφερε μια μείωση του pH κατά 0.8 (από 6.21 σε 5.41), στο αποστειρωμένο υλικό, ενώ δεν επηρέασε σημαντικά το pH του διηθημένου (Σχήμα 3.9). Η αγωγιμότητα του αποβλήτου ελάχιστα επηρεάστηκε από την δράση του μύκητα, καθώς παρουσίασε μια πολύ μικρή άνοδο και στους δύο τύπους υποστρωμάτων (Πίνακας 2.10).

Ο μύκητας είχε σημαντική επίδραση στη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών, η οποία ξεκίνησε από τις πρώτες κιόλας ημέρες επώασης (Σχήμα 2.10). Τόσο στο θερμικά αποστειρωμένο όσο και στο αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο, η συγκέντρωση των φαινολικών μετά το τέλος του πειράματος ήταν σχεδόν η ίδια (0.27mg/ml και 0.22mg/ml, αντίστοιχα). Ωστόσο το ποσοστό αποδόμησης για το θερμικά αποστειρωμένο απόβλητο είναι μεγαλύτερο (76.0%) έναντι του αποστειρωμένο μέσω διήθησης (67.9%), κάτι όμως που οφείλεται στην πολύ μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση φαινολικών σε αυτό.

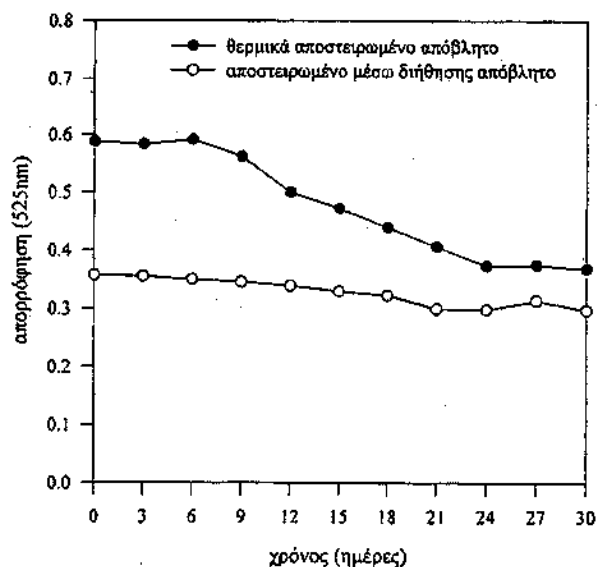


Σχήμα 2.9. Πορεία εξέλιξης Ph θερμικά αποστειρωμένου και αποστειρωμένου μέσω διήθησης απόβλητου κατά την διάρκεια 30 ημερών επώασης με τον μύκητα *Pleurotus ostreatus* (LGAM P69)



Σχήμα 2.10 Πορεία αποδόμησης ολικών φαινολικών θερμικά αποστειρωμένου και αποστειρωμένου μέσω διήθησης απόβλητου κατά την διάρκεια 30 ημερών επώασης με τον μύκητα *Pleurotus ostreatus* (LGAM P69)

Επίσης το θερμικά αποστειρωμένο υπόστρωμα, αποχρωματίστηκε κατά ένα ποσοστό 37,0% ενώ το αποστειρωμένο μέσω διήθησης κατά 16,5%. Η πορεία του αποχρωματισμού, δίνεται στο Σχήμα 2.11.



Σχήμα 2.11. Πορεία αποχρωματισμού θερμικά αποστειρωμένου και αποστειρωμένου μέσω διήθησης αποβλήτου κατά την διάρκεια 30 ημερών επώασης με τον μύκητα *P. ostreatus* (LGAM P69).

Ο μύκητας *P. ostreatus* δεν προκάλεσε σημαντική μείωση του οργανικού ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου και στα δυο υποστρώματα (Πίνακας 2.10), καθώς το ΧΑΟ του θερμικά αποστειρωμένου υλικού μειώθηκε κατά 11.22% ενώ του αποστειρωμένου μέσω διήθησης κατά 16.7%.

Σε αντίθεση με όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, για τη μείωση της φυτοτοξικής δράσης των αποβλήτων των ελαιουργείων, από την επεξεργασία τους με χρήση μυκήτων λευκής σήψης, λόγω απομάκρυνσης των πολυφαινολών, δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο και για το απόβλητο της βρώσιμης ελιάς. Το θερμικά αποστειρωμένο υλικό παρέμεινε τοξικό και σε όλη την διάρκεια της επώασης, ενώ το αποστειρωμένο μέσω διήθησης επέδειξε αμελητέα μείωση της φυτοτοξικότητας (Πίνακας 2.10).

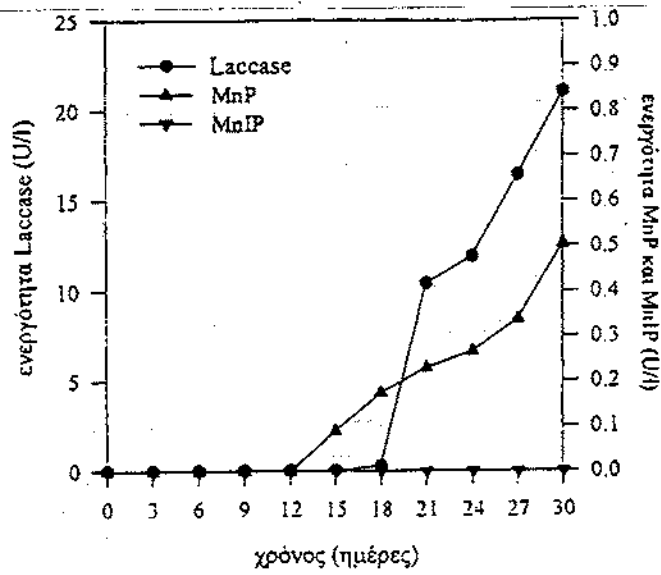
Πίνακας 2.10. Χαρακτηριστικά θερμικά αποστειρωμένου και ασποστειρωμένου μέσω διήθησης αποβλήτου πριν (t=0) και μετά (t=30) ημέρες επώασης με τον μύκητα *Pleurotus ostreatus* (Igam p69).

Επεξεργασία αποβλήτου	pH	Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (mS/cm ²)	Συγκέντρωση Φαινολικών (mg/ml)	Απορρόφηση (525 nm)	Διαλυτό ΧΑΟ (MGo2/l)	Ξηρό βάρος Βιομάζας (mg/ml)	Δείκτης Βλαστικότητας (%)	Ενεργότητα Laccase (U/l)	Ενεργότητα MnP (U/l)	Ενεργότητα MnIP (U/l)
Αποστείρωση										
Μάρτυρας t(0)	6.26	6.22	1.112	0.588	10400	0.00	0			
Μάρτυρας t(30)	6.28	6.22	1.112	0.588	10471	0.04	0			
Καλλιέργεια t(0)	6.21	7.05	1.069	0.586	10342	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Καλλιέργεια t(30)	5.40	7.13	0.267	0.369	9182	0.15	0	21.00	0.51	0.00
Μάρτυρας t(0)	6.32	6.07	0.686	0.361	10941	0.00	29.36			
Μάρτυρας t(30)	6.35	6.07	0.686	0.361	10841	0.04	30.14			
Καλλιέργεια t(0)	6.45	6.76	0.686	0.357	10741	0.00	32.16	0.00	0.00	0.00
Καλλιέργεια t(30)	6.45	6.86	0.220	0.298	8939	0.44	35.91	202.22	9.28	6.01

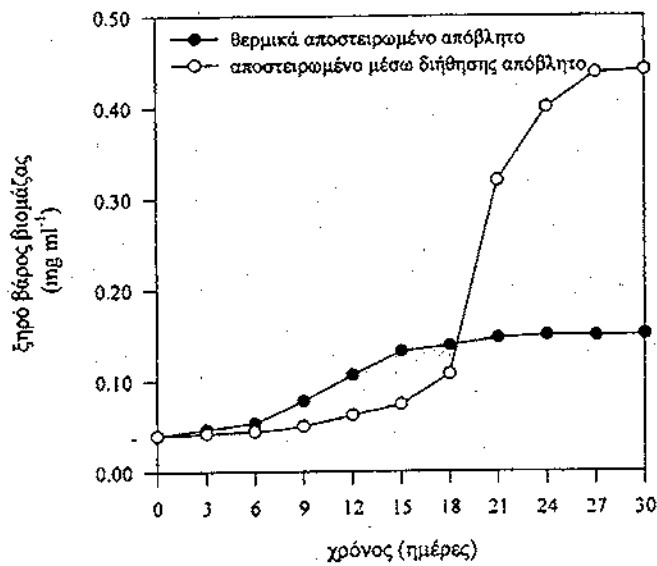
Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υποστρώματων, παρουσιάστηκαν και στην παραγωγή των ενζύμων, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς τόσο το είδος όσο και η σειρά εμφάνισης και η ενεργότητα των ενζύμων, είναι παράγοντες που επηρεάζονται άμεσα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος. Στο αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο, ο μύκητας επέδειξε πολύ μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμων απ' ότι στο θερμικά αποστειρωμένο (Σχήματα 2.12 και 2.13). Περίπου, δέκα φορές υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης και είκοσι φορές υψηλότερη ενεργότητα MnP μετρήθηκαν στο διηθημένο απόβλητο, απ' ότι στο αποστειρωμένο στο τέλος του πειράματος (Πίνακας 2.10). Επίσης είναι χαρακτηριστικό ότι στο διηθημένο απόβλητο ανιχνεύθηκε και το ένζυμο MnIP, μετά την 18η ημέρα επώασης και με σχετικά χαμηλή ενεργότητα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου και καθ' όλη την διάρκεια επώασης στο θερμικά αποστειρωμένο απόβλητο (Σχήματα 2.12 και 2.13).

Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε η παραγωγή των ενζύμων υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και βερατρύλ-αλκοόλοξειδάση (VAOx) σε κανένα από τα δύο υποστρώματα, κάτι που επαληθεύεται και από την βιβλιογραφία για το γένος *Pleurotus* (Caramelo *et al.*, 1999, Valmaseda *et al.*, 1991).

Ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και στα δύο υποστρώματα. Το θερμικά αποστειρωμένο όμως υλικό οδήγησε σε χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα και μετά το τέλος της επώασης, μετρήθηκε τριπλάσια παραγωγή βιομάζας στο αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο (0.44mg ml^{-1}), απ' ότι στο θερμικά αποστειρωμένο (0.15mg ml^{-1}). Η πορεία ανάπτυξης του μύκητα κατά την επώασή του στα δύο υποστρώματα, παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.14.



Σχήμα 2.12. Πορεία παραγωγής των ενζύμων Laccase MnP και MnIP από τη δράση του μύκητα *P. ostreatus* (LGAM P69) σε αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο βρώσιμης ελιάς.



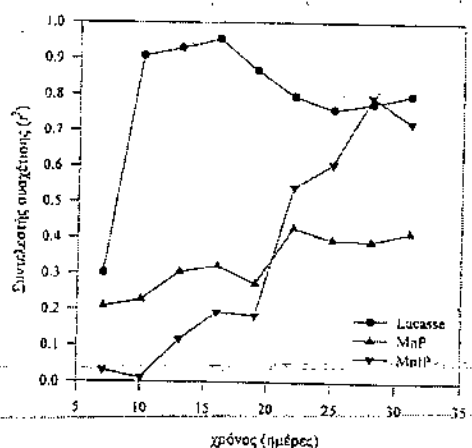
Σχήμα 2.14 Πορεία παραγωγής βιομάζας του μύκητα *P. ostreatus* (LGAM P69) σε θερμικά αποστειρωμένο και αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο βρώσιμων ελιών κατά την διάρκεια 30 ημερών επώασης.

2.4.3. Συζήτηση και ανάλυση αποτελεσμάτων

2.4.3.1 Αρχική συγκριτική αξιολόγηση

Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, γίνεται φανερό ότι το απόβλητο των βρώσιμων ελιών αποτελεί ένα υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη όλων των ειδών των βασιδομηκίων που εξετάστηκαν. Η σχετικά χαμηλή συγκέντρωση του αποβλήτου σε θρεπτικά συστατικά και κυρίως σε άζωτο, είναι αναμενόμενο να παράγει την ενεργοποίηση των ενζυμικών μηχανισμών των μικροοργανισμών αυτών.

Μετρήσεις της ενεργότητας των ενζύμων που πραγματοποιήθηκαν κατά την πρώτη συγκριτική αξιολόγηση, μεταξύ των οκτώ ειδών, έδειξαν πολύ καλή συσχέτιση με την μείωση των ολικών φαινολικών στο τέλος της περιόδου επώασης. Υψηλή παραγωγή λακκάσης (laccase) στα πρώτα στάδια επώασης, παρατηρήθηκε μόνο στα είδη που επέφεραν σημαντική μείωση φαινολικών (*P. ostreatus*, *A. biennis*, *P. stipticus* και *D. squalens*). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση απλής παλινδρόμησης, η οποία έδειξε ότι -- υπάρχει πολύ μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της παραγόμενης λακκάσης και της ολικής αποδόμησης των φαινολικών, κυρίως κατά την δεύτερη και την τρίτη εβδομάδα επώασης (Σχήμα 2.15). Επομένως, η «πρώιμη» παραγωγή λακκάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα πρώτο κριτήριο για την αξιολόγηση και προεπιλογή των μυκήτων για αποτελεσματική αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών.



Σχήμα 2.15. Συντελεστής συσχέτισης (r^2) μεταξύ της παραγωγής των ενζύμων Laccase, MnP και MnIP και της τελικής αποδόμησης των φαινολικών.

Αντίθετα, η παραγωγή MnIP συσχετίζεται σημαντικά με την αποδόμηση των ολικών φαινολικών, αλλά η συσχέτιση είναι ασθενέστερη και εμφανίζεται μόνο μετά την τρίτη εβδομάδα επώασης. Το τρίτο ένζυμο που ανιχνεύθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις (MnP), δεν παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με την αποδόμηση των ολικών φαινολικών καθ' όλη την διάρκεια επώασης.

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από βηματική (stepwise and backward) ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, όπου τα ένζυμα MnIP και MnP απορρίπτονταν, αφήνοντας την παραγωγή λακκάσης σαν την μοναδική σημαντική "ανεξάρτητη" μεταβλητή. Παρατηρήθηκε και μία μικρή συμβολή της MnP (ως δεύτερη "ανεξάρτητη" μεταβλητή), κατά την δεύτερη και τρίτη εβδομάδα, υποδηλώνοντας ίσως μία παρεμποδιστική δράση της λακκάσης. Πιθανότερα όμως αυτή η αρνητική επίδραση να παρουσιάζεται συμπτωματικά, λόγω της υπερπαραγωγής λακκάσης, κυρίως από τα στελέχη *A. biennis* και *P. ostreatus*. Σε οποιαδήποτε περίπτωση περισσότερα δεδομένα απαιτούνται για να υποστηρίξουν κάποια από τις δύο αυτές υποθέσεις.

Η παραγωγή της λακκάσης προς το τέλος της επώασης, παρουσίασε μικρότερη συσχέτιση με την μείωση των φαινολικών του αποβλήτου. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην υψηλή παραγωγή (υπερπαραγωγή) του ενζύμου από τα πιο αποδοτικά είδη βασιδιομυκήτων, που σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη κατανάλωση του υποστρώματος (φαινόλες), δεν επιτρέπουν πλέον την άμεση συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου με τους ρυθμούς αποδόμησης των φαινολικών που παρατηρούνται στο απόβλητο των βρώσιμων ελιών.

Η παραγωγή λακκάσης και υπεροξειδάσης του μαγγανίου κατά την διάρκεια της περιόδου επώασης, παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με τον αποχρωματισμό του αποβλήτου που επιτυγχάνεται στο τέλος της επώασης ($r^2 = 0.69-0.92$ και $r^2 = 0.85-0.92$, αντίστοιχα). Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε μερική συμφωνία με τα αποτελέσματα των Rodriguez *et al.* (1999), οι οποίοι διαπίστωσαν συσχέτιση της λακκάσης αλλά όχι και της MnP με τον αποχρωματισμό 23 τύπων βιομηχανικών αποβλήτων βαφείων, από την δράση σε αυτά, στελεχών του είδους *Pleurotus ostreatus*.

Η βηματική (stepwise and backward) ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, για τη συσχέτιση της παραγωγής των ενζύμων με τον αποχρωματισμό του αποβλήτου έδειξε ότι κατά την διάρκεια των τριών πρώτων εβδομάδων επώασης, ο αποχρωματισμός συμβάδιζε με την "συνδυασμένη" δράση των ενζύμων laccase και MnP ($R^2 > 0.96$, με την καλύτερη συσχέτιση να εμφανίζεται κατά την 13η ημέρα επώασης: (%) αποχρωματισμού = $1.141x \text{ Laccase} + 7.448x \text{ MnP}$, $R^2 = 0.982$), ενώ δεν φαίνεται να συνεισφέρει στον αποχρωματισμό η MnIP. Αυτή η «συνδυασμένη» δράση των ενζύμων laccase και MnP, στον αποχρωματισμό του αποβλήτου μπορεί να οφείλεται στην ιδιότητα της MnP για παράλληλη οξειδωση και μη φαινολικών δομών, που σχετίζονται με το χρώμα του αποβλήτου. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της δράσης των μυκήτων *D. squalens* και *P. stipticus*, οι οποίοι σημείωσαν σημαντική μείωση των φαινολικών (36.4% και 42.4%, αντίστοιχα), αλλά δεν παρήγαγαν MnP και δεν προκάλεσαν αποχρωματισμό του αποβλήτου.

Επίσης, επιδείχτηκε πολύ μικρή συσχέτιση μεταξύ, της αποδόμησης των παλυφαινολών και του αποχρωματισμού ($R^2 = 0.561$, $P = 0.03$) του αποβλήτου (αναμενόμενο αποτέλεσμα), αφού τα τέσσερα από τα οκτώ είδη που αξιολογήθηκαν αρχικά, ενώ επέδειξαν σημαντική μείωση φαινολικών, δεν προκάλεσαν παράλληλα σημαντικό αποχρωματισμό του αποβλήτου (με εξαίρεση το είδος *P. ostreatus*). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα, ότι το σκούρο χρώμα του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς δεν οφείλεται μόνο στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει, σε αντίθεση με ότι έχει προταθεί για τα απόβλητα των ελαιουργείων (Sayadi and Ellouz, 1992). Το χρώμα του αποβλήτου οφείλεται, κατά το μεγαλύτερο μέρος, σε άλλου τύπου ενώσεις, οι οποίες είτε αποδομούνται μερικώς, κυρίως από την δράση της MnP (όπως έχει παρατηρηθεί στον αποχρωματισμό για τα απόβλητα-χαρτοβιομηχανίας (kraft bleach plant effluent), (Michel *et al.*, 1991), είτε δεν αποδομούνται καθόλου από τους βασιδιομύκητες που εξετάστηκαν. Εν' τούτοις, η απουσία της LiP από όλα τα είδη που εξετάστηκαν κατά την διάρκεια αυτής της έρευνας, είναι πολύ πιθανόν να εξηγεί την σχετικά χαμηλή ικανότητα αποχρωματισμού αυτών των ειδών και αυτή η άποψη ενισχύεται ακόμα περισσότερο, από τα αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών, που αποδεικνύουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ αποχρωματισμού αποβλήτων ελαιουργείων και υψηλής ενεργότητας LiP (Sayadi and Ellouz, 1993).

2.4.3.2 Η δράση του μύκητα (*P. ostreatus* LGAM P69) σε θερμικά αποστειρωμένο και αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο βρώσιμων ελιών

Ο μύκητας *P. ostreatus* LGAM P69, επέδειξε σημαντική αποδόμηση φαινολικών και ικανοποιητικό αποχρωματισμό και στα δύο υποστρώματα, αλλά δεν συνέβαλε στη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου. Αυτό σημαίνει ότι το φαινολικό κλάσμα που διασπάται από τον μύκητα δεν «ευθύνεται» για τις φυτοτοξικές ιδιότητες του αποβλήτου. Εφόσον το ποσοστό των αποδομούμενων φαινολικών είναι ιδιαίτερα υψηλό, αφού ανέρχεται στο 76% για το θερμικά αποστειρωμένο και στο 68% για το αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο, συμπεραίνουμε ότι η φυτοτοξικότητα τόσο του συγκεκριμένου αποβλήτου, όσο και άλλων αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, οφείλεται σε άλλου τύπου ενώσεις που περιέχονται σε αυτά. Μία άλλη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι η παραμένουσα φυτοτοξικότητα του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς να οφείλεται στο μη βιοαποδομήσιμο φαινολικό κλάσμα ή ίσως σε κάποιους άλλους μεταβολίτες που δημιουργούνται από την δράση του μύκητα.

Τα αποτελέσματά αυτά είναι σε συμφωνία και με την έρευνα των Martirani *et al* (1996), οι οποίοι

Επεξεργάστηκαν αραιωμένα απόβλητα ελαιουργείου με φαινολοξειδάσες, όπου και δεν παρατήρησαν μείωση της φυτοτοξικότητας. Παρόμοια αποτελέσματα, με οξείδωση των φαινολικών από το ένζυμο της λακκάσης, το οποίο δεν συνέβαλε στην μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου (Bollag *et al.*, 1988) ή που συνέβαλε στην αύξησή της (Haars and Hutterman, 1980), έχουν επίσης παρατηρηθεί.

Επίσης οι Bollag *et al.* (1988), παρατήρησαν ότι όταν η δράση της λακκάσης συνοδεύεται με κατακρήμνιση, αυτό συνεπάγεται την πλήρη «φυσική» απομάκρυνση των φαινολικών που οδηγεί στην μείωση της τοξικότητας του υλικού, ενώ η απλή αλλαγή των χημικών δομών (π.χ διάσπαση πολυφαινολών σε μικρότερου μοριακού βάρους φαινολικές δομές, όπου και δεν παρατηρείται κάποια κατακρήμνιση), δεν οδηγεί πάντα σε αποτελεσματική αποτοξικοποίηση λουπόν, με την επικράτηση

της λακκάσης (laccase) στα πειράματα του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς και σε συνδυασμό με την απουσία της δημιουργίας κατακρημνίσεων, είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει μερικός αποπολυμερισμός των αρχικών πολυφαινολών σε ενώσεις οι οποίες

είναι εξίσου τοξικές. Εντέλει οι τοξικές αυτές δράσεις του αποβλήτου είναι πιθανόν να οφείλονται και σε άλλου τύπου ενώσεις, όπως, τα μεγάλου μοριακού βάρους λιπαρά οξέα ή και σε συνδυασμένες δράσεις άλλων ενώσεων του αποβλήτου.

Όπως προκύπτει από την πορεία παραγωγής των ενζύμων, κατά την δράση του μύκητα στο αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, τόσο η λακκάσης όσο και ΜhP ανιχνεύθηκαν από τις πρώτες ημέρες επώασης, πραγματοποιώντας μια μεγάλη αύξηση στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας επώασης. Η αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων αυτών συμφωνεί με την αύξηση της βιομάζας του μύκητα, παρ' ότι η αποδόμηση των φαινολικών έχει προηγηθεί κάποιες ημέρες. Η υψηλή ενεργότητα των ενζύμων συνεχίζεται μέχρι και το τέλος της επώασης (παρ' ότι έχει ήδη αποδομηθεί το 100% του αποδομούμενου φαινολικού κλάσματος), που σημαίνει ότι η ανάπτυξη του μύκητα προάγεται και από άλλες ενώσεις που περιέχονται στο απόβλητο. Το ένζυμο της ΜhP ανιχνεύεται με πολύ μικρότερη ενεργότητα και μόνο στο αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο.

Εν γένει, η ενεργότητα των ενζύμων είναι σημαντικά χαμηλότερη στο θερμικά αποστειρωμένο απόβλητο, κάτι που μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία παρεμποδιστικών ενώσεων από την αποστείρωση.

Παρά τη σημαντική μείωση των φαινολικών που προκαλεί η δράση του μύκητα στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, η μείωση του οργανικού φορτίου δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Οι Kerem *et al.* (1992), παρατήρησαν επίσης μικρή μείωση οργανικού υλικού, από την δράση του μύκητα *Plectrotus ostreatus* σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα και σε αντίθεση με τον μύκητα *Phanerocheate chrysosporium*, ο οποίος προκάλεσε σημαντική μείωση του ΧΑΟ κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Sayadi and Ellouz, 1992). Είναι γνωστό ότι ο μύκητας *P. chrysosporium* παράγει το ένζυμο της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP), που είναι ικανό να καταλύει την οξειδωση ενός μεγάλου φάσματος αρωματικών υδρογονανθράκων (Kirk and Farrell, 1987). Αντίθετα η λακκάση οξειδώνει κυρίως φαινολικές ενώσεις, ενώ μπορεί να επιδράσει και σε μη φαινολικές ενώσεις, μόνο υπό την παρουσία άλλων ενώσεων (μεσολαβητών) (Bourdonnais and Paice, 1990, Breen and Singleton, 1999). Είναι λοιπόν

πολύ πιθανόν η χαμηλή απόδοση του *P. ostreatus* στην απομάκρυνση οργανικού υλικού να οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου LiP.

Παραθέτουμε αποτελέσματα για υγρό και ξηρό βάρος βιομάζας, αποχρωματισμός (525 nm), συγκέντρωση φαινολικών και δείκτης βλαστικότητας. Οι τιμές αυτές, που αναφέρονται στον Πίνακα 2.11, εκφράζονται από τον μέσο όρο και των πέντε επαναλήψεων για κάθε υπόστρωμα.

	νοπό βάρος (g/100ml)		ξηρό βάρος (g/100ml)		Απορρόφηση (525nm)		συγκέντρωση φαινολικών (g/l)		(%) δείκτης βλαστι- κότητας
	Μ.Ο	Τ.Π	Μ.Ο	Τ.Π(10 ⁻³)	Μ.Ο	Τ.Π	Μ.Ο	Τ.Π(10 ⁻³)	Μ.Ο
Υπ 1	1.282	0.166	0.278	9.165	0.017	2.89x10 ⁻⁴	0.065	5.1001	75.1
Υπ 2	1.062	0.073	0.210	6.325	0.019	5.48x10 ⁻⁴	0.064	2.8437	63.6
Υπ 3	0.368	0.093	0.028	2.000	0.245	2.40x10 ⁻³	0.360	6.0598	0
Υπ 4	0.316	0.066	0.024	4.000	0.285	1.97x10 ⁻³	0.355	16.376	0

Μ.Ο: Μέσος όρος, Τ.Π: Τυπικό Σφάλμα

2.5. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη του μύκητα φαίνεται να επηρεάζεται σε ένα μικρό βαθμό από την αλατότητα, τόσο κατά την ανάπτυξή του στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, όσο και κατά την ανάπτυξη του στο συμβατικό υλικό CYM.

Η διαφορετική αλατότητα των υποστρωμάτων 3 & 4, δεν εμπόδισε τον μύκητα στο να επιδράσει στα φαινολικά τα οποία μπορεί και αποδομεί. Είναι όμως πιθανό να επηρεάζει τον ρυθμό αποδόμησης, το οποίο όμως θα μπορούσε να διαπιστωθεί μόνο με την λήψη και άλλων ενδιάμεσων μετρήσεων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του μύκητα.

Στα δύο υποστρώματα 3 & 4 του αποβλήτου, η δράση του μύκητα οδήγησε σε

διαφορετικό αποχρωματισμό. Συγκεκριμένα το υπόστρωμα 4 (αλατότητα ίση με αυτή του αρχικού αποβλήτου), εμφανίστηκε πιο σκουρόχρωμο (λιγότερο αποχρωματισμένο) το υπόστρωμα 3 και μετά το τέλος της ανάπτυξης. Κάτι αντίστοιχο, σε μικρότερο όμως βαθμό, παρατηρήθηκε και για τα υποστρώματα 1 & 2 του υλικού CYM.

Ο ρόλος της αλατότητας στην φυτοτοξικότητα του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών δεν έγινε εμφανής, καθώς η αποστείρωση δείχνει να έχει σημαντικότερη επίδραση (κάτι που αποδείχτηκε και από προηγούμενα πειράματα), δημιουργώντας ένα ιδιαίτερα φυτοτοξικό απόβλητο (δείκτης βλαστικότητας: 0%).

Στο υλικό CYM, όπου η αποστείρωση δεν παρουσίασε τόσο αρνητική επίδραση (όπως στο απόβλητο), παρατηρήθηκε ότι η αλατότητα συμβάλλει κατά ένα μικρό μέρος στην φυτοτοξικότητα του υλικού, καθώς το υπόστρωμα 2 (αλατότητα ίση με αυτή του αρχικού αποβλήτου), επέδειξε δείκτη βλαστικότητας μειωμένο κατά 11.5%, σε σχέση με το υπόστρωμα 1 (μισή συγκέντρωση άλατος).

2.6 Επίδραση της αλατότητας του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών στην φυτοτοξικότητα

2.6.1 Γενικά

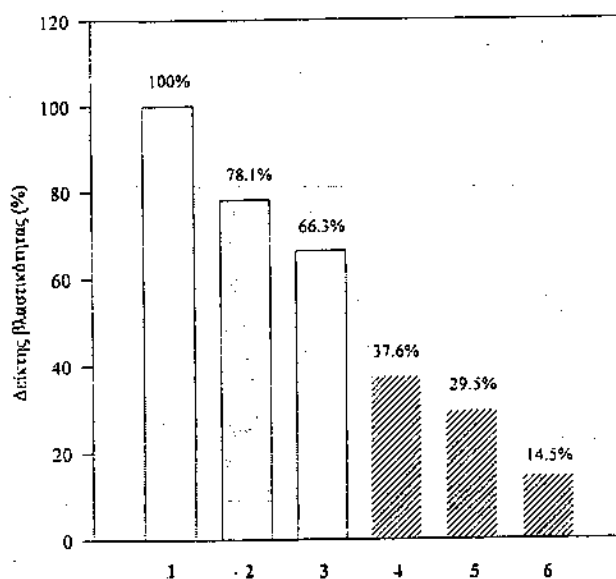
Επειδή τα πιο πάνω αποτελέσματα βασίστηκαν σε υλικά που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί (ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη του μύκητα), κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της αλατότητας του αρχικού (πραγματικού) αποβλήτου στην φυτοτοξικότητα. Πρέπει λοιπόν να εκτιμηθεί κατά πόσο είναι συνάρτηση και άλλων παραγόντων (ενώσεων) που περιέχονται στο απόβλητο.

2.6.2. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Από τα πειράματα φυτοτοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν, για τα έξι υποστρώματα που περιγράφηκαν πιο πάνω, πήραμε σημαντικές ενδείξεις για το εάν και κατά πόσο η αλατότητα του αποβλήτου αποτελεί παράγοντα φυτοτοξικότητας.

Πιο συγκεκριμένα, μια μείωση του δείκτη βλαστικότητας κατά 33,7% παρουσιάστηκε στο υπόστρωμα (3) (νερό με αλατότητα ίση με του αρχικού αποβλήτου) και σε σχέση με

τον μάρτυρα (1) (νερό).



Σχήμα 2.16: Ολικός δείκτης βλαστικότητας των έξι (6) υποστρωμάτων διαφορετικής αλατότητας.

Στο απόβλητο όμως των βρώσιμων ελιών η επίδραση δεν ήταν τόσο μεγάλη και όπως φαίνεται από την σύγκριση των υποστρωμάτων 4, 5 και 6. Πιο συγκεκριμένα η αραιώση του αποβλήτου στο 50% (4), οδήγησε σε μία αύξηση του δείκτη βλαστικότητας κατά $(37.6-14.5) \% = 23.1 \%$, σε σχέση με το κανονικό απόβλητο (6). Στην αύξηση αυτή του δείκτη βλαστικότητας, η μείωση της αλατότητας στο μισό, συνέβαλε κατά ένα μικρό ποσοστό (8.1%), ενώ το υπόλοιπο $(23.1-8.1)\% = 15\%$, οφείλεται στην μείωση της συγκέντρωσης (κατά το ήμισυ) άλλων ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο.

Επίσης το αρχικό απόβλητο των βρώσιμων ελιών (6) είναι κατά πολύ πιο φυτοτοξικό από το υπόστρωμα του νερού (3) με την ίδια αρχική αλατότητα. Η διάφορά στους δείκτες βλαστικότητας των δύο αυτών υποστρωμάτων είναι $(66.3-14.5)\% = 51.8\%$.

Εφόσον έχουν την ίδια αγωγιμότητα, ενισχύεται η άποψη ότι το ποσοστό αυτό φυτοτοξικότητας οφείλεται σε άλλες ενώσεις που περιέχονται στο απόβλητο. Επίσης η μικρή επίδραση της αλατότητας αποδείχτηκε και στα υποστρώματα του νερού. Πιο συγκεκριμένα το υπόστρωμα (2) έχοντας την μισή αλατότητα από το υπόστρωμα (3),

παρουσίασε δείκτη βλαστικότητας, αυξημένο μόνο κατά $(78.166.3)\% = 11.8\%$.

Σαν τελικό λοιπόν συμπέρασμα, προκύπτει ότι η αλατότητα επιδρά κατά ένα μέρος στην φυτοτοξικότητα, αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτής οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως η αυτόνομη ή και συνεργιστική δράση, κάποιων ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο (π.χ πολυφαινόλες, μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους λιπαρά οξέα, κ.α).

2.7 Ανάπτυξη του μύκητα *Pleurotus ostreatus* LGAM P69 σε παστεριωμένο απόβλητο βρώσιμων ελιών

2.7.1 Γενικά

Με δεδομένη την πολύ καλή απόδοση των μυκήτων λευκής σήψης, στην αποδόμησι των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών και σε συνδυασμό με το ότι η δράση των ενώσεων αυτών έχει συσχετιστεί με παρεμποδιστικά – τοξικά φαινόμενα σε διάφορες βιολογικές διεργασίες (αναερόβια και αερόβια χώνευση), αλλά και έχει αποδειχτεί από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για τα απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου (λιόζουμα). Κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση των φαινολικών του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, στις βιολογικές διεργασίες που εφαρμόζονται για την επεξεργασία του και οι οποίες θα παρουσιαστούν αναλυτικά στα επόμενα κεφάλαια της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Η συγκεκριμένη κατηγορία μυκήτων είναι πολύ ευαίσθητη στις «μολύνσεις» και δεν εμφανίζει καν ανταγωνιστικό χαρακτήρα. αντιθέτως μάλιστα η παραμικρή προσβολή των μυκήτων από βακτήρια σταματά σχεδόν εντελώς την ανάπτυξή τους. Από την άλλη μεριά απόβλητο το οποίο έχει προηγούμενα υποστεί την θερμική κατεργασία της αποστείρωσης, έχει μεν απαλλαγεί από το πρόβλημα της μόλυνσης, αλλά έχει υποστεί σημαντικές αλλοιώσεις που σε συνδυασμό με το τεράστιο κόστος που απαιτεί η διεργασία της αποστείρωσης (στους 121°C), την καθιστά ιδιαίτερα αντιοικονομική και άρα μη εφαρμόσιμη για την επεξεργασία μεγάλων όγκων αποβλήτου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι ερευνητικές εργασίες που έχουν γίνει για την μελέτη της ανάπτυξης αυτών των μυκήτων και σε διάφορα υποστρώματα, περιλαμβάνουν αποστείρωση των υποστρωμάτων. Στο σημείο αυτό, υπήρξε η σκέψη της «παστερίωσης»

του αποβλήτου. Μελετήθηκε η παστερίωση με αύξηση της θερμοκρασίας του αποβλήτου σε μία θερμοκρασία κοντά στην θερμοφίλη θερμοκρασιακή περιοχή (~60 έως 62°C) και παραμονή του αποβλήτου εκεί για ορισμένο χρονικό διάστημα (30 λεπτά). Στόχος ήταν η θανάτωση της πλειονότητας των μικροοργανισμών, οι οποίοι δεν θα επιβίωναν σε αυτή την θερμοκρασία και οι οποίοι πιθανόν να ευθύνονται για τα παρεμποδιστικά φαινόμενα (μολύνσεις) που παρατηρούνται κατά την ανάπτυξη του μύκητα στο αρχικό απόβλητο.

Ένας ακόμα επίσης παράγοντας που επιχειρήθηκε ταυτόχρονα με την παστερίωση, ήταν να μελετήσουμε την ανάπτυξη του μύκητα, όχι σε απόβλητο αραιωμένο στο 50% (όπως έγινε σε όλα τα προηγούμενα πειράματά μας), αλλά σε πυκνό απόβλητο (100%), όπως ακριβώς προκύπτει απ' ευθείας από την βιομηχανία παρασκευής των επιτραπέζιων ελιών.

Στο σημείο αυτό και με δεδομένο πλέον το γεγονός, ότι ο μύκητας επιδεικνύει την ίδια ή πιθανόν και καλύτερη συμπεριφορά στην αποδόμηση των φαινολικών στο παστεριωμένο απόβλητο των βρώσιμων ελιών και σε συνδυασμό με το ότι τα τελευταία αποτελέσματα αναφέρονται σε πυκνό απόβλητο (100%), μας έκανε να στρέψουμε το ενδιαφέρον μας και τη συνέχεια της έρευνας σε ότι αφορά την ανάπτυξη του μύκητα, σε παστεριωμένο απόβλητο.

Κρίνοντας απαραίτητο να συνεχίσουμε τις έρευνες για την αποτοξικοποίηση του υγρού αποβλήτου των πράσινων βρώσιμων ελιών, με χρήση και άλλων βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας και να μπορέσουμε να δείξουμε εάν η μείωση των φαινολικών που προκαλεί ο μύκητας σχετίζεται με την βελτιστοποίηση των διεργασιών αυτών (αναερόβιας-αερόβιας χώνευσης), σκεφτήκαμε ότι θα ήταν προτιμότερο να ερευνήσουμε πρώτα εάν υπάρχει ή όχι μια τέτοια συσχέτιση και στην συνέχεια να

γίνει μια πιο λεπτομερή ερευνητική δουλειά στην επίδραση του μύκητα και στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του παστεριωμένου αποβλήτου, που θα οδηγήσει και στην βελτιστοποίηση αυτού του σταδίου επεξεργασίας. Για τον λόγο αυτό, δεν μετρήθηκαν παράμετροι, όπως το βάρος της παραγόμενης βιομάζας, η ενζυμική παραγωγή του μύκητα, ο αποχρωματισμός του αποβλήτου, κ.α στα συγκεκριμένα πειράματα και επομένως δεν έγιναν και συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων αυτών. Αυτό που προείχε ήταν να παράγουμε μια ικανοποιητική ποσότητα αποβλήτου, απαλλαγμένου από ένα

μεγάλο μέρος φαινολικών ενώσεων (μέσω της δράσης του μύκητα), το οποίο θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια της έρευνας, ώστε να οδηγηθούμε και σε άλλα συμπληρωματικά συμπεράσματα, που θα μας βοηθούσαν να καταλήξουμε στην πρόταση μιας ολοκληρωμένης και-αποτελεσματικής λύσης για την επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών.

Από τις μετρήσεις που έγιναν διαπιστώθηκε ένα ιδιαίτερα θετικό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, ενώ εμείς παστεριώσαμε το απόβλητο για να μπορέσει ο μύκητας να αναπτυχθεί και να αποδομήσει φαινολικές ενώσεις, βλέπουμε να παρουσιάζει πολύ μεγάλη ικανότητα μείωσης του οργανικού ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου κατά 42.7%, κάτι που δεν παρατηρήθηκε κατά την δράση του τόσο σε θερμικά αποστειρωμένο όσο και σε αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο, όπου προκάλεσε μείωση του ΧΑΟ κατά 11.22% και 16.78%, αντίστοιχα (§ 2.4.3). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η διεργασία της παστερίωσης μετατρέπει κάποιες οργανικές δομές σε κάποιες άλλες, οι οποίες αποτελούν πιο εναφομοίωτο υπόστρωμα για τον μύκητα με αποτέλεσμα να αποδομούνται πιο εύκολα από την δράση του.

Βλέπουμε λοιπόν πως η παστερίωση, εκτός του ότι αποτελεί πιο συμφέρουσα οικονομικά λύση σε σχέση με την αποστείρωση, οδηγεί στην δημιουργία ενός υποστρώματος το οποίο είναι πιο πρόσφορο για επεξεργασία με χρήση ανώτερων βασιδιομυκήτων.

Κάτι άλλο που προέκυψε από το τελευταίο πείραμα, ήταν πως η παστερίωση "αυξάνει" την αρχική συγκέντρωση των φαινολικών, όχι όμως τόσο πολύ όσο είχε παρατηρηθεί στην περίπτωση του θερμικά αποστειρωμένου υλικού (διπλάσια συγκέντρωση φαινολικών σε σχέση με το αρχικό απόβλητο). Προφανώς δημιουργούνται κάποιες άλλες δομές που δίνουν περισσότερο χρώμα, καθώς αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών. Παρ' όλα αυτά όμως ο μύκητας δεν δυσκολεύεται να αποδομήσει τις φαινολικές ενώσεις του αποβλήτου, επιτυγχάνοντας μάλιστα ποσοστό αποδόμησης που αγγίζει το 80.

Η σημαντική μείωση των φαινολικών ωστόσο δεν συνοδεύτηκε και από μείωση της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου, τόσο στο 100% όσο και σε 50% αραιώση, πράγμα που

σημαίνει, ότι ή το μικρό μη βιοαποδομήσιμο φαινολικό κλάσμα που απομένει, ή κάποιες άλλες κατηγορίες ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο ευθύνονται για την φυτοτοξική δράση του. Σε ανάλογα συμπεράσματα είχαμε καταλήξει και κατά την μελέτη της επίδρασης του μύκητα σε θερμικά αποστειρωμένο και αποστειρωμένο μέσω διήθησης απόβλητο βρώσιμων ελιών.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, βλέπουμε πως η παστερίωση αξίζει να τύχει περισσότερης προσοχής και ότι θα πρέπει να «υιοθετήσουμε» την διεργασία αυτή, για την προετοιμασία του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών και προκειμένου να αναπτύξουμε αυτού του είδους τους μικροοργανισμούς. Επίσης είναι πολύ πιθανόν στο μέλλον, η διεργασία της παστερίωσης να αντικαταστήσει επιτυχώς την διεργασία της αποστείρωσης, στην επεξεργασία και άλλων ειδών αποβλήτων, με χρήση αυτής της κατηγορίας ανώτερων βασιδιομυκήτων.

2.8 Επίδραση του μύκητα *Pleurotus ostreatus* LGAM P69 στην επεξεργασία θερμικά αποστειρωμένου και παστεριωμένου αποβλήτου που προκύπτει από την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου (λιόζουμο)

2.8.1 Εισαγωγή

Μετά την επιτυχή εφαρμογή της διεργασίας της παστερίωσης, στην προεπεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, με στόχο την ανάπτυξη ανώτερων βασιδιομυκήτων, μέσω μιας διεργασίας που να μη μεταβάλλει σημαντικά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου και ταυτόχρονα να απαιτεί μικρότερο κόστος, σκεφτήκαμε να μελετήσουμε την ανάπτυξη του μύκητα *P. ostreatus* LGAM P69 στο απόβλητο που προκύπτει, από την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου (λιόζουμο).

Το απόβλητο αυτό είναι πιο ισχυρό, από άποψη οργανικού ρυπαντικού φορτίου, από το απόβλητο των βρώσιμων ελιών, αλλά ταυτόχρονα αρκετά παρεμφερές (ποιοτικά) με αυτό. Όλες οι ερευνητικές εργασίες για την επεξεργασία των λιόζουμων με την χρήση ανώτερων βασιδιομυκήτων, έχουν πραγματοποιηθεί μόνο σε εργαστηριακό επίπεδο και

με απόβλητο που έχει προηγουμένως αποστειρωθεί (121⁰C για 20 λεπτά) και σε πολύ μεγάλες αραιώσεις του αποβλήτου (12.5%, 25% και 50%), ενώ τίποτα δεν έχει γίνει για το πυκνό απόβλητο.

Δεδομένης της επιτυχημένης επεξεργασίας του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών με την διεργασία της παστερίωσης, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί εάν μπορούμε να επεξεργαστούμε το πυκνό απόβλητο του ελαιουργείου (100%), με την συγκεκριμένη κατηγορία βασιδιομυκήτων. Ένας λόγος, ο οποίος θα ενίσχυε σημαντικά την εφαρμογή μιας τέτοιας ανάπτυξη αυτού του είδους των μυκήτων, είναι ότι το λιόζουμο εξάγεται από τα ελαιουργεία, σε μια ήδη υψηλή θερμοκρασία (35-40⁰C) και συνεπώς η αύξησή της μέχρι το σημείο εκείνο, όπου η παστερίωση θα είναι αποτελεσματική, για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, δεν θα επιβάρυνε σημαντικά το κόστος λειτουργίας ενός τέτοιου συστήματος επεξεργασίας. Για να μπορέσουμε να έχουμε-συγκριτικά αποτελέσματα με τις ερευνητικές εργασίες που έχουν γίνει μέχρι τώρα και αφορούν την δράση ανώτερων μυκήτων σε αποστειρωμένο λιόζουμο, θεωρήθηκε σκόπιμο να ξεκινήσουμε τα πειράματά μας αυτά, κάνοντας μια πρώτη σειρά «δοκιμών» σε αποστειρωμένο απόβλητο.

2.8.2 Χαρακτηριστικά αποβλήτου ελαιουργείου

Το απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας, προερχόταν από ελαιουργείο δύο φάσεων και τα χαρακτηριστικά του παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.19.

Πίνακας 2.19. Χαρακτηριστικά του υγρού αποβλήτου που προκύπτει από την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου (λιόζουμο)

Χαρακτηριστικά	Τιμή
pH	5.4
Ολικό ΧΑΟ (g/l)	105.37
Διαλυτό ΧΑΟ (g/l)	58.20
Πτητικά αιωρούμενα στερεά (g/l)	46.12
Ολικά αιωρούμενα στερεά (g/l)	41.91

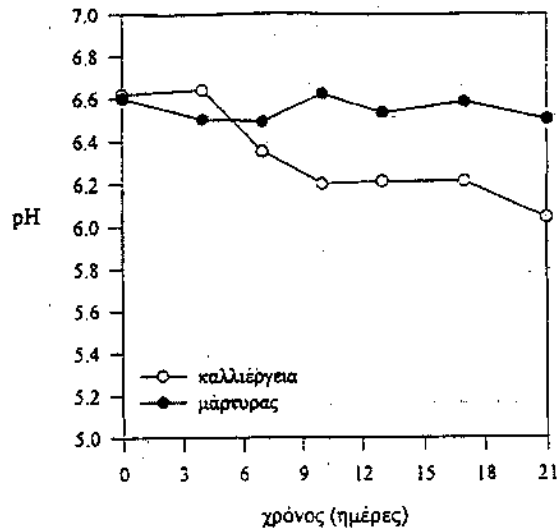
Ολικά φαινολικά (χωρίς διήθηση) (g/l)	10.195
Ολικά φαινολικά (μετά από διήθηση) (g/l)	8.183
Ολικό οργανικό άζωτο (mg/l)	750.0
Ολικός φώσφορος (mg/l)	293.3

Με βάση τις μετρήσεις που έγιναν, είναι φανερό ότι πρόκειται για πολύ ισχυρό απόβλητο, με υψηλό οργανικό φορτίο, μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολών και υψηλή συγκέντρωση στερεών, που σε συνδυασμό με το μαύρο χρώμα του, καθιστούν - αυτό ιδιαίτερα τοξικό και συνεπώς ακατάλληλο για διάθεση σε περιβαλλοντικούς αποδέκτες.

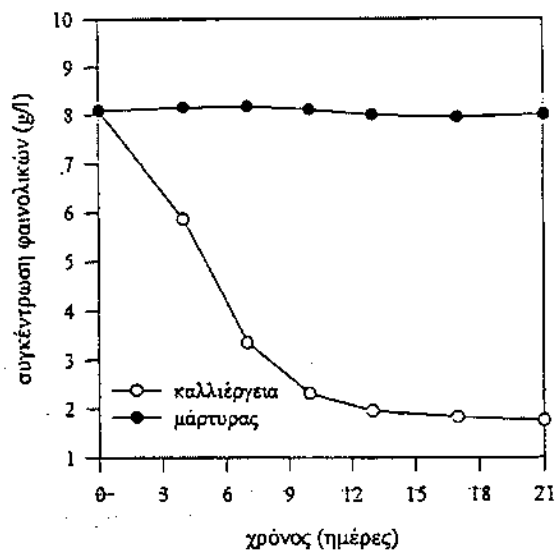
2.8.3. Αποτελέσματα

Από πειράματα που έγιναν, προέκυψαν πολύ σημαντικά αποτελέσματα για την επίδραση του μύκητα στην επεξεργασία του πυκνού αποβλήτου. Πιο συγκεκριμένα ο μύκητας οδήγησε σε μείωση του pH από ~6.62 (παρουσίασε μικρή αύξηση μετά την αποστείρωση) σε 6.04 και μετά από 21 ημέρες ανάπτυξης (Σχήμα 2.17), ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην τιμή του pH του μάρτυρα.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η επίδραση του μύκητα στην αποδόμηση της ιδιαίτερα υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών του αποβλήτου (Σχήμα 2.18), φθάνοντας σε ποσοστό 8.3%, μετά το πέρας 21 ημερών επώασης. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι το 75%, του συνολικά αποδομήσιμου φαινολικού κλάσματος, αποδομείται κατά τις επτά πρώτες ημέρες επώασης, ενώ το 91 %, μετά το πέρας δέκα ημερών. Βλέπουμε λοιπόν ότι το συγκεκριμένο είδος μύκητα, είναι ιδιαίτερα αποδοτικό (στην μείωση των φαινολικών), παρ' ότι χρησιμοποιήθηκε σε πυκνό απόβλητο, ενώ επιτυγχάνει τις ανωτέρω αποδόσεις, σε μικρούς χρόνους παραμονής.



Σχήμα 2.17: Μεταβολή του pH του θερμικά αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου από την δράση του μύκητα *P. Ostreatus* LGAM P69.



Σχήμα 2.18: Μεταβολή αποδόμησης ολικών φαινολικών θερμικά αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου από την δράση του μύκητα *P. Ostreatus* LGAM P69.

Προκειμένου να παρατηρηθεί η πορεία του αποχρωματισμού του αποβλήτου, γινόταν φυγοκέντριση και διήθηση του δείγματος (ώστε να μην υπάρχει πρόβλημα στην μέτρηση της απορρόφησης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης στερεών). Ο αποχρωματισμός του αποβλήτου ελαιουργείου μετρήθηκε σε τρία μήκη κύματος (400, 500 και 600nm). Η

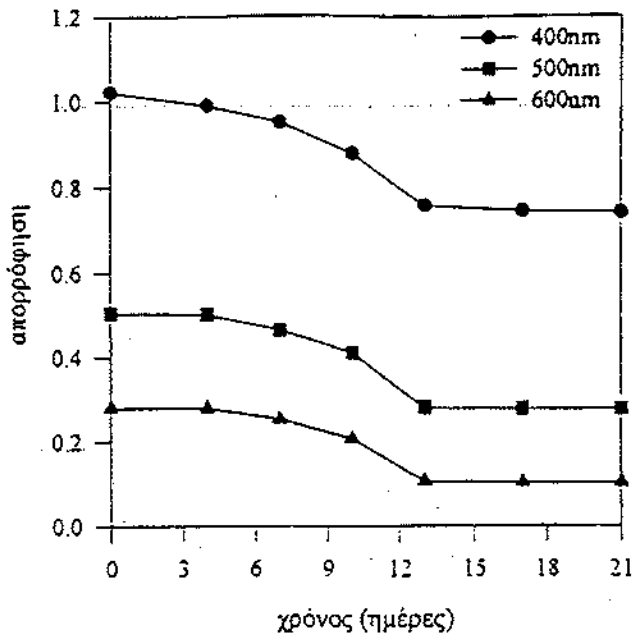
πορεία του αποχρωματισμού παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.19.

Ο μύκητας επέδειξε σημαντική μείωση του χρώματος του αποβλήτου και ιδιαίτερα όταν μετρήθηκε στα 500nm και 600nm, όπου ανήλθε σε ποσοστό 44.7% και 62.3%, αντίστοιχα και μετά από 13 ημέρες επώασης.

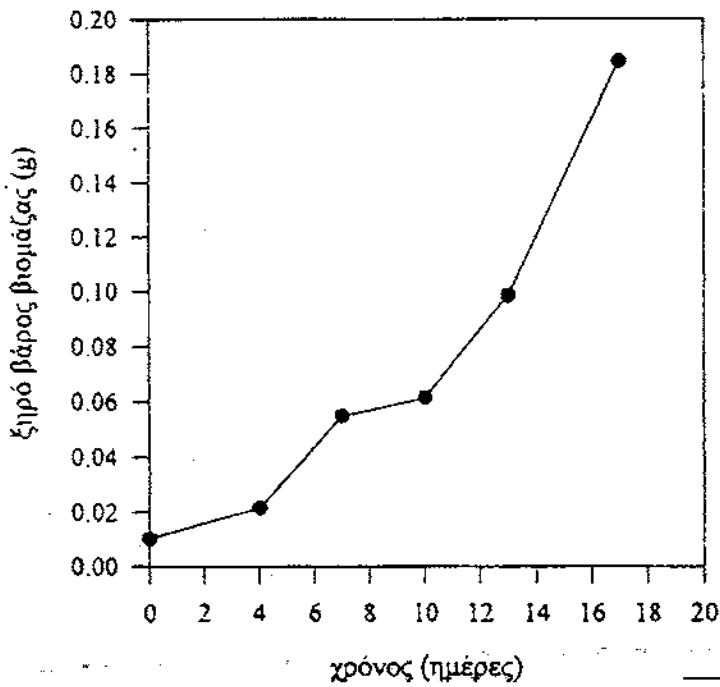
Όπως και στην περίπτωση του- αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, έτσι και με το απόβλητο του ελαιουργείου, δεν καταφέραμε να συσχετίσουμε άμεσα τον αποχρωματισμό του αποβλήτου με την μείωση των φαινολικών. Δεν παρατηρείται σημαντική μείωση του χρώματος κατά τις πρώτες επτά (7) ημέρες επώασης (7.0% στα 400nm, 8.1% στα 500nm και 9.6% στα 600nm), παρ' ότι ο μύκητας έχει ήδη αποδομήσει ένα μεγάλο μέρος φαινολικών. Στη συνέχεια «επεμβαίνει» στο υπόλοιπο φαινολικό κλάσμα (που όπως φαίνεται ευθύνεται για το σκούρο χρώμα του αποβλήτου) και οδηγεί σε σημαντικό αποχρωματισμό αυτού μετά το πέρας 13 ημερών επώασης. Παρατηρούμε δηλαδή, ότι στην αποδόμηση ενός ποσοστού φαινολικών της τάξης του 17.2%, οφείλεται μείωση του χρώματος κατά $(44.7 - 81 = 36.6\%$ στα 500nm) και $(62.3 - 9.6 = 52.7\%$ στα 600nm).

Ένα ακόμα σημαντικό αποτέλεσμα, είναι ότι ο μύκητας αρχίζει την ανάπτυξη του στο υγρό υπόστρωμα εντός των πρώτων ημερών επώασης και χωρίς να παρουσιάζει κάποια φάση καθυστέρησης, παράγοντας 0.185g/100ml αποβλήτου. Η πορεία του παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.20.

Ενώ ο μύκητας επέδρασε θετικά τόσο στην μείωση των φαινολικών, αλλά και στον αποχρωματισμό του πυκνού αποβλήτου του ελαιουργείου, δεν μείωσε σημαντικά το οργανικό φορτίο του αποβλήτου. Η μείωση του διαλυτού ΧΑΟ περιορίστηκε σε ποσοστό 10%, από ~58.0g/l σε ~52.0g/l (ανάλογα αποτελέσματα είχαν παρατηρηθεί και στην περίπτωση του αποστειρωμένου αποβλήτου των βρώσιμων ελιών):



Σχήμα 2.19: πορεία αποχρωματισμού θερμικά αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου από τη δράση του μύκητα *P. Ostreatus* LGAM P69



Σχήμα 2.20: Πορεία παραγωγής βιομάζας του μύκητα *P. Ostreatus* LGAM P69 από την δράση σε θερμικά αποστειρωμένο απόβλητο ελαιουργείου.

2.8.4 Ανάπτυξη του μύκητα *Pleurotus ostreatus* LGAM P69 σε παστεριωμένο απόβλητο ελαιουργείου

2.8.4.1 Γενικά

Στην συνέχεια και με βάση τα ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα που είχε παρουσιάσει η διεργασία της παστερίωσης (για την ανάπτυξη του μύκητα), στην επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης αυτής της μεθόδου επεξεργασίας και για τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου.

Έτσι εξετάζουμε, με παστεριωμένο απόβλητο ελαιουργείου και στις ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν και για την περίπτωση του αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, δηλαδή θέρμανση του αποβλήτου στους 60°C για 30 λεπτά. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε και η διαδικασία που ακολουθήθηκε, ήταν όπως ακριβώς και για το απόβλητο των βρώσιμων ελιών που περιγράφεται στην (§ 2.7.1).

2.8.4.3. Αποτελέσματα

Μετά το τέλος της παστερίωσης μια μικρή αύξηση σημειώθηκε στην τιμή του pH ~6.5, ενώ στην συνέχεια και από την δράση του μύκητα μειώθηκε στην τιμή 5.8, μετά το τέλος της επώασης (Σχήμα 2.21).

Πολύ σημαντική ήταν και η αποδόμηση των φαινολικών που προκάλεσε η δράση του μύκητα. Η διεργασία της παστερίωσης οδήγησε σε μικρή "αύξηση" της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών (από 8.1833 g/l σε 10.513 g/l), που σημαίνει ότι δημιουργήθηκαν κάποιες δομές, οι οποίες όταν αντιδρούν με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο (Folin & Ciocalteu), που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων, επιδεικνύουν μεγαλύτερη απορρόφηση (στα 760 nm).

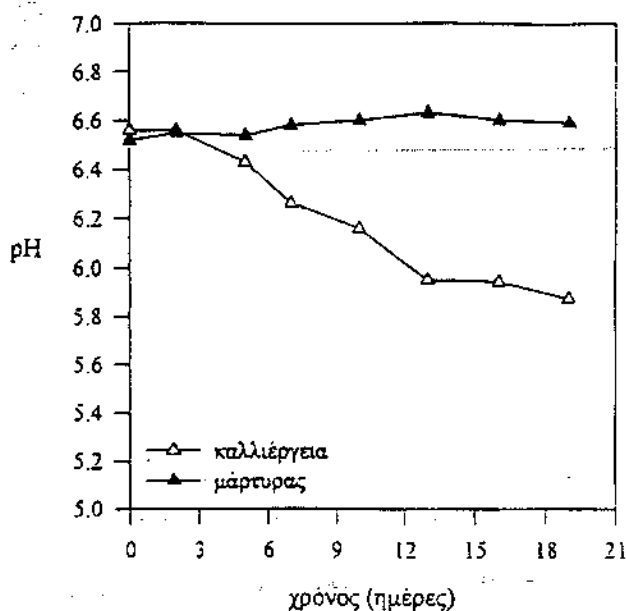
Η δράση του μύκητα οδήγησε σε τελικό ποσοστό απομάκρυνσης φαινολικών 66.7% (19η ημέρα ανάπτυξης), έναντι του 78.3% στην περίπτωση του αποστειρωμένου λιόζουμου, ενώ το μεγαλύτερο μέρος αυτών (54.3%), αποδομείται τις πρώτες επτά (7) ημέρες

ανάπτυξης. Η πορεία αποδόμησης των φαινολικών του παστεριωμένου αποβλήτου παρουσιάζεται στο διάγραμμα του Σχήματος 2.22.

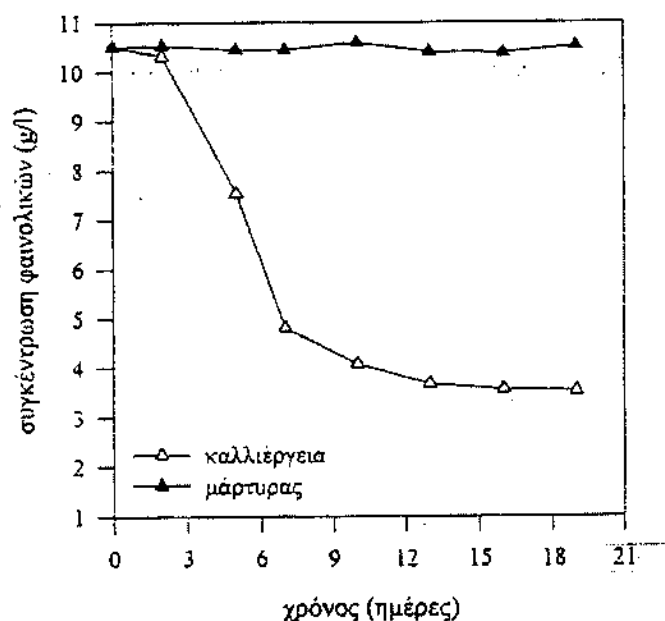
Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα παραπάνω αποτελέσματα αναφέρονται σε πυκνό απόβλητο ελαιουργείου (100%), καταλήγουμε στο ότι η διεργασία της παστερίωσης, αποτελεί μια επιτυχή διαδικασία για την ανάπτυξη του μύκητα και συνεπώς την επεξεργασία του αποβλήτου, η οποία επιδέχεται περαιτέρω βελτιστοποίηση.

Παρ' ότι αποδομήθηκε ένα μεγάλο μέρος του φαινολικού κλάσματος του αποβλήτου δεν συνοδεύτηκε και με ανάλογο αποχρωματισμό. Η τιμή της απορρόφησης του επεξεργασμένου με τον μύκητα υλικού ήταν περίπου ίση με αυτή του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες που έγιναν και για τα τρία μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν (400nm, 500nm και 600nm).

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα φυτοτοξικότητας, μετά από δέκα ημέρες επώασης.



Σχήμα 2.21: Μεταβολή του pH του παστεριωμένου αποβλήτου ελαιουργείου από τη δράση του μύκητα *P. Ostreatus* LGAM P69



Σχήμα 2.22: Πορεία αποδόμησης ολικών φαινολικών του παστεριωμένου αποβλήτου ελαιουργείου από τη δράση του μύκητα *P. Ostreatus LGAM P69*

Το σημείο αυτό ήταν αρκετά ενδεικτικό για την εκτίμηση της πορείας της φυτοτοξικής δράσης του αποβλήτου και της συσχέτισης αυτής με τα φαινολικά, αφού σε αυτό το χρονικό διάστημα είχε ήδη αποδομηθεί ποσοστό 61.4% (από το συνολικό 66.7%). Η φυτοτοξικότητα του αποβλήτου μετρήθηκε σε αραιώσεις 12.5%, 25%, 50%, 75% και 100% και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.20.

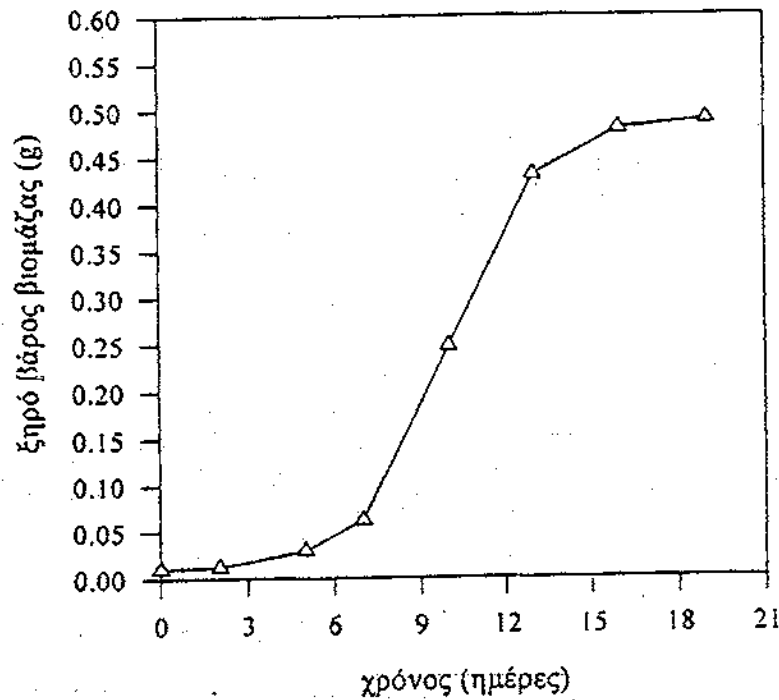
Πίνακας 2.20. Αποτελέσματα πειραμάτων φυτοτοξικότητας στο παστεριωμένο λιόζουμο, μετά το πέρας 10 ημερών επώασης με τον μύκητα *P. ostreatus LGAM P69*

(%) Αραίωση	(%) Δείκτης βλαστικότητας	
	Μάρτυρας	Καλλιέργεια με μύκητα
100	0	0
75	0	0
	0	0
50	0	0
25	0	19.5
12.5	43.6	69.3

Από τα πιο πάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι σε μικρές αραιώσεις (50%, 75% και 100%), τόσο ο μάρτυρας όσο και το επεξεργασμένο με μύκητα απόβλητο, παραμένει φυτοτοξικό κατά 100% (0% δείκτης βλαστικότητας). Σε μεγαλύτερες όμως αραιώσεις του αποβλήτου και συγκεκριμένα στο 25%, παρουσιάζεται μια αύξηση του δείκτη βλαστικότητας κατά 19.5% και με δεδομένο ότι δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση του ΧΑΟ, αποδίδουμε αυτή την μείωση της φυτοτοξικότητας στην αποδόμηση των φαινολικών. Μπορούμε γενικότερα να συμπεράνουμε, όπως και στην περίπτωση του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών, ότι ένα (μικρό) μέρος της φυτοτοξικής δράσης του αποβλήτου του ελαιουργείου οφείλεται στο περιεχόμενοφαινολικό κλάσμα και ότι το μεγαλύτερο μέρος της οφείλεται, είτε στο φαινολικό κλάσμα που απομένει (δεν αποδομείται από τον μύκητα), είτε στην «αυτόνομη» ή «συνεργιστική» δράση άλλων ενώσεων που περιέχονται σε αυτό.

Πρέπει ακόμα να τονίσουμε ότι από τη δράση του μύκητα, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του ΧΑΟ κατά 12% (από -58.0g/l σε -51.0g/l) σε αντίθεση με το παστεριωμένο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, όπου η δράση του μύκητα οδηγεί σε μείωση του ΧΑΟ, που ξεπερνά το 40.0% (§ 2.7.3, Πίνακας 2.16).

Ένα επίσης σημαντικό αποτέλεσμα, είναι ότι η ανάπτυξη του μύκητα σε παστεριωμένο απόβλητο ελαιουργείου παρότι παρουσίασε μία μικρή φάση υστέρησης (2-3 ημερών) στην ανάπτυξη του, οδήγησε σχεδόν σε τριπλάσια παραγωγή μυκηλίου (βιομάζας) 0.488g, έναντι του αποστειρωμένου υλικού 0.185g. Η παραγωγή βιομάζας του μύκητα στις υγρές καλλιέργειες του παστεριωμένου λιόζουμου παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.23.



Σχήμα 2.23. Πορεία παραγωγής βιομάζας του μύκητα *P. ostreatus* LGAM P69 από την δράση του σε παστεριωμένο απόβλητο ελαιουργείου

Ως τελικό συμπέρασμα από τις δυο εργασίες (αποστείρωση και παστερίωση), προκύπτει ότι ο μύκητας αναπτύσσεται και αποδομεί φαινολικές ενώσεις σε πολύ μεγάλο ποσοστό και σε μικρούς χρόνους παραμονής παραμονής. Γίνεται όμως φανερό ότι σε καμία από τις δύο περιπτώσεις, η επεξεργασία με μύκητα δεν μπορεί να αποτελέσει αυτόνομη διεργασία για ολοκληρωμένη διαχείριση και διάθεση του αποβλήτου, τόσο σε εδαφικούς (διότι παραμένει φυτοτοξικό όσο και σε υδάτινους (μικρή μείωση οργανικού υλικού) αποδέκτες.

Ο συνδυασμός όμως του σταδίου αυτού με άλλες βιολογικές διεργασίες (αναερόβιας αερόβιας χώνευσης), αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προοπτική, που μπορεί να οδηγήσει σε πολύ καλά αποτελέσματα για την αποτοξικοποίηση του και προς αυτή την κατεύθυνση πιστεύουμε, ότι πρέπει να επικεντρωθούν οι μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες, για την επιτυχή διαχείριση του υγρού αποβλήτου που προκύπτει από την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

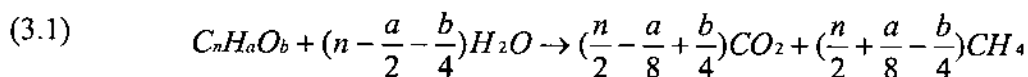
ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ

3.1 Εισαγωγή

Αναερόβια χώνευση χαρακτηρίζεται η βιολογική διεργασία κατά την οποία παράγεται κυρίως μεθάνιο (CH_4) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) από οργανική ύλη, με τη συνδυασμένη δράση μεικτού μικροβιακού πληθυσμού, υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου και είναι η προτιμώμενη μέθοδος επεξεργασίας υγρών αποβλήτων υψηλού οργανικού φορτίου, λόγω κυρίως της μικρής παραγωγής βιομάζας συγκριτικά με την αερόβια επεξεργασία.

Η παραγωγή μεθανίου στη φύση από βιολογική δραστηριότητα είναι διαπιστωμένη από πολύ παλιά (1776), όταν ο Volta περιέγραψε την έκλυση μεθανίου από θαλάσσιο βούρκο. Η αναερόβια χώνευση είναι μία από τις παλαιότερες διεργασίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία υλός βιολογικού καθαρισμού. Συγκεκριμένα, η αναερόβια χώνευση αστικών λυμάτων (υψηλή συγκέντρωση σε στερεά), αναπτύχθηκε στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα στην πόλη Vesoul της Γαλλίας από τον Louis H. Mouras, ο οποίος σχεδίασε και κατασκεύασε ζυμωτήρες για την επεξεργασία της υλός (Malina and Pohland, 1992b). Πιο πρόσφατα η αναερόβια χώνευση έχει εφαρμοστεί και στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων κυρίως μέσου και υψηλού οργανικού φορτίου (Lawrence and McCarty, 1967). Επίσης τα τελευταία χρόνια διεξάγεται σημαντική έρευνα για τη δυνατότητα παραγωγής ενέργειας από βιομάζα μέσω της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης.

Σε γενικές γραμμές και υπό τον όρο ότι η αναερόβια αποδόμηση του οργανικού υλικού μπορεί να είναι πλήρης (δηλ. ο οργανικός άνθρακας να έχει μετατραπεί πλήρως σε μεθάνιο (CH_4) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) Schink, 1988), οι οργανικές ενώσεις μετατρέπονται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα σύμφωνα με την εξίσωση 3.1. (Symons and Buswell, 1933, Tarvin and Buswell, 1934).

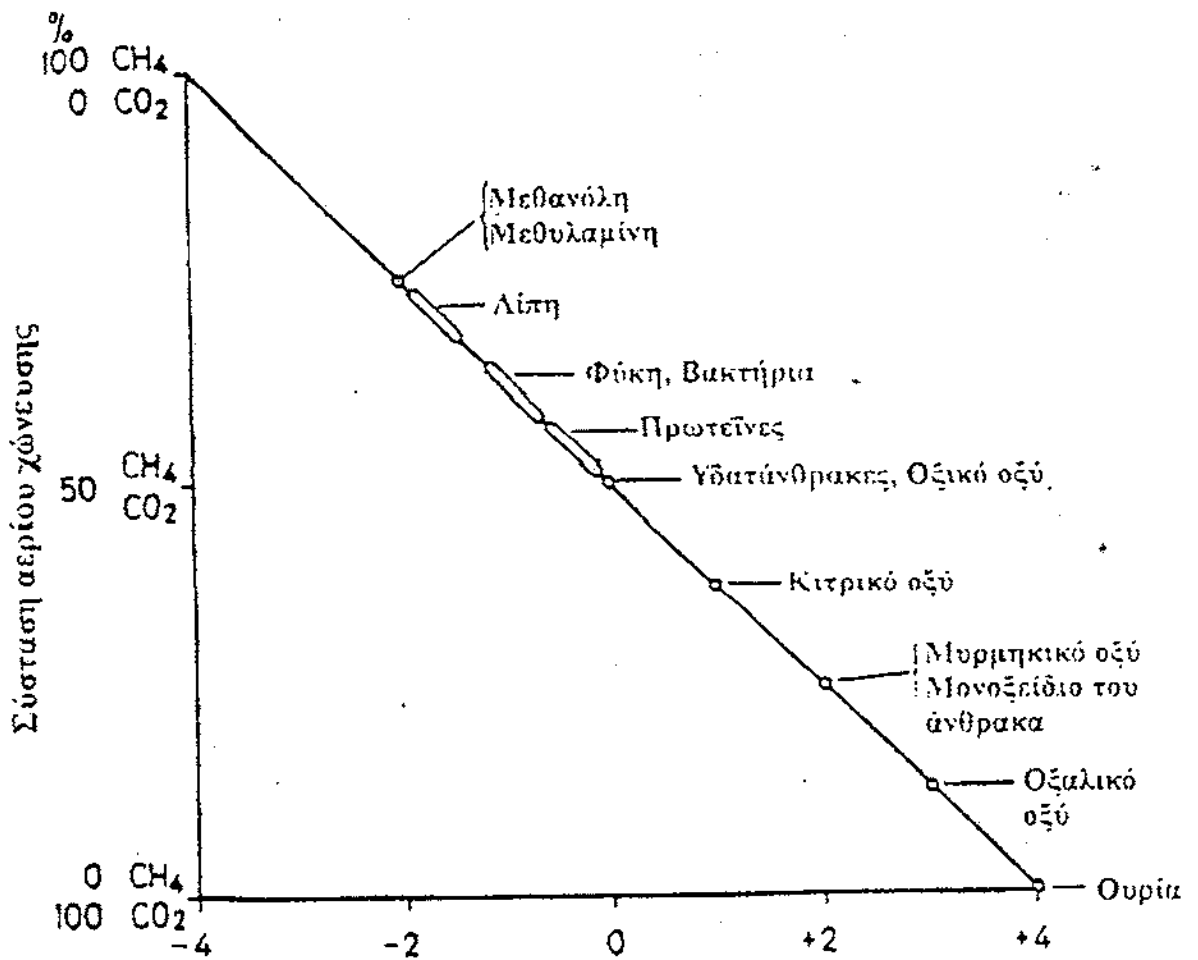


Είναι φανερό ότι η ποσοστιαία σύσταση του παραγομένου αερίου μίγματος σε -μεθάνιο εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του άνθρακα στο υπόστρωμα. Έτσι οι υδατάνθρακες μετατρέπονται σε ίσες ποσότητες μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα, η μεθανόλη και τα λιπίδια σε περισσότερο μεθάνιο από διοξείδιο του άνθρακα, το μεθανικό και οξαλικό οξύ δίνουν μεγαλύτερη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα από μεθάνιο ενώ δεν παράγεται καθόλου μεθάνιο από την υδρόλυση της ουρίας (Schink, 1988). Στο Σχήμα 4.1, φαίνεται η σύσταση του παραγομένου αερίου μίγματος σε μεθάνιο συναρτήσει της οξειδωτικής κατάστασης του άνθρακα στο υπόστρωμα (Gujer and Zehnder, 1983).

Η μετατροπή του οργανικού υλικού προς μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα προχωράει όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2. Διακρίνουμε τέσσερα στάδια: το στάδιο της υδρόλυσης των οργανικών

Μακρομορίων (πολυμερή όπως λιπίδια, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλειικά οξέα) προς τα αντίστοιχα μονομερή, δηλ. λιπαρά οξέα, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες. Στη συνέχεια διακρίνουμε το στάδιο της οξεογένεσης κατά το οποίο μεταβολίζονται τα μονομερή κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα αλλά και προς αλκοόλες, αμίνες κ.λ.π., με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Στο τρίτο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης (οξικογένεση) συντελείται η μετατροπή των ανώτερων πτητικών λιπαρών οξέων καθώς και των αλκοολών σε οξικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου, από τα οξικογόνα βακτήρια. Τέλος, κατά το τέταρτο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης, τη μεθανογένεση, τα μεθανογόνα βακτήρια παράγουν μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα από οξικό οξύ, καθώς και μεθάνιο από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Σε επόμενη παράγραφο θα ασχοληθούμε αναλυτικά με τη μικροβιολογία και την κινητική του κάθε σταδίου της αναερόβιας χώνευσης, όπως έχει προκύψει μέχρι σήμερα από τη διεθνή βιβλιογραφία.

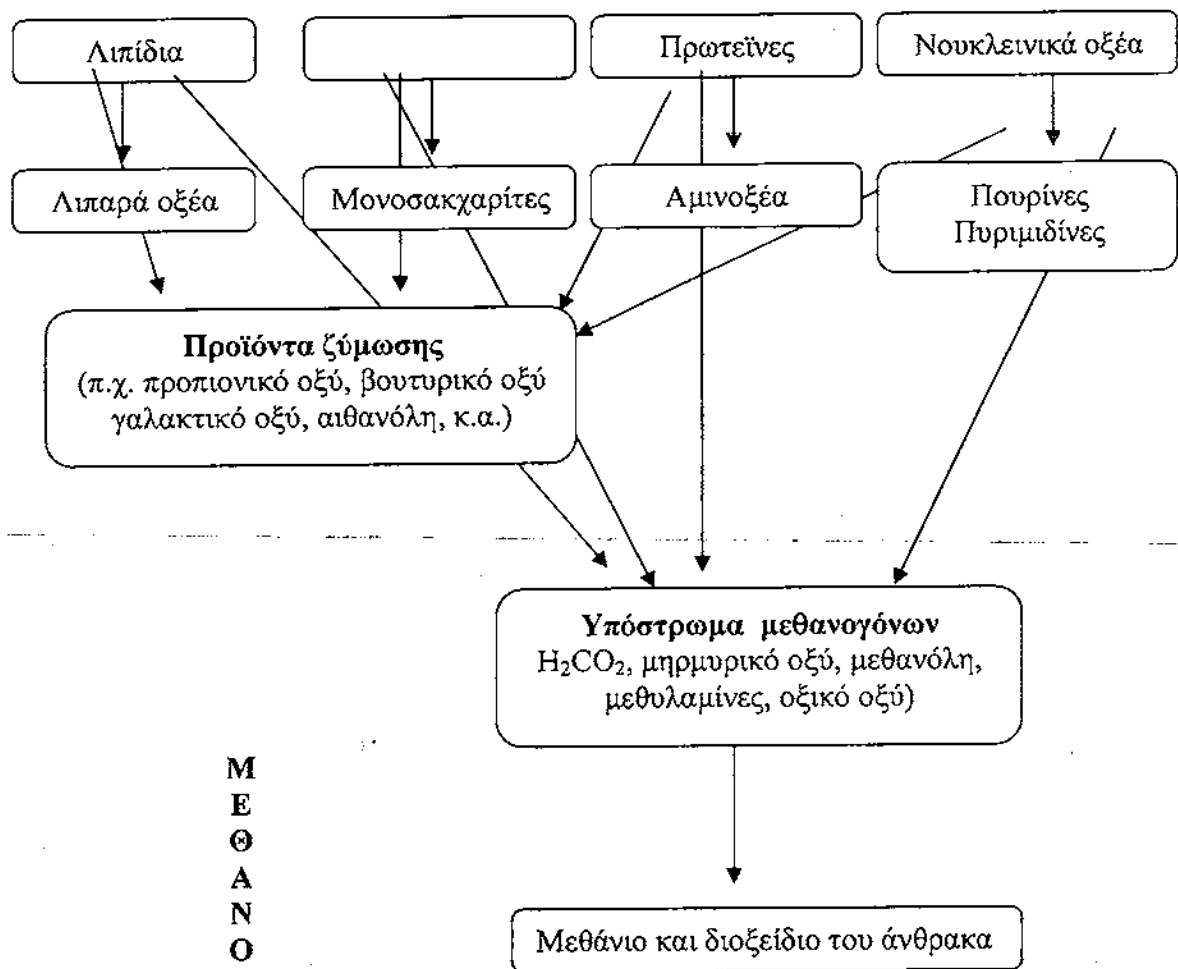
Τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης, έναντι της συμβατικής αερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων (διεργασία ενεργού ιλύος) (Lettinga et. Al., 1979), είναι τα εξής:



Σχήμα 3.1 Σύσταση τα παραγόμενου βιοαερίου συναρτήσει της οξειδωτικής κατάστασης του άνθρακα στο υπόστρωμα (Gujer and Zehnder, 1983)

ΟΞΙΚΟΓΕΝΕΣΗ

ΜΕΘΑΝΟΓΕΝΕΣΗ



Σχήμα 3.2. Μετατροπή οργανικού υλικού κατά την διεργασία της αναερόβιας χώνευσης

- Είναι δυνατή η σταθεροποίηση υγρών αποβλήτων υψηλού οργανικού φορτίου.
- Παράγεται μικρή περίσσεια σταθεροποιημένης λάσπης.
- Υπάρχουν μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (N και P).
- Καταναλώνεται ελάχιστη σχετικά ενέργεια, κυρίως για θέρμανση.
- Παράγεται ενέργεια με την μορφή του βιοαερίου.
- Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί μπορούν να διατηρηθούν χωρίς τροφοδοσία για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς σημαντική μείωση της ενεργότητας τους.
- Παραγωγή εδαφοβελτιωτικού, αφού η χωνευμένη λάσπη περιέχει N, P, άλλα θρεπτικά και οργανική ύλη που βελτιώνει την γονιμότητα και την δομή του εδάφους.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης σε σχέση με την αερόβια επεξεργασία είναι:

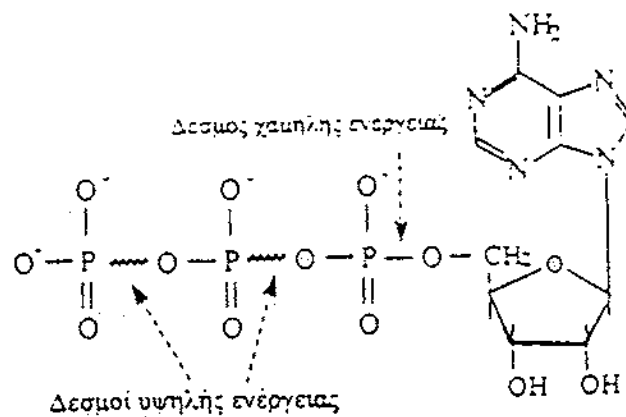
- Η μεγάλη ευαισθησία των μεθανογόνων μικροοργανισμών σε πλήθος τοξικών ενώσεων (Lettinga *et al.*, 1979). Τα τελευταία όμως χρόνια γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης κατάλληλων μεθόδων και βιολογικών συστημάτων ώστε να γίνει δυνατή η βιοαποδόμηση τοξικών ενώσεων κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Verstraete and Vandevivere, 1997).
- Η σχετικά χαμηλή ευστάθεια των αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας, που τείνει όμως να εξαληφθεί με την ολοκληρωμένη γνώση των βασικών αρχών της διεργασίας.
- Απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την εκκίνηση της διεργασίας, που μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 12 εβδομάδες. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη λειτουργία σε ετήσια βάση των μονάδων αναερόβιας-επεξεργασίας- αποβλήτων, ώστε να υπάρχουν μεγάλες ποσότητες αναερόβιων μικροοργανισμών που είναι διαθέσιμες να αποτελέσουν τη «μαγιά» σε νέους αντιδραστήρες.

3.2 Μικροβιολογία και κινητική της αναερόβιας χώνευσης

Σε ένα ζωντανό κύτταρο λαμβάνει χώρα μεγάλος αριθμός χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα. Το σύνολο των χημικών δραστηριοτήτων που γίνονται σ' ένα κύτταρο ονομάζεται μεταβολισμός. Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού διακρίνονται στις

καταβολικές, μέσω των οποίων πολύπλοκες οργανικές ενώσεις διασπώνται σε απλούστερες, απελευθερώνοντας ενέργεια και στις αναβολικές, μέσω των οποίων συντίθενται νέα κύτταρα από απλές χημικές ενώσεις. Ανάλογα με την χημική σύσταση ενός περιβάλλοντος, αναπτύσσονται διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, καταναλώνοντας ουσίες που χαρακτηρίζονται σαν υπόστρωμα, παράγοντας ταυτόχρονα μεταβολικά προϊόντα.

Το μεγαλύτερο μέρος των καταβολικών αντιδράσεων είναι οξειδοαναγωγικού τύπου (περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένα αντιδρόν στο άλλο). Η ενέργεια που απελευθερώνεται ως αποτέλεσμα των οξειδοαναγωγικών αυτών αντιδράσεων χρησιμοποιείται για τις κυτταρικές λειτουργίες. Στους ζωντανούς οργανισμούς η ενέργεια αυτή μεταφέρεται, με τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, σε μια ποικιλία φωσφορικών ενώσεων (ενδιάμεσα υψηλής ενέργειας). Η πιο σημαντική ένωση αυτού του είδους είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και αποτελείται από την ριβονουκλεοσιδική αδενοσίνη, στην οποία είναι συνδεδεμένα τρία φωσφορικά μόρια στη σειρά (σχήμα 3.3).



Σχήμα 4.3. Δομή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν αυτήν την ενέργεια για να διεξάγουν τρεις λειτουργίες: α) τη χημική σύνθεση μεγάλων και σύνθετων μορίων (ανάπτυξη), β) τη μεταφορά ουσιών μέσα ή έξω από το κύτταρο και τα εσωτερικά οργανίδια του και γ) την παραγωγή μηχανικού έργου που απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση (πολλαπλασιασμός) και

κίνηση. Όλες οι λειτουργίες αυτές είναι μη αυθόρμητες και συντελούν σε αύξηση της ελεύθερης ενέργειας του κυττάρου. Συνεπώς αυτές οι λειτουργίες συνυπάρχουν με άλλες διεργασίες οι οποίες συντελούν σε αρνητική αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας.

Το σύνολο των αντιδράσεων που οδηγούν στην οξείδωση μιας ένωσης, ονομάζεται βιοχημικό δίκτυο. Τα δίκτυα για την οξείδωση των οργανικών ενώσεων και την διατήρηση της ενέργειας σε ATP μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: την ζύμωση, κατά την οποία οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής συμβαίνουν υπό την απουσία κάποιου ανόργανου τελικού δέκτη ηλεκτρονίων και την αναπνοή, κατά την οποία το μοριακό οξυγόνο ή κάποια άλλη οξειδωτική ουσία (NO_3^- , SO_4^{2-}), παίζει το ρόλο του τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων. Επειδή δεν έχουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ικανότητα χρήσης του μοριακού οξυγόνου, ένα γενικό κριτήριο κατάταξης των μικροοργανισμών είναι η σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Κατάταξη των μικροοργανισμών με κριτήριο τη σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο

Ιδιότητα	Μικροοργανισμοί
Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο	1. Αερόβιοι (aerobes)
Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο, αλλά μπορούν να ζήσουν με ζυμωτικό μεταβολισμό και σε αναερόβιες συνθήκες	2. Προαιρετικά αναερόβιοι (facultative anaerobes)
Δεν διαθέτουν την ικανότητα χρήσης του μοριακού οξυγόνου	3. Υποχρεωτικά αναερόβιοι (obligate anaerobes)
Μπορούν να ζήσουν και σε αερόβιες συνθήκες	3α. Αδιάφοροι αναερόβιοι (indiferent anaerobes)
Έχουν ένα όριο ανοχής στη συγκέντρωση οξυγόνου στο περιβάλλον τους	3β. Ανθεκτικοί στον αέρα αναερόβιοι (anaerobes) (aerotolerants)
Πεθαίνουν ακόμα και με ίχνη ελεύθερου οξυγόνου στο περιβάλλον τους	3γ. Αυστηρά αναερόβιοι (stnct anaerohees)

3.3 Αναερόβιος μεταβολισμός της οργανικής ύλης

Στην συνέχεια δίνεται αναφορά των χαρακτηριστικών κάθε σταδίου της αναερόβιας χώνευσης και της σημασίας που έχει στην συνολική διεργασία, καθώς και των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτά.

3.3.1 Υδρόλυση βιοπολυμερών στην αναερόβια χώνευση

Οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μεταβολίσουν απ' ευθείας οργανικό υλικό σε μορφή σωματιδίων, καθώς η κυτταρική τους μεμβράνη είναι αδιαπέραστη για τέτοιου είδους υλικά. Πρέπει να προηγηθεί διαλυτοποίηση ή αλλιώς υδρόλυση των οργανικών σωματιδίων προς διαλυτά πολυμερή και στη συνέχεια προς διμερή ή μονομερή τα οποία μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο και να μεταβολιστούν (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991, Gujer and Zehnder, 1983). Η παραδοσιακή σημασία της υδρόλυσης είναι η «χημική αποσύνθεση με την οποία μία ένωση διασπάται σε άλλες ενώσεις με την πρόσληψη στοιχείων του νερού». Μία πιο πρόσφατη και τεχνικά πιο σωστή περιγραφή αυτής της διεργασίας, είναι με τον όρο «αποπολυμερισμός». Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα με τη δράση ενζύμων, τις υδρολάσες, τα οποία δρουν είτε εξωκυτταρικά στην περίπτωση βιοπολυμερών, είτε ενδοκυτταρικά στην περίπτωση μικρών διμερών (π.χ. λακτόζη).

3.3.2 Οξεογένεση στην αναερόβια χώνευση

Κατά το στάδιο της οξεογένεσης στην αναερόβια χώνευση, διαλυτό οργανικό υλικό (τα μονομερή που παράγονται από την υδρόλυση των πολυμερών) αποδομείται βιολογικά, κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα και αλκοόλες, με τη δράση ενός ετερογενούς μικροβιακού πληθυσμού. Το κυρίαρχο είδος των μικροοργανισμών σ' αυτό το

στάδιο είναι τα βακτήρια, ενώ έχουν αναφερθεί και μικροί πληθυσμοί πρωτοζώων, μυκήτων και ζυμών (Toerien and Hattingh, -1969). Μέχρι περίπου το έτος 1965 είχαν απομονωθεί πολύ λίγα είδη βακτηρίων από αναερόβιους χωνευτήρες και είχε επικρατήσει η άποψη ότι τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια υπερείχαν αριθμητικά των υποχρεωτικά αναερόβιων (Toerien *et al.*, 1967). Στο σύνολο του, ο οξεογόνος πληθυσμός, αποτελεί περίπου το 90% του συνολικού πληθυσμού μικροοργανισμών σε

ένα αναερόβιο χωνευτήρα (Zeikus, 1980).

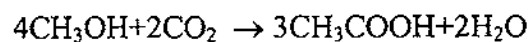
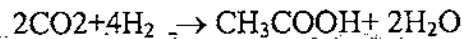
3.3.3 Οξικογένεση στην αναερόβια χώνευση

Το οξικό οξύ είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού των οργανικών ενώσεων, αφού αποτελεί την πρόδρομο ένωση για τον σχηματισμό του μεθανίου. Γενικά, μπορούμε να διακρίνουμε δύο διαφορετικούς τύπους μηχανισμών οι οποίοι καταλήγουν στην παραγωγή οξικού οξέος: (1) τις οξικογόνες υδρογονώσεις (acetogenic hydrogenations) και (2) τις οξικογόνες αφυδρογονώσεις (acetogenic dehydrogenations). Οι οξικογόνες υδρογονώσεις λαμβάνουν χώρα με την ανάπτυξη δύο ομάδων μικροοργανισμών: (α) των μικροοργανισμών οι οποίοι υποχρεωτικά ανάγουν πρωτόνια ή αλλιώς παράγουν υδρογόνο κατά το μεταβολισμό τους (obligate proton-reducing or obligate hydrogen producing) και (β) αυτών που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν διάφορους δέκτες ηλεκτρονίων κατά την αποδόμηση οργανικών υποστρωμάτων. Οι τελευταίοι, ανάλογα με τη υψηλή ή όχι συγκέντρωση υδρογόνου στο περιβάλλον τους ρυθμίζουν το μεταβολισμό τους προς την παραγωγή λιγότερο ή περισσότερο οξειδωμένων προϊόντων αντίστοιχα (facultative proton reducing). Οι οξικογόνες αφυδρογονώσεις περιλαμβάνουν την παραγωγή οξικού κυρίως από διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο, από μονοξείδιο του άνθρακα και νερό και από μεθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (πίνακας 3.2).

Συνήθως αυτά τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και με άλλα οργανικά υποστρώματα, όπως σάκχαρα, γαλακτικό οξύ κ.α. (Dolfing, 1988).

Πίνακας 3.2. Αντιδράσεις οξικογόνων αφυδρογονώσεων

Οξικογόνες αφυδρογονώσεις



(Gottschalk, G., (1986b)

Μετρήσεις σε αναερόβια περιβάλλοντα όπως σε δείγματα βούρκου και λάσπης έδειξαν ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων τα οποία εκτελούν οξικογόνες αφυδρογονώσεις ήταν μικρότερος κατά δύο τάξεις μεγέθους από τον πληθυσμό των μεθανογόνων που ήταν παρόντα στα ίδια δείγματα.

3.3.4 Μεθανογένεση στην αναερόβια χώνευση

Τα μεθανογόνα βακτήρια είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί ζουν στο στομάχι των μηρυκαστικών αλλά και άλλων ζώων και γενικά απαντώνται στη φύση σε ανοξικά περιβάλλοντα. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους στο εσωτερικό μέρος του κορμού ορισμένων δέντρων (ιδιαίτερα σε ξηρές περιοχές), σε λάσπες αποχετεύσεων και σε ιζήματα λιμνών γλυκού νερού. Έκλυση μεθανίου προερχόμενου από βιολογική πηγή έχει ανιχνευθεί και σε αρκετά υπεραλατούχα περιβάλλοντα. Ακόμα, από θερμοφιλα περιβάλλοντα (θερμές πηγές) έχουν απομονωθεί ενεργά είδη

μεθανογόνων βακτηρίων (π.χ. το *Methanothermus fervidus* έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 83^o C) (Oremland, 1988).

Ως πηγή ενέργειας για τα μεθανογόνα βακτήρια χρησιμοποιείται περιορισμένος αριθμός απλών οργανικών ενώσεων. Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι υποστρώματα για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το μεθανικό οξύ, το οξικό οξύ, η μεθανόλη, οι μεθυλαμίνες και το διμεθυλσουλφίδιο. Κάποια είδη μεθανογόνων χρησιμοποιούν και το μονοξείδιο του άνθρακα (Oremland, 1988).

Στον πίνακα 3.3, παρουσιάζονται οι αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου από τις παραπάνω ενώσεις και οι αντίστοιχες μεταβολές της-ελεύθερης ενέργειας (Vogels *et al.*, 1988).

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι όλοι οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είχαν την ικανότητα να παράγουν μεθάνιο από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Διαπιστώθηκε όμως ότι αν και τα περισσότερα είδη μεθανογόνων έχουν αυτή την ικανότητα, υπάρχουν και κάποια τα οποία χρησιμοποιούν το οξικό οξύ ως υπόστρωμα και έχουν χωριστεί σε δύο κατηγορίες: α) στα «Οξικοτροφικά», όπως τα *Methanotherix soehngeni*, *Methanosarcina TM-1*, *Methanosarcina acetivorans* και

Πίνακας 3.3. Αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου και οι αντίστοιχες μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας

Αντιδράσεις			ΔG^0 (KJ /mol CH ₄)
CO ₂ + 4H ₂	→	CH ₄ + 2H ₂ O	-131
4HCOOH	→	CH ₄ + 3CO ₂ + 2H ₂ O	-304
4CO + 2H ₂ O	→	CH ₄ + 3CO ₂	-210
4CH ₃ OH	→	3CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O	-319
CH ₃ NH ₃ Cl + 2H ₂ O	→	3CH ₄ + CO ₂ + 4NH ₄ Cl	-230
CH ₃ OH + H ₂	→	CH ₄ + H ₂ O	-113
CH ₃ COO + H ₂ O	→	CH ₄ + HCO ₃	-31

β) στα «αποχρεωτικά μεθυλότροφα», όπως τα *Methanobolbus tindarus*, *Methanococcoides methylmutens*, *Methanococcus halophilus* τα οποία μεταβολίζουν μόνο τη μεθανόλη, τις μεθυλαμίνες και το διμεθυλσουλφίδιο. Έχει αποδειχθεί ότι και οι οξικότροφοι και οι μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί παράγουν μεθάνιο απευθείας από τις μεθυλομάδες (-CH₃) και όχι μέσω CO₂. Μεταξύ των μεθανογόνων χρηστών υδρογόνου υπάρχουν αρκετά είδη τα οποία μεταβολίζουν το μεθανικό οξύ (π.χ. *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanobacterium formicicum*) και το μονοξειδίο του άνθρακα (π.χ. *Methanobacte* ή *um thermoautotrophicum*). Τέλος, κάποια είδη μεθανογόνων μικροοργανισμών είναι ικανά να μεταβολίσουν σχεδόν όλα τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα που έχουν αναφερθεί. Για παράδειγμα τα *Methanosarcina barkeri* και *Methanococcus mazei* χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα όλες τις παραπάνω ενώσεις εκτός του μεθανικού οξέος (Gottschalk, 1986b, Oremland, 1988, Vogels *et al.*, 1988).

3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης

Η αναερόβια χώνευση περιλαμβάνει πολλές ομάδες μικροοργανισμών, οι οποίοι λόγω της διαφορετικής φυσιολογίας τους είναι ευαίσθητοι σε πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η σύσταση του οργανικού υποστρώματος της τροφοδοσίας, τα

θρεπτικά συστατικά και οι τοξικές ουσίες. Ο έλεγχος των παραγόντων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την αποτελεσματικότητα της διεργασίας και για τον λόγο αυτό περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

3.4.1 Θερμοκρασία

Η παραγωγή του ενεργειακά χρήσιμου μεθανίου αλλά και η σημαντική μείωση του οργανικού φορτίου που επιτυγχάνεται κατά τη μεθανογένεση, καθιστούν αυτήν ως το σπουδαιότερο στάδιο της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης. Τα μεθανογόνα βακτήρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας, συνεπώς οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αναερόβια χώνευση πρέπει να είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη των μεθανοβακτηρίων.

Γενικά έχει διαπιστωθεί μικροβιακή δραστηριότητα σε θερμοκρασιακά όρια που κυμαίνονται από τους 0°C έως περίπου τους 100°C. Το ανώτατο θερμοκρασιακό όριο για ανάπτυξη καθορίζεται από τη θερμική σταθερότητα των συστατικών του κάθε ζωντανού οργανισμού (κυρίως των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών του οξέων).

Γενικά οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε τρεις κύριες ομάδες, με βάση την θερμοκρασιακή περιοχή που αναπτύσσονται: θερμόφιλοι (άνω των 50°C), μεσόφιλοι (30-40°C) και ψυχρόφιλοι (κάτω των 20°C). Επίσης υπάρχουν βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν σε περισσότερες από μία θερμοκρασιακές περιοχές (π.χ μεσόφιλη και θερμόφιλη).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή μεθανίου κατά την αναερόβια χώνευση οργανικού υλικού, έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Οι Fair και Moor (1932, 1934, 1937) και οι Maly και Fadrus (1971) αναφέρουν ότι ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου αυξάνει με τη θερμοκρασία (συγκεκριμένα η παραγωγή μεθανίου στους 25° C είναι κατά 25 % μικρότερη από αυτή που επιτυγχάνεται στους 60°C). Ακόμα με τη θερμόφιλη αναερόβια χώνευση επιτυγχάνονται αυξημένοι ρυθμοί αντιδράσεων και κατά συνέπεια μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης των οργανικών στερεών, καλύτερος διαχωρισμός

υγρής - στερεάς φάσεως και τέλος καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών. Οι υψηλές όμως ενεργειακές απαιτήσεις σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε τοξικές ενώσεις καθώς και με τη μειωμένη ευστάθεια καθιστούν την θερμόφιλη αναερόβια χώνευση οικονομικά ασύμφορη και δύσκολα εφαρμόσιμη (Buhr and Andrews, 1977).

Η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας αναερόβιων χωνευτήρων έχει απασχολήσει στο παρελθόν αρκετούς ερευνητές. Γενικά υπάρχουν αντικρουόμενα συμπεράσματα σχετικά με τους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε αναερόβιους χωνευτήρες συναρτήσει της θερμοκρασίας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά είδη μικροοργανισμών τα οποία επικρατούν σε κάθε αναερόβιο χωνευτήρα ανάλογα με το είδος του, τον υδραυλικό χρόνο παραμονής στερεών και την τροφοδοσία την οποία δέχεται.

Αυτό που είναι αξιοσημείωτο και πρέπει να προσεχθεί είναι οι απότομες θερμοκρασιακές μεταβολές, που μπορούν να αποβούν μοιραίες για τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.

3.4.2 pH

Στις περισσότερες περιπτώσεις η μετατροπή του οργανικού υλικού επιτυγχάνεται σε βέλτιστη περιοχή τιμών pH από 7.0 ~ 7.2. Πολλά όμως είδη βακτηρίων μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά σε pH μεταξύ 6 και 9. Δύο παράγοντες που επιδρούν τιμή του pH ενός χωνευτήρα είναι, η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFA) καθώς και η αλκαλικότητα (εκφράζεται ως mgCaCO₃). Η αλκαλικότητα οφείλεται κυρίως στα ιόντα HCO₃⁻ τα οποία προέρχονται από την παραγωγή CO₂ κατά την αποδόμηση οργανικών ενώσεων. Τα λιπαρά οξέα τα-οποία παράγονται κατά την οξεογένεση, τείνουν να χαμηλώσουν το pH του βιοαντιδραστήρα. Κάτω από ομαλές συνθήκες αυτή η μείωση του pH ρυθμίζεται από τα ιόντα HCO₃, καθώς και από την κατανάλωση των οξέων κατά τα στάδια της οξικογένεσης και μεθανογένεσης. Κάτω από αντίξοες συνθήκες (π. χ. παρεμπόδιση της μεθανογένεσης, απότομη αύξηση των λιπαρών οξέων) η ρυθμιστική ικανότητα του συστήματος μπορεί να ανατραπεί με

συνέπεια την πτώση του pH και την τελική αποτυχία της διεργασίας, σε περίπτωση που δεν υπάρξει έγκαιρη επέμβαση στο σύστημα. Μία μέθοδος για να διαφυλάσσεται η τιμή του pH μέσα στα όρια της επιθυμητής περιοχής είναι η αύξηση της αλκαλικότητας του συστήματος προσθέτοντας αμμωνία (NH₃), υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), ή ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) (Bitton, 1994). Αρκετοί ερευνητές, μεταξύ των οποίων οι Mueller (1959) και Pohland (1962) υπογράμμισαν την αναγκαιότητα μιας ισορροπίας μεταξύ της αλκαλικότητας και της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων.

3.4.3 Χημική σύσταση τροφοδοσίας

Η χημική σύσταση του υποστρώματος είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που διαμορφώνουν τα χαρακτηριστικά ενός αναερόβιου χώνευτήρα. Η φυσική επιλογή των μικροοργανισμών εξαρτάται από τα οργανικά και ανόργανα συστατικά του υποστρώματος και φυσικά οι μικροοργανισμοί εκείνοι που μπορούν να τα μεταβολίσουν υπερτερούν αριθμητικά και επικρατούν. Τα μεταβολικά προϊόντα που σχηματίζονται εμπλουτίζουν περαιτέρω την καλλιέργεια σε βακτήρια τα οποία οδηγούν τη διεργασία σε τελικά προϊόντα, όπως μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Κάποια συστατικά πολυσύνθετων υποστρωμάτων μπορεί να είναι μη βιοαποδομήσιμα, οπότε δεν έχουμε πλήρη απομάκρυνση του οργανικού υλικού. Η γνώση λοιπόν των χαρακτηριστικών του υποστρώματος είναι ουσιαστικής σημασίας για την κατανόηση της συμπεριφοράς ενός χώνευτήρα αλλά και για το σχεδιασμό διεργασιών αναερόβιας χώνευσης (Kotze, Thiel and Hattingh, 1969).

Για την ομαλή και προπαντός για τη βέλτιστη λειτουργία της αναερόβιας χώνευσης, τα βακτήρια εκτός από άνθρακα, χρειάζονται και άλλα στοιχεία προκειμένου να ικανοποιήσουν τις λειτουργικές τους ανάγκες. Τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για τα αναερόβια βακτήρια είναι ο σίδηρος, το κοβάλτιο, το μολυβδένιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το νάτριο, το βάριο, το σελήνιο και το νικέλιο. Συνήθως, οι παραπάνω -- θρεπτικές ουσίες υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις στα περισσότερα απόβλητα.

Κατά τον Sahm (1984), η προτιμώμενη C:N:P αναλογία για τα αναερόβια βακτήρια, είναι 700:5:1. Άλλοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η επαρκής αναλογία C:N είναι -

25~30: 1, ενώ οι Sanders και Bloodgood (1965) έκριναν απαραίτητη μία αναλογία C:N = 16: 1. Η εξισορρόπηση ενός αποβλήτου σε άζωτο μπορεί να γίνει με την προσθήκη είτε ουρίας (NH_2CONH_2), είτε ιόντων NH_4 , ενώ η εξισορρόπηση σε φώσφορο επιτυγχάνεται κυρίως με την προσθήκη ιόντων PO_4^{3-} .

3.4.4 Τοξικές ουσίες

Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα οι μεθανογόνοι, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αρκετές ουσίες. Η παρεμπόδιση των μεθανογόνων έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή μεθανίου και την αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών οξέων. Μεταξύ των ουσιών που παρεμποδίζουν ή και ακόμα σταματούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι οι εξής:

Οξυγόνο

Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι αυστηρά αναερόβιοι και συνεπώς επηρεάζονται αρνητικά ακόμα και από ίχνη οξυγόνου.

Αμμωνία

Η αμμωνία στη μη ιονισμένη μορφή της (NH_3), είναι πολύ τοξική για τα μεθανογόνα βακτήρια. Παρ' όλα αυτά μικρή τοξικότητα παρατηρείται σε ουδέτερα pH, (το ποσοστό μη ιονισμένης αμμωνίας είναι μεγαλύτερο σε υψηλότερο pH). Η αμμωνία αρχίζει να δρα παρεμποδιστικά για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς σε συγκεντρώσεις 1500 - 3000 mg/l και $\text{pH} > 7.4$, ενώ πάνω από 3000mg/l είναι τοξική για κάθε τιμή του pH.

Ανώτερα λιπαρά οξέα

Τα ανώτερα λιπαρά οξέα (π.χ. λαυρικό, μυριστικό, ολεϊκό κ.λ.π.) παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα των οξικοχρηστικών μεθανογόνων βακτηρίων. Οι Hanaki *et al.*, (1981) διεξήγαγαν κινητικά πειράματα διαλείποντος έργου με εγκλιματισμένη σε πλήρες γάλα αναερόβια καλλιέργεια και με υπόστρωμα μίγμα ανώτερων λιπαρών οξέων. Παρατήρησαν ότι έπειτα από την προσθήκη της τροφοδοσίας αναστελλόταν για λίγες

ώρες η παραγωγή μεθανίου από οξικό οξύ και μειωνόταν ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου από υδρογόνο, ενώ δεν επηρεαζόταν ο ρυθμός αποδόμησης της γλυκόζης.

Βαρέα μέταλλα

Τα βαρέ αμέταλλα (π.χ. Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+}) που βρίσκονται σε βιομηχανικά κυρίως απόβλητα, είναι παρεμποδιστικά για την αναερόβια χώνευση. Η ακολουθία των βαρέων μετάλλων ως προς την έκταση της παρεμπόδισης που προκαλούν είναι η εξής: $\text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Pb}$. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων μειώνεται όταν ακολουθεί αντίδραση με το υδρόθειο (H_2S) η οποία οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων θειούχων ιζημάτων. Παρ' όλα αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ορισμένα βαρέα μέταλλα (π.χ. Ni , Co και Mo) είναι απαραίτητα σε ίχνη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες

Οι χλωριωμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες είναι τοξικοί για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Ειδικά το χλωροφόρμιο (CHCl_3) είναι πολύ τοξικό και οδηγεί σε πλήρη παρεμπόδιση του μεταβολισμού των μεθανογόνων βακτηρίων όταν η συγκέντρωσή του υπερβεί το 1 mg/l .

Αρωματικές ενώσεις

Καθαρές καλλιέργειες μεθανογόνων (π.χ. *Methanotrix concilii*, *Methanobacterium espanolae*, *Methanobactenum bryantii*) παρεμποδίζονται από (π.χ. βενζόλιο, τολουόλιο, φαινόλες). Η σχετική τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων για τη μεθανογένεση έχει ως εξής: νιτροφαινόλες > χλωροφαινόλες > υδροξυφαινόλες.

Φορμαλδεύδη

Τα μεθανοβακτήρια παρεμποδίζονται σημαντικά όταν εκτείνονται σε συγκέντρωση φορμαλδεύδης (HCHO) της τάξεως των 100 mg/l . Παρ' όλα αυτά η λειτουργία τους αποκαθίσταται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φορμαλδεύδης.

Θειούχα και θειικά ανιόντα (HS^- , HS^{2-} , SO_4^{2-})

Το υδρόθειο (H_2S) και γενικότερα τα θειούχα ανιόντα (HS^- , S^{2-}) είναι από τους πιο ισχυρούς παρεμποδιστές της αναερόβιας χώνευσης. Επειδή η διάχυση μέσα από την κυτταρική μεμβράνη είναι πιο γρήγορη για τα αδιάστατα μόρια απ' ό,τι για τα ιονισμένα, η τοξικότητα του υδροθείου εξαρτάται από το pH. Το υδρόθειο είναι τοξικό για τα μεθανογόνα βακτήρια όταν η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη από 150 - 200 mg/l. Τα οξειογόνα βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στο υδρόθειο (H_2S) απ' ό,τι τα μεθανογόνα.

3.4.5 Οργανική φόρτιση και υδραυλικός χρόνος παραμονής αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας

Ο ρυθμός με τον οποίο το οργανικό υλικό παρέχεται σε ένα αναερόβιο χωνευτήρα, έχει καθοριστική σημασία όσον αφορά την διασφάλιση της σταθερότητας στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης. Επιβολή μεγάλων ρυθμών παροχής οργανικού υλικού μπορεί να επιφέρει συσσώρευση πτητικών λιπαρών οξέων και αποτυχία του συστήματος επεξεργασίας.

Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) ενός χωνευτήρα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να επιτρέπει στα αναερόβια βακτήρια να ολοκληρώσουν μεταβολισμό τους και να πολλαπλασιαστούν. Συνεπώς η τιμή του εξαρτάται κυρίως από τα επιμέρους χαρακτηριστικά του αποβλήτου και από τον τύπο του χωνευτήρα (Bitton, 1994). Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι κατ' εξοχήν επηρεάζονται από τον υδραυλικό χρόνο παραμονής είναι τα μεθανογόνα και τα οξειογόνα βακτήρια

(Zhang and Noike, 1994). Σε γενικές γραμμές, τυπικές τιμές υδραυλικού χρόνου παραμονής για χωνευτήρες που η λειτουργία τους βασίζεται σε ανάπτυξη βακτηρίων προσκολλημένων σε κάποιο μέσο είναι 1-10 ημέρες.- Οι χωνευτήρες των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε ανάπτυξη αιωρούμενων βακτηρίων σε υγρό μέσο λειτουργούν σε μεγαλύτερους υδραυλικούς χρόνους παραμονής (10-60 ημέρες) (Bitton, 1994).

3.4.6 Εγκλιματισμός αναερόβιας βιομάζας

Πλήρως εγκλιματισμένη (ή προσαρμοσμένη) σε ένα υπόστρωμα, είτε αυτό είναι συνθετικό είτε πραγματικό απόβλητο, μπορεί να χαρακτηριστεί μία ετερογενής αναερόβια μικροβιακή καλλιέργεια η οποία έχει τροφοδοτηθεί με το συγκεκριμένο υπόστρωμα για διάστημα ίσο και μεγαλύτερο από δώδεκα (12) χρόνους παραμονής (Toerien *et al.*, 1967).

Οι Chynoweth και Mah (1971) επισήμαναν ότι ο εγκλιματισμός μιας ετερογενούς αναερόβιας καλλιέργειας οδηγεί σε φυσική επιλογή και τελικά σε επικράτηση πληθυσμού μικροοργανισμών διαφορετικού από αυτόν στην αρχική καλλιέργεια.

Οι Breure *et al.*, (1986a,b) μελέτησαν την οξεογένεση της γλυκόζης και της ζελατίνης στους 30°C και σε διάφορες τιμές pH σε αναερόβιους χημοστάτες ($D = 0.12h$) οι οποίοι ήταν προσαρμοσμένοι σε ζελατίνη και γλυκόζη αντίστοιχα αφού είχε προηγηθεί εμβολιασμός τους με ενεργό ιλύ από βιολογικό καθαρισμό. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στον εγκλιματισμένο σε γλυκόζη χημοστάτη, η αποδόμηση της ζελατίνης προχωρούσε μέχρι και 30%, ενώ στον εγκλιματισμένο σε ζελατίνη χημοστάτη η αποδόμηση της γλυκόζης ήταν πλήρης.

Οι Sorensen *et al.*, (1991) ανέφεραν ότι θερμόφιλη αναερόβια λάσπη εγκλιματισμένη σε γαλακτικό οξύ αναπτύσσει μία σαφώς βελτιωμένη ικανότητα για αποδόμηση του σε σχέση με τη προσαρμοσμένη αναερόβια καλλιέργεια. Η εγκλιματισμένη καλλιέργεια προήλθε από χωνευτήρα ο οποίος επεξεργαζόταν λάσπη από πρωτοβάθμια καθίζηση, έπειτα από τροφοδότησή της με συνθετικό μέσο, πλούσιο σε γαλακτικό οξύ, για χρονικό διάστημα 181 ημερών και με υδραυλικό χρόνο παραμονής 13 ημέρες.

3.5 Συστήματα αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

3.5.1 Γενικά

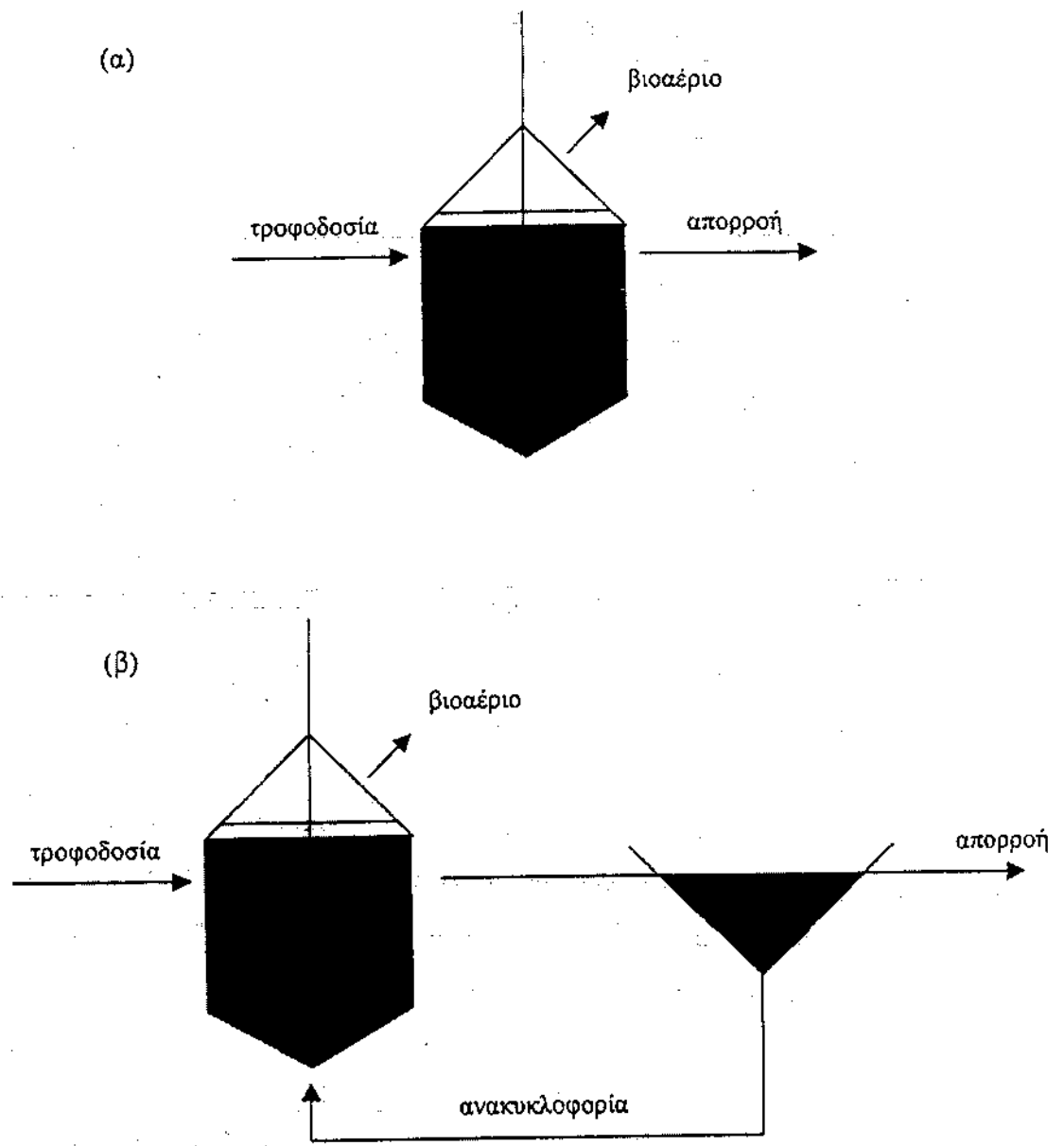
Η επιλογή των κατάλληλων διατάξεων και βιοαντιδραστήρων παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική λειτουργία της αναερόβιας διεργασίας. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διάφοροι τύποι χωνευτήρων και διατάξεων αναερόβιας επεξεργασίας βιολογικής λάσπης αλλά και αποβλήτων. Η τελική επιλογή του συστήματος με το οποίο θα γίνει η επεξεργασία ενός συγκεκριμένου αποβλήτου είναι συνάρτηση οικονομικών παραγόντων (κόστος κατασκευής και λειτουργίας) αλλά εξαρτάται κυρίως από τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου (οργανικό φορτίο, συγκέντρωση στερεών, παρουσία τοξικών ουσιών). Ο Lettinga (1995), προσδιόρισε τις εξής πέντε συνθήκες που πρέπει να πληρεί ένα αποδοτικό αναερόβια σύστημα:

- Υψηλή κατακράτιση βιομάζας στον αντιδραστήρα κατά την διάρκεια της λειτουργίας του.
- Μεγάλη (επαρκή) επαφή μεταξύ βιομάζας και υποστρώματος (αποβλήτου).
- Υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης και έλλειψη περιορισμών από φαινόμενα μεταφοράς.
- Ικανότητα εγκλιματισμού της βιομάζας σε διάφορους τύπους αποβλήτων.
- Επικράτηση ευνοικών περιβαλλοντικών παραγόντων για όλους τους μικροοργανισμούς στις διάφορες λειτουργικές συνθήκες.

Γενικά υπάρχουν δύο διαδεδομένοι τύποι αναερόβιων χωνευτήρων. Διακρίνουμε τους **συμβατικούς** και τους **ταχύρρυθμους** αναερόβιους χωνευτήρες.

3.5.2 Συμβατικές διατάξεις αναερόβιας χώνευσης

Οι συμβατικοί αναερόβιοι χωνευτήρες είναι από κατασκευαστική άποψη οι απλούστεροι τύποι βιοαντιδραστήρων. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται αιωρούμενοι μέσα στο υγρό μέσο και η ομοιογένεια της υγρής φάσης επιτυγχάνεται με μηχανική ανάδευση (Σχήμα 3.3α). Σε αυτά τα συστήματα ο χρόνος παραμονής στερεών (και κατά συνέπεια μικροοργανισμών) είναι ίδιος με τον υδραυλικό χρόνο παραμονής, οπότε δεν υπάρχει η δυνατότητα επιβολής υψηλών ρυθμών αραίωσης. Για να μην υπάρχει λοιπόν υψηλή απομάκρυνση βιομάζας από τον αντιδραστήρα, προτάθηκε σύστημα με ανακυκλοφορία αυτής (Σχήμα 3.3β).



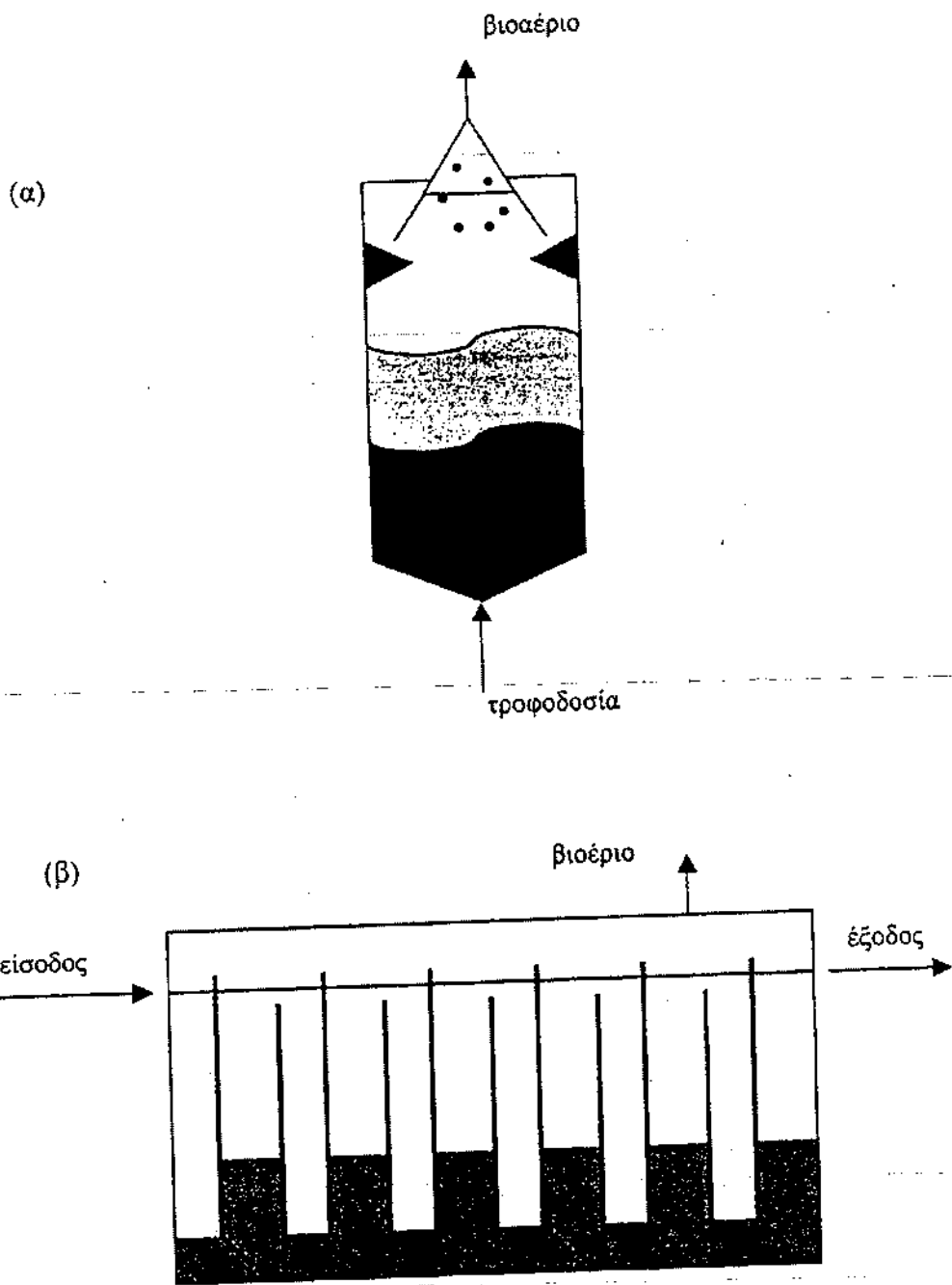
Σχήμα 3.3. Συμβατικός αναερόβιος χωνευτήρας (α) χωρίς ανακυκλοφορία και (β) με ανακυκλοφορία λάσπης.

3.5.3 Ταχύρυθμες διατάξεις αναερόβιας χώνευσης

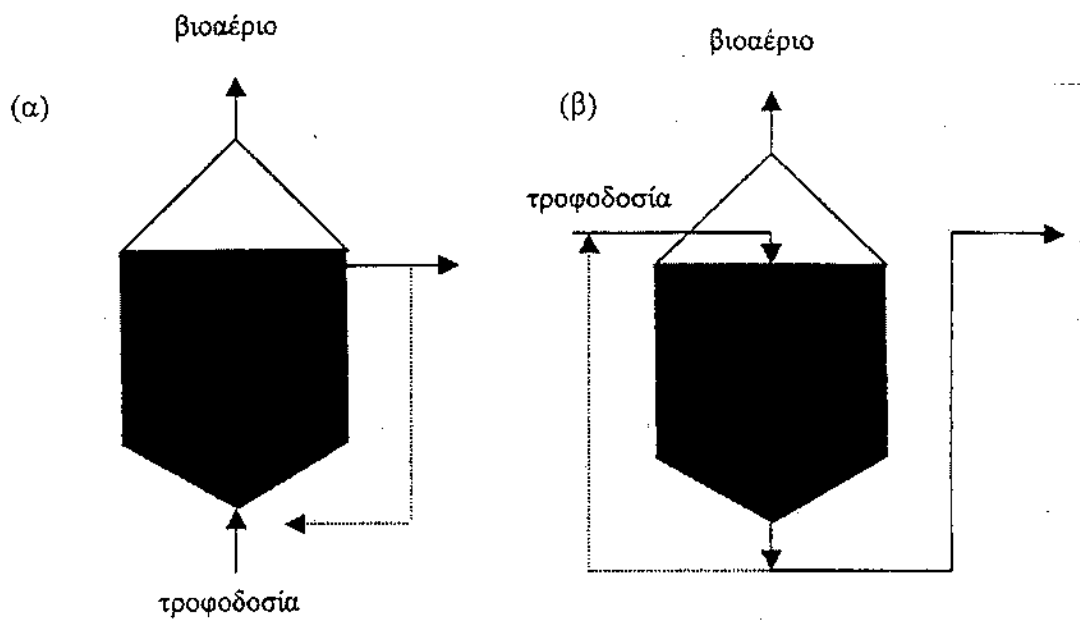
Οι χωνευτήρες ταχύρυθμης αναερόβιας επεξεργασίας επιτυγχάνουν υψηλό ρυθμό αποδόμησης υποστρώματος ανά μονάδα όγκου. Είναι εφοδιασμένοι με συστήματα κατακράτησης των αιωρούμενων στερεών, ανάδευσης και ανακυκλοφορίας λάσπης. Διακρίνουμε δύο τύπους ταχύρρυθμων αναερόβιων χωνευτήρων: χωνευτήρες, η λειτουργία των οποίων βασίζεται (α) στην ανάπτυξη αιωρούμενων σε υγρό μέσο μικροοργανισμών (υβριδικοί) και (β) στην ανάπτυξη προσκολλημένων σε στερεά επιφάνεια μικροοργανισμών. Αντιπροσωπευτικοί αντιδραστήρες του τύπου (α) είναι ο αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσα από κλίνη λάσπης (UASBR, Σχήμα 3.5α) και ο αντιδραστήρας εναλλασσόμενης καθοδικής και ανοδικής ροής (ABR, Σχήμα 3.5β) ενώ ταχύρρυθμα συστήματα του τύπου (β) είναι το αναερόβιο φίλτρο ανοδικής (Σχήμα 3.6α) και καθοδικής ροής (Σχήμα 3.6β) και η αναερόβια διάταξη ρευστοστερεάς κλίνης.

Σε μια μονάδα αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ένας χωνευτήρας είτε συνδυασμός δύο ή περισσότερων χωνευτήρων. Στη δεύτερη περίπτωση, ανάλογα με τη διάταξη που χρησιμοποιείται, διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες διεργασιών (Henze και Harremoës, 1983):

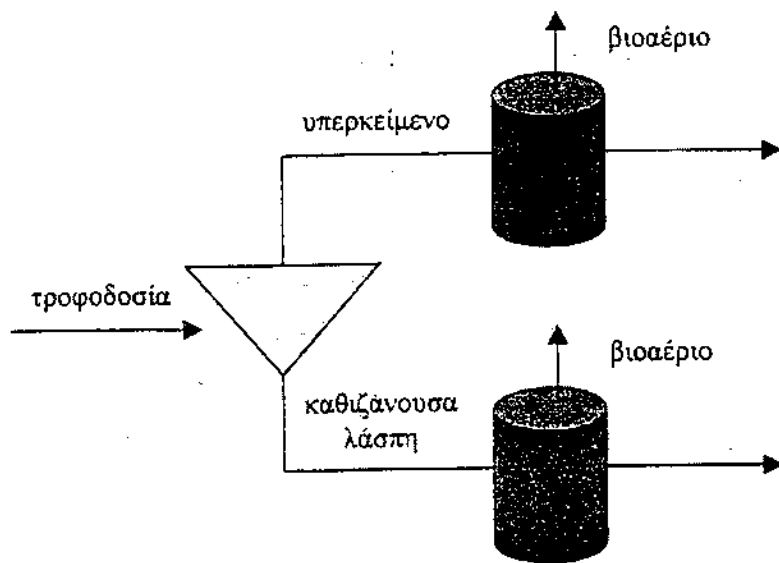
1. τις παράλληλες διεργασίες οι οποίες περιλαμβάνουν δύο ή και περισσότερους αναερόβιους χωνευτήρες οι οποίοι λειτουργούν εν παραλλήλω (Σχήμα 3.7)
2. τις διεργασίες δύο ή περισσότερων σταδίων οι οποίες περιλαμβάνουν δύο ή περισσότερους αναερόβιους χωνευτήρες αντιστοίχα, οι οποίοι είναι διατεταγμένοι σε σειρά (Σχήμα 3.8)
3. οι διεργασίες δύο φάσεων κατά τη διάρκεια των οποίων η οξεογένεση και η μεθανογένεση συντελούνται σε δύο χωριστούς αντιδραστήρες (Σχήμα 3.9). Σε γενικές γραμμές οι διεργασίες δύο φάσεων μειώνουν τον απαιτούμενο συνολικό όγκο αντίδρασης και επιδέχονται καλύτερο έλεγχο.



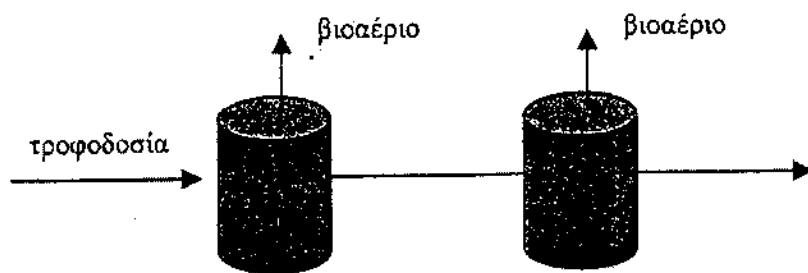
Σχήμα 3.5. (α) Αναερόβιος αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσω στρώματος ιλύος και (β) Αναερόβιος αντιδραστήρας με ανακλαστήρες.



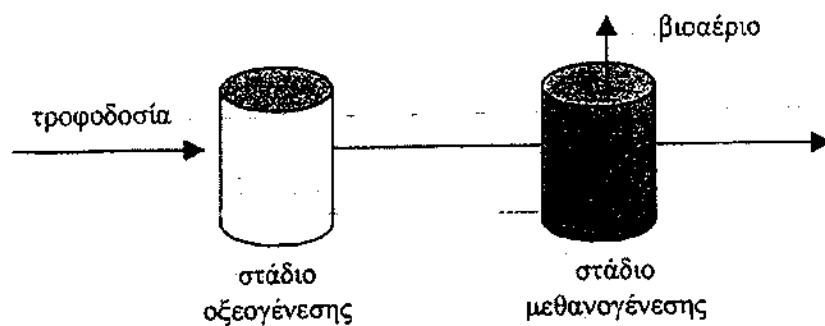
Σχήμα 3.6. Αναερόβια φίλτρα (α) ανοδικής ροής και (β) καθοδικής ροής.



Σχήμα 3.7. Παράλληλη διεργασία αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων.



Σχήμα 3.8. Διεργασία δυο σταδίων.



Σχήμα 3.9. Διεργασία δυο φάσεων.

Πίνακας 3.4. Χαρακτηριστικά αναερόβιων χωνευτήρων σε μόνιμη κατάσταση

Μόνιμη κατάσταση	Ημέρα χαρακτηρισμού	Αναερόβιος χωνευτήρας	Τύπος λειτουργίας	Ωφέλιμος όγκος	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	δΧΑΟ τροφοδοσίας (g/l)	Οργανική φόρτιση (gΧΑΟ/l)
MK1	250	X1	Εκκένωσης - πλήρωσης	10	50	16.5	0.34
MK2	632	X1	Εκκένωσης - πλήρωσης	10	50	23.5	0.47
MK3	477	X2	Εκκένωσης - πλήρωσης	4	25	23.5	0.96
MK4	570	X2	Εκκένωσης - πλήρωσης	4	50	23.5	0.47
MK5	632	X3	Συνεχούς ανάδευσης	4	50	23.5	0.47

Μόνιμη κατάσταση	pH	δΧΑΟ απορροής	Ποσοστό βιοαποδόμησης (%)	ΟΑΣ	ΠΑΣ	Συγκέντρωση πολυφαινολών Τροφοδοσία (g/l)	Απορροή (g/l)
MK1	7.15	9.6	41.8	7.420	6.481	1.38	1.23
MK2	6.95	14.7	37.5	8.733	7.368	1.11	0.98
MK3	6.90	17.0	27.7	-	-	1.11	-
MK4	7.05	14.7	37.5	6.805	5.692	1.11	0.98
MK5	6.99	14.7	37.5	4.665	3.665	1.11	0.99

Μόνιμη κατάσταση	Οξικό οξύ (g/l)	Προπιονικό οξύ (g/l)	Βουτυρικό οξύ (g/l)	Βιοαέριο		CH ₄	Σύσταση βιοαερίου (%)	
				Πρίν (ml/lxd)	Μετά (ml/lxd)		CO ₂	CO
MK1	3.00	0.80	0.71	93	-	54.6	31.1	14.3
MK2	4.55	0.99	0.67	50	30	51.5	45.3	3.2
MK3	-	-	-	-	-	-	-	-
MK4	4.87	0.99	0.87	45	-	52.0	41.5	6.5
MK5	3.55	0.83	0.79	70	28	52.8	27.4	19.8

ΟΑΣ: ολικά αιωρούμενα στερεά, ΠΑΣ: πτητικά αιωρούμενα στερεά, δΧΑΟ: διαλυτικό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, (1)&(3) πριν την προσθήκη των ιχνοστοιχείων νικελίου και κοβαλτίου, (2) μετά την προσθήκη των ιχνοστοιχείων νικελίου και κοβαλτίου.

Πίνακας 3.5. Χαρακτηριστικά υγρού αποβλήτου βρώσιμων ελιών (νέα παραλαβή)

Χαρακτηριστικά	Τιμή
pH	12.6
ΟΑΣ, mg/l	3035
ΠΑΣ, mg/l	2210
Διαλυτικό ΧΑΟ, mg/l	23500
Πολυφαινόλες, mg/l	1110
Οργανικό άζωτο, mg/l	750
Ολικός φώσφορος, mg/l	41.5
Πτητικά λιπαρά οξέα, mg/l	391
Οξικό οξύ, mg/l	376
Προπονιονικό οξύ, mg/l	24
Ισοβουτυρικό οξύ, mg/l	<5
Βουτυρικό οξύ, mg/l	<5
Ισοβαλερικό οξύ, mg/l	<5
Βαλερικό, mg/l	<5

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά, ΠΑΣ: πτητικά αιωρούμενα στερεά,

ΧΑΟ: χημικά απαιτούμενα οξυγόνο

3.6 Αποτελέσματα της αναερόβιας χώνευσης του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της αναερόβιας χώνευσης του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς προκύπτουν τα εξής: αυξάνοντας την οργανική φόρτιση στην είσοδο του 10-λιτρου χωνευτήρα (XI) κατά 27.7% (από 0.34g/l σε 0.47g/l) μετρήθηκε μικρή πτώση στο βιοαποδομήσιμο οργανικό υλικό (από 41.8% σε 37.5%). Επίσης παρατηρήθηκε μείωση του παραγόμενου βιοαερίου (από 93ml/lxd σε 50ml/lxd), που αποδόθηκε στη σταδιακή αύξηση της βιομάζας στον αντιδραστήρα (στην οποία συμπεριλαμβάνονταν και νεκρά κύτταρα). Η αύξηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα, μεγαλύτερο μέρος από το αποδομήσιμο οργανικό υλικό να καταναλώνεται για συντήρηση (maintenance) των μικροοργανισμών και λιγότερο να πηγαίνει προς παραγωγή βιοαερίου.

Ένα άλλο επίσης στοιχείο στο οποίο μπορεί να αποδοθεί η χαμηλή παραγωγή βιοαερίου, προκύπτει από την μεγαλύτερη συσσώρευση οξικού οξέος (4.55g/l-MK 2 έναντι 3.00g/l-MK1) όπου κάνει εμφανή την ύπαρξη παρεμπόδισης κυρίως για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Τόσο η παρεμπόδιση από κάποια ένωση του αρχικού αποβλήτου όσο και η παρεμπόδιση που μπορεί να προκαλείται από την συσσώρευση (με το πέρασμα του χρόνου) κάποιου ενδιάμεσου μεταβολικού προϊόντος, είναι ικανά να περιορίζουν σημαντικά την παραγωγή βιοαερίου. Το παραγόμενό βιοαέριο και στις δύο μόνιμες καταστάσεις (MK 1 & MK 2) του 10-λιτρου χωνευτήρα είχε υψηλή περιεκτικότητα σε μεθάνιο (Cti) που έφτασε το 54.6% και 51.5%, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τους δύο τύπους αναερόβιας λειτουργίας («εκκένωσης-πλήρωσης» και «συνεχούς ανάδευσης») και όσον αφορά την επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, προκύπτει ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στην βιοαποδόμηση του οργανικού υλικού. Η διαφορά που υπάρχει είναι ότι συνεχής ανάδευση οδηγεί σε πιό «σταθερό» σύστημα επεξεργασίας αφού λειτουργεί με λιγότερη βιομάζα (3.665g/l) σε σχέση με τη λειτουργία τύπου «εκκένωσης- πλήρωσης» (5.692g/l), ενώ αποδομεί το ίδιο οργανικό υλικό. Επίσης παρουσιάζει μεγαλύτερη παραγωγή βιοαερίου (70ml/lxd), έναντι (45ml/lxd) του χωνευτήρα εκκένωσης - πλήρωσης»

Μία ακόμα διαφοροποίηση μεταξύ των δύο τύπων λειτουργίας είναι ότι η σύσταση του βιοαερίου σε μεθάνιο φτάνει το 52.0% για τον χωνευτήρα «εκκένωσης πλήρωσης» και 52.8% για τον χωνευτήρα συνεχούς ανάδευσης, αλλά ένα μεγάλο μέρος μονοξειδίου του άνθρακα (19.8%) του βιοαερίου στον χωνευτήρα συνεχούς ανάδευσης δεν μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα, το ποσοστό του οποίου στον χωνευτήρα «εκκένωσης-πλήρωσης» ανέρχεται σε 41.5% του βιοαερίου.

Η αναερόβια χώνευση είναι μια ιδιαίτερη ευαίσθητη διεργασία και πρέπει να είμαστε προσεχτικοί ώστε να μην γίνονται απότομες επεμβάσεις. Αυτό αποδείχτηκε και με την απότομη αύξηση της οργανικής φόρτισης (από 0.47g/l σε 0.96g/l) στον 4-λιτρο χωνευτήρα (X2), όπου το ΧΑΟ της απορροής επέδειξε ισχυρά ανοδική τάση (17g/l, πίνακας 3.4) επιφέροντας μείωση στην απόδοση του συστήματος (27.7%).

Πίνακας 3.6. Χαρακτηριστικά αναερόβιων χωνευτήρων X1&X3 σε μόνιμη κατάσταση μετά την περίοδο εμπλουτισμού

Μόνιμη κατάσταση	Ημέρα χαρακτηρισμού	Αναερόβιος χωνευτήρας	Τύπος λειτουργίας	Ωφέλιμος όγκος (l)	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	δΧΑΟ τροφοδοσίας (g/l)	Οργανική φόρτιση (gΧΑΟ/l)
MK6	799	X1	Εκκένωσης - πλήρωσης	10	50	23.5	0.47
MK7	799	X3	Συνεχούς ανάδευσης	4	50	23.5	0.47

Μόνιμη κατάσταση	pH	δΧΑΟ απορροής	Ποσοστό βιοαποδόμησης (%)	ΟΑΣ	ΠΑΣ	Συγκέντρωση πολυφαινολών Τροφοδοσία (g/l)	Απορροή (g/l)
MK6	6.99	12.0	48.9	9.090	7.432	1.11	0.97
MK7	6.89	13.5	42.7	5.080	3.930	1.11	0.99

Μόνιμη κατάσταση	Οξικό οξύ (g/l)	Προπιονικό οξύ (g/l)	Βουτυρικό οξύ (g/l)	Βιοαέριο (ml/lxd)	CH ₄	CO ₂	CO
					Σύσταση βιοαερίου (%)		
MK6	1.87	0.86	0.35	80	59.8	37.4	2.8
MK7	2.92	0.72	0.66	40	60.0	23.5	16.5

ΟΑΣ: ολικά αιωρούμενα στερεά, ΠΑΣ: πτητικά αιωρούμενα στερεά, δΧΑΟ: διαλυτικό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο.

Η αναερόβια χώνευση του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, ελάχιστα επέδρασε στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, καθώς αυτή δεν ξεπέρασε το 12.6% και 10.5 % για τους χωνευτήρες «εκκένωσης-πλήρωσης» και συνεχούς ανάδευσης, αντίστοιχα. Η παρουσία των φαινολικών ενώσεων έχει έντονα συσχετιστεί με φαινόμενα παρεμπόδισης στους αναερόβιους μικροοργανισμούς (κυρίως στους μεθανογόνους) για διάφορα είδη αποβλήτων (π.χ. υγρά απόβλητα ελαιουργείων, κ.α) ακόμα και όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Κάτι όμως ανάλογο δεν έχει διαπιστωθεί για το απόβλητο της βρώσιμης ελιάς το οποίο περιέχει σημαντική ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Η επίδραση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς στην αναερόβια χώνευση, αποτελεί ένα σημαντικό θέμα και ερευνήθηκε αναλυτικά στη συνέχεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η προσθήκη των ιχνοστοιχείων κοβαλτίου και νικελίου οδήγησαν σε σημαντική μείωση του παραγόμενου βιοαερίου από 50ml/lxd σε 30ml/lxd για τον χωνευτήρα (XI) (τύπου «εκκένωσης-πλήρωσης») και από 70ml/lxd σε 28ml/lxd για τον χωνευτήρα συνεχούς ανάδευσης (X3). Ο εμπλουτισμός που ακολούθησε οδήγησε σε βελτιστοποίηση του χωνευτήρα (XI) αυξάνοντας το παραγόμενο βιοαέριο σε 80ml/lxd (Πίνακας 3.6) ενώ αυξήθηκε και η σύσταση του παραγόμενου βιοαερίου σε μεθάνιο (59.8%). Ο εμπλουτισμός με νέα ενεργή αναερόβια βιομάζα συνέβαλε επίσης σε μεγαλύτερη αποδόμηση οργανικού υλικού (ΧΑΟ απορροής 12.0g/l, απόδοση 48.9%).

Ωστόσο ο εμπλουτισμός δεν βελτίωσε εξίσου την απόδοση χωνευτήρα (X3). Η παραγωγή βιοαερίου αυξήθηκε από 28ml/lxd σε 40ml/lxd (Πίνακας 4.6) καθώς και η περιεκτικότητα αυτού σε μεθάνιο (60.0%). Η αποδόμηση του οργανικού υλικού αυξήθηκε, αφού η συγκέντρωση του ΧΑΟ της απορροής μειώθηκε από 14.7g/l σε 13.5g/l.

Ακόμα και μετά τον εμπλουτισμό, κανένα από τα συστήματα δεν επέδειξε κάποια διαφορετική συμπεριφορά, όσο αφορά την αποδόμηση των φαινολικών η οποία παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, αφού δεν ξεπέρασε το 12.6%.

Πρέπει να σημειώσουμε ότι όλα τα παραπάνω αποτελέσματα βασίζονται στην συμπεριφορά που επιδεικνύουν τα αναερόβια συστήματα όταν βρίσκονται σε μόνιμες

καταστάσεις όπου και γινόταν πλήρης χαρακτηρισμός τους.

3.7 Συμπεράσματα και προτάσεις

Η αναερόβια χώνευση του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς είναι μία σχετικά αποδοτική διεργασία που οδήγησε σε απομάκρυνση οργανικού υλικού κατά 48.9% στο σύστημα «εικένωσης-πλήρωσης» και κατά 42.7% στο σύστημα συνεχούς ανάδευσης.

Η χαμηλή παραγωγή βιοαερίου καθ' όλη την διάρκεια λειτουργίας των χωνευτήρων, σε συνδυασμό με την υψηλή συσσώρευση οξικού οξέος και την περιορισμένη μείωση του οργανικού φορτίου προβάλλουν σοβαρές ενδείξεις για την ύπαρξη παρεμποδιστικού παράγοντα στα στάδια τόσο της οξογένεσης, όσο και της μεθανογένεσης. Ο προσδιορισμός αυτού του παρεμποδιστικού παράγοντα αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα προς μελέτη, για την βελτιστοποίηση της αναερόβιας

επεξεργασίας του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, η απομάκρυνση του οποίου είναι πιθανόν να οδηγήσει σε ακόμα μεγαλύτερη απόδοση της διεργασίας αυξάνοντας ταυτόχρονα την παραγωγή βιοαερίου.

Η αναερόβια χώνευση επιδέχεται βελτίωση και από πλευράς μείωσης του υδραυλικού χρόνου παραμονής. Ο χρόνος παραμονής των 50 ημερών με τον οποίο λειτούργησαν οι αναερόβιοι χωνευτήρες είναι μεγάλος και αποτελεί μειονέκτημα της διεργασίας όταν πρόκειται να εφαρμοστεί για την επεξεργασία μεγάλων όγκων αποβλήτου. Είναι χρήσιμο να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της αναερόβιας διεργασίας σε μικρότερους χρόνους παραμονής, αυξάνοντας σταδιακά (και όχι απότομα) την οργανική φόρτιση στην είσοδο των χωνευτήρων, ώστε να μη προκληθεί «στρεσάρισμα» των μικροοργανισμών και οδηγηθούμε σε αστοχία των συστημάτων.

Η αποτελεσματικότητα της αναερόβιας χώνευσης και σε άλλους τύπους αναερόβιων διατάξεων πρέπει επίσης να μελετηθεί. Το απόβλητο της βρώσιμης ελιάς έχει μικρή συγκέντρωση στερεών και συνεπώς η επεξεργασία του σε έναν αντιδραστήρα UASBR (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor), που συνίσταται για την επεξεργασία

αποβλήτων με χαμηλή συγκέντρωση στερεών, είναι πιθανόν να οδηγήσει σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα, ιδιαίτερα όσο αφορά τον απαιτούμενο χρόνο παραμονής.

Επίσης η αναερόβια χώνευση του αποβλήτου στην θερμόφιλη περιοχή (-55°C) όπου ενδείκνυται για υψηλές οργανικές φορτίσεις, πιθανόν να αποτελέσει μια πιο αποδοτική διεργασία. Ακόμα, η αναερόβια συγχώνευση του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς μαζί με άλλου τύπου αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, είναι πιθανόν να οδηγήσει σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά τη μείωση του οργανικού ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου, που θα συνοδεύεται από μεγαλύτερη παραγωγή βιοαερίου και θα λειτουργεί σε μικρότερους χρόνους παραμονής.

Ο συνδυασμός της αναερόβιας χώνευσης με άλλες βιολογικές διεργασίες αποτελεί, τέλος, μία ενδιαφέρουσα αντιμετώπιση, που μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική συνολική διαχείριση του συγκεκριμένου τύπου αποβλήτου και η περίπτωση αυτή εξετάζεται στην συνέχεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

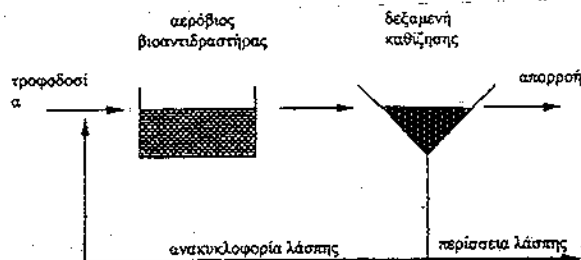
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΩΝ ΒΡΩΣΙΜΩΝ ΕΛΙΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

4.1 Γενικά

Ο σκοπός του συστήματος ενεργού ιλύος (activated sludge) είναι η απομάκρυνση των οργανικών ουσιών που περιέχονται στα απόβλητα μέσω βιοχημικών διαδικασιών. Οι κύριες συνιστώσες ενός συστήματος ενεργού ιλύος είναι: α) ο βιολογικός αντιδραστήρας και β) η δεξαμενή καθίζησης (Σχήμα 5.1). Ο βιολογικός αντιδραστήρας είναι η δεξαμενή αερισμού στην οποία αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί και καταναλώνουν τα συστατικά του αποβλήτου (οργανικές ουσίες, αμμωνία, κ.α), ενώ στην δεξαμενή καθίζησης λαμβάνει μέρος ο διαχωρισμός των μικροοργανισμών από τα υγρά απόβλητα. Τα απόβλητα εισέρχονται στην δεξαμενή αερισμού όπου οξειδώνονται από τους μικροοργανισμούς, ενώ το απαραίτητο οξυγόνο παρέχεται με διαχυτήρες ή με επιφανειακούς αεριστήρες. Η παροχή αερισμού εξασφαλίζει και καλή ανάδευση του υγρού μέσου (mixed liquor).

Ένα σύστημα ενεργού ιλύος μπορεί να περιλαμβάνει και άλλους βιοαντιδραστήρες, όπως Π.χ ανοξικές δεξαμενές για βιολογική απομάκρυνση αζώτου (απονιτροποίηση), αναερόβιες δεξαμενές για βιολογική απομάκρυνση φωσφόρου, δεξαμενές (επιλογείς) όπου δημιουργούνται συνθήκες ώστε να επικρατούν συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών (π.χ αποφυγή ανάπτυξης νηματοειδών βακτηρίων και ευνοϊκές συνθήκες για ανάπτυξη βακτηρίων που σχηματίζουν κροκίδες).



Σχήμα 4.1. Σύστημα επεξεργασίας ενεργού ιλύος.

4.2 Μικροβιολογία συστήματος ενεργού ιλύος

Ο βιοαντιδραστήρας ενεργού ιλύος περιέχει ένα αιώρημα ενεργού βιομάζας (ενεργού ιλύος) από συσσωματωμένες κροκίδες από μικροοργανισμούς (κυρίως από ετερότροφα βακτήρια), νερό, αδρανή στερεά (που δεν συμμετέχουν στις βιολογικές διεργασίες), βιοαποδομήσιμα και μη, διαλυμένα, αιωρούμενα και κολλοειδή συστατικά. Οι βιολογικές κροκίδες που περιέχουν τους παραχθέντες μικροοργανισμούς καθίζανουν σε δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης και εν' μέρει ανακυκλώνονται, ενώ το υπόλοιπο της ιλύος απομακρύνεται για να αποφευχθεί συσσώρευση βιομάζας. Η ανακύκλωση επιτρέπει την διατήρηση μεγάλου χρόνου παραμονής των στερεών (solid retention time) σε σχέση με τον υδραυλικό χρόνο παραμονής.

Τα σημαντικότερα είδη βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα σύστημα ενεργού ιλύος είναι τα εξής: *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alkaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus* και τα νιτροποιητικά βακτήρια *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*. Εκτός από τα παραπάνω υπάρχουν και πολλά άλλα είδη μικροοργανισμών που συναντώνται λιγότερο συχνά σε συστήματα ενεργού ιλύος, όπως τα θειοβακτήρια (*Beggiatoa*, *Thiotrix*), καθώς και τα νηματοειδή (*Sphaerotilus*, *Microthrix*, *Nostocoiba*). Στην ενεργή βιομάζα υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως φύκη, μύκητες και πρωτόζωα.

Το είδος των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν περισσότερο από τους υπόλοιπους και θα επικρατήσουν κατά τις βιολογικές διεργασίες στο εσωτερικό ενός βιοαντιδραστήρα ενεργού ιλύος, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων, τις συνθήκες που επικρατούν στον αντιδραστήρα (π.χ αερόβιες, αναερόβιες ή ανοξικές), τις παραμέτρους σχεδιασμού και τα χαρακτηριστικά λειτουργίας του συστήματος ενεργού ιλύος.

Για την ανάπτυξη τους οι μικροοργανισμοί χρειάζονται:

α) Πηγή άνθρακα για σύνθεση νέων κυττάρων. Οι πιο συνηθισμένες πηγές άνθρακα είναι οι οργανικές ενώσεις των αποβλήτων (ετερότροφοι μικροοργανισμοί) ή το διοξείδιο του άνθρακα (αυτότροφοι μικροοργανισμοί).

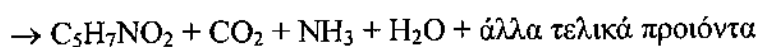
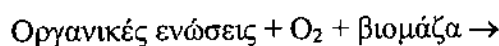
β) Πηγή ενέργειας για τη σύνθεση νέων κυττάρων. Αυτή μπορεί να προέρχεται από μια χημική αντίδραση οξείδωσης (χημοτροφικοί μικροοργανισμοί) ή και το φως (φωτοτροφικοί μικροοργανισμοί).

γ) Θρεπτικά συστατικά για τη σύνθεση των κυττάρων τους, όπως C, O, H, N, P, S ή σε μικρές ποσότητες Fe, Ca., Mg, K, Mo, Co, κ.α. Οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύουν στη μάζα τους ενώσεις πλούσιες σε ενέργεια, άνθρακα και θρεπτικά συστατικά, τα οποία και χρησιμοποιούν σε περιόδους που αυτό ευνοείται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ή και για να επιζήσουν σε περιόδους ανεπάρκειας των συστατικών αυτών.

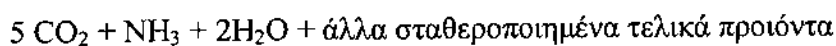
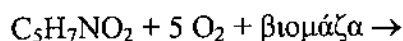
δ) Παρουσία οξυγόνου που έχει το ρόλο του αποδέκτη ηλεκτρονίων.

4.3 Οξείδωση οργανικών ενώσεων σε σύστημα ενεργού ιλύος

Τα αερόβια-χημοτροφικά, -ετεροτροφικά- βακτήρια αναπτύσσονται στην δεξαμενή αερισμού σε συνθήκες επάρκειας πηγής άνθρακα και θρεπτικών συστατικών. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις των αποβλήτων για τη σύνθεση νέων κυττάρων ($C_5H_7NO_2$), λαμβάνοντας την απαιτούμενη ενέργεια από την οξείδωση των οργανικών ενώσεων του άνθρακα σύμφωνα με την αντίδραση:



Σε περιόδους όπου υπάρχει ανεπάρκεια διαθέσιμων οργανικών ενώσεων, οι μικροοργανισμοί οξειδώνουν τα κύτταρά τους (ενδογενής μεταβολισμός) για να εξασφαλίσουν την απαραίτητη ενέργεια για να επιζήσουν, σύμφωνα με την αντίδραση:



Από την τελευταία αντίδραση υπολογίζεται ότι για την οξείδωση 1 g κυττάρου (ως $C_5H_7NO_2$) απαιτούνται $(5 \times 32)/113 = 1.42$ g O_2 .

4.4 Ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών

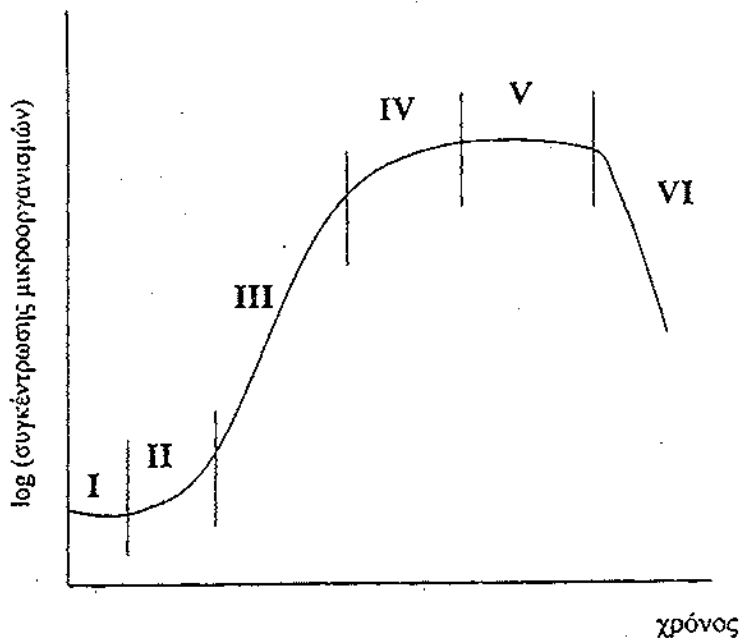
Σε ένα σύστημα ενεργού ιλύος, ο ειδικός ρυθμός αύξησης της βιομάζας (μ_B) από την οξείδωση των ενώσεων του άνθρακα (υπόστρωμα, S) που περιέχονται στα απόβλητα μπορεί να εκφραστεί με απλή κινητική Monod, σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

$$\mu_B = \mu_{B,max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

όπου, ($\mu_{B,max}$) ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και (K_s) η σταθερά κορεσμού.

Εάν θεωρήσουμε ότι στην δεξαμενή αερισμού ενός συστήματος ενεργού ιλύος διοχετεύονται απόβλητα το οργανικό -περιεχόμενο των οποίων αποδομείται από τη δράση ενός είδους μικροοργανισμών, οι μικροοργανισμοί θα ακολουθήσουν διάφορες φάσεις ανάπτυξης οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2.

Οι φάσεις αυτές έχουν έως εξής: Κατ' αρχήν έχουμε τη φάση **καθυστέρησης** (I), κατά την οποία οι μικροοργανισμοί προετοιμάζονται για ανάπτυξη (εγκλιματίζονται) στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα στον οποίο εισέρχονται. Στη συνέχεια έχουμε τη φάση **επιτάχυνσης** (II) κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται με επιταχυνόμενο ρυθμό. Έπειτα έχουμε την φάση (III) της εκθετικής ανάπτυξης, στην οποία οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τις οργανικές ουσίες και αυξάνονται με γρήγορους ρυθμούς. Την φάση αυτή ακολουθεί η φάση (IV) κατά την οποία η παρουσία κάποιου παρεμποδιστή ή η εξάντληση του υποστρώματος προκαλούν **επιβράδυνση** της ανάπτυξης και ακολουθεί η φάση (V), κατά την οποία δεν έχουμε ανάπτυξη και η οποία ονομάζεται στάσιμη φάση. Τέλος έχουμε τη φάση (VI) η οποία ονομάζεται φάση **θανάτου ή αποδόμησης** γιατί κατά τη διάρκεια αυτής παρατηρείται "λύση" που οδηγεί σε μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων. Η κινητική κάθε φάσης είναι εν γένει διαφορετική. Στις περισσότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές παρατηρείται εκθετική ή επιβραδυνόμενη ανάπτυξη, γι' αυτό και μας ενδιαφέρει κυρίως η ανάπτυξη κινητικών μοντέλων που να περιγράφουν επαρκώς τη συμπεριφορά σε αυτές τις φάσεις.



Σχήμα 4.2. Καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης.

Στην πράξη η εισροή των αποβλήτων στην δεξαμενή αερισμού ενός συστήματος ενεργού ιλύος γίνεται με συνεχή ρυθμό, ενώ παράλληλα υπάρχουν πολυάριθμα είδη μικροοργανισμών για τα οποία μπορούν να κατασκευαστούν διαφορετικές καμπύλες ανάπτυξης. Για την ικανοποιητική όμως περιγραφή ενός συστήματος ενεργού ιλύος μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει μια αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάπτυξης και μια αντίστοιχη καμπύλη κατανάλωσης υποστρώματος για όλους τους μικροοργανισμούς που επικρατούν στο σύστημα και είναι αυτή που παρουσιάστηκε παραπάνω.

Οι κλίσεις των καμπυλών του σχήματος 4.2, αποτελούν τους ρυθμούς μεταβολής της βιομάζας. Ως μέτρο των μικροοργανισμών της βιομάζας χρησιμοποιείται το οργανικό μέρος (Volatile Suspended Solids) των ολικών αιωρούμενων στερεών (Total Suspended Solids), ενώ ως μέτρο των οργανικών ουσιών χρησιμοποιείται συνήθως το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο των πέντε ημερών (BODs).

4.5 Αερόβιες διατάξεις ενεργού ιλύος

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές του βασικού συστήματος ενεργού ιλύος (Λυμπεράτος, 1995) που κρίνονται πιο κατάλληλες ανάλογα με την κάθε περίπτωση. Έτσι διακρίνονται τα παρακάτω συστήματα:

(α) Συμβατικό σύστημα: Η δεξαμενή αερισμού είναι ουσιαστικά ένας αυλωτός αντιδραστήρας με αποτέλεσμα την αυξημένη οργανική φόρτιση στην είσοδο και χαμηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου.

(β) Σταδιακής μείωσης αερισμού: Πρόκειται για τροποποίηση του -συμβατικού συστήματος με τους διαχυτήρες αερισμού να είναι τοποθετημένοι πιο κοντά στην είσοδο αφού υπάρχει αυξημένη ζήτηση σε οξυγόνο.

(γ) Τέλεια αναμεμιγμένο σύστημα: Η μέγιστη δυνατή ομοιογένεια του υλικού επιτυγχάνεται με την τροφοδοσία και την ανακυκλοφορία να γίνονται σε διάφορα σημεία της δεξαμενής αερισμού.

(δ) Βηματικός αερισμός: Η τροφοδοσία μοιράζεται σε διάφορα σημεία της δεξαμενής αερισμού.

(ε) Τροποποιημένος αερισμός: Ο αερισμός δεν είναι συνεχής αλλά διακοπτόμενος και το σύστημα αυτό συνιστάται για μικρές οργανικές φορτίσεις αφού δεν επιτυγχάνει μεγάλη απομάκρυνση βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου.

(ς) Παρατεταμένος αερισμός: Γίνεται ουσιαστικά στην περιοχή ενδογενούς αναπνοής των μικροοργανισμών που επιτυγχάνει έτσι και σταθεροποίηση της ιλύος.

(η) Επαφή σταθεροποίηση: Τα εισερχόμενα απόβλητα έρχονται πρώτα σε επαφή με ενεργό ιλύ, η οποία αερίζεται σε δεξαμενή αερισμού πριν έρθει σε επαφή με τα απόβλητα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι η προσρόφηση των οργανικών είναι πολύ γρήγορη ενώ η οξείδωση χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερους χρόνους.

(θ) Ταχύρρυθμος αερισμός: Το σύστημα αυτό συνδυάζει υψηλή οργανική φόρτιση με μεγάλη πυκνότητα ιλύος. Ο αερισμός γίνεται με τουρμπίνες και οδηγεί σε υψηλή απομάκρυνση βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου.

(ι) Αερισμός με οξυγόνο: Η δεξαμενή αερισμού είναι καλυμμένη και παρέχεται καθαρό οξυγόνο (αντί για αέρα). Πρόκειται για ιδιαίτερα αποτελεσματικό σύστημα για μεγάλες διακυμάνσεις παροχής και οργανικής φόρτισης.

Για την επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς χρησιμοποιήθηκε ένα απλό εργαστηριακό σύστημα ενεργού Ιλύος, τύπου «εκκένωσης-πλήρωσης», το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

4.6 Αποτελέσματα και συμπεράσματα από την αερόβια επεξεργασία του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς

Από την επεξεργασία του υγρού αποβλήτου των βρώσιμων ελιών σε αερόβιο σύστημα τύπου ενεργού ιλύος, προέκυψαν πολύ σημαντικά συμπεράσματα για την αποτελεσματική διαχείριση του. Συγκεκριμένα η αερόβια διεργασία αποδείχτηκε μία ιδιαίτερα αποδοτική διεργασία όσον αφορά την αποδόμηση του οργανικού υλικού, που είναι η βασικότερη παράμετρος για την ασφαλή διάθεση του αποβλήτου σε υδάτινους αποδέκτες.

Η αερόβια επεξεργασία είναι πίο αποδοτική σε σχέση με την αναερόβια χώνευση, επιδεικνύοντας μείωση του οργανικού υλικού πάνω από 60%, λειτουργώντας σε μικρότερους χρόνους παραμονής και υψηλότερες οργανικές φορτίσεις. Στην αερόβια διεργασία η ενεργός βιομάζα λειτούργησε σε χρόνο παραμονής 10 ημερών, ενώ η οργανική φόρτιση που επιβαλλόταν στον αντιδραστήρα ήταν 2.61g/l (Πίνακας 4.2) και για απόβλητο με αρχικό διαλυτό ΧΑΟ 23.5g/l. Η απομάκρυνση του οργανικού υλικού σε αυτές τις συνθήκες ανήλθε σε 71.6%. Ο χρόνος παραμονής των 10 ημερών κρίνεται ικανοποιητικός μια και μόνο μικρή περαιτέρω βελτίωση μπορεί να επιτευχθεί με μεγαλύτερο χρόνο παραμονής.

Η αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου δεν φαίνεται να μειώνει την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, καθώς δεν παρατηρήθηκε μείωση σε καμία από τις μόνιμες καταστάσεις (Πίνακας 4.2) που περιήλθε το σύστημα κατά την διάρκεια της λειτουργίας του. Ακόμα και όταν το σύστημα λειτούργησε σε πολύ μεγάλο χρόνο παραμονής (αντιδραστήρας διαλείποντος έργου), οι αερόβιοι μικροοργανισμοί δεν κατάφεραν να μειώσουν το φαινολικό περιεχόμενο του αποβλήτου. Αντίθετα μετρήθηκε μία μικρή αύξηση της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών του αποβλήτου στην έξοδο του αντιδραστήρα, που σημαίνει ότι από την δράση των αερόβιων μικροοργανισμών βιομετατρέπονται ορισμένες φαινολικές δομές σε κάποιες άλλες, οι οποίες όταν αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu (κεφ. 2, § 2.2.14) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών, επιδεικνύουν μεγαλύτερη απορρόφηση στα 760nm, αποδίδοντας έτσι μεγαλύτερη τιμή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών.

Ένα ακόμα αποτέλεσμα που προέκυψε από την αερόβια επεξεργασία είναι ότι η υψηλή απομάκρυνση οργανικού υλικού δεν συνοδεύτηκε και με αποχρωματισμό του αποβλήτου. Η μέτρηση του αποχρωματισμού γινόταν από την μεταβολή της - απορρόφησης στα 525nm ενώ καμία σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε και για όλες τις μόνιμες καταστάσεις στις οποίες περιήλθε το σύστημα. Η αδυναμία αποχρωματισμού του αποβλήτου από την διεργασία αυτή, γινόταν αντιληπτή και μέσω οπτικής παρατήρησης.

Η αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς οδήγησε σε μείωση της φυτοτοξικής του δράσης. Πιο συγκεκριμένα από πειράματα φυτοτοξικότητας (κεφ. 2, § 2.2.10) που πραγματοποιήθηκαν τόσο στο απόβλητο της τροφοδοσίας όσο και στο απόβλητο της απορροής παρουσιάστηκε αύξηση του δείκτη βλαστικότητας κατά 19.8% για απόβλητο αραιωμένο στο 50%. Τα πειράματα φυτοτοξικότητας σε μη αραιωμένο απόβλητο, έδειξαν ότι αυτό παραμένει ισχυρά φυτοτοξικό (0% ολικός δείκτη βλαστικότητας) ακόμα και μετά το τέλος της αερόβιας επεξεργασίας. (Τα πειράματα φυτοτοξικότητας έγιναν για την τελευταία μόνιμη κατάσταση, **MK 5**, του συστήματος).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΗΣ ΒΡΩΣΙΜΗΣ ΕΛΙΑΣ

5.1. Εισαγωγή

Από την αναλυτική έρευνα της επίδρασης των τριών βασικών βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας, α) μύκητες «λευκής σήψης), β) αναερόβια χώνευση και γ) αερόβια επεξεργασία «ενεργού ιλύος), στο υγρό απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά, ποια από τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου και σε ποιο βαθμό, επηρεάζονται από την κάθε διεργασία. Αν και τρεις διεργασίες συνέβαλαν σημαντικά στη μείωση των τοξικών χαρακτηριστικών του αποβλήτου, ωστόσο καμία από αυτές δεν μπορεί να επιτύχει, αυτόνομα, πλήρη αποτοξικοποίηση του, που θα οδηγήσει σε ολοκληρωμένη και ασφαλή διάθεση του αποβλήτου σε φυσικούς αποδέκτες.

5.2 Αποτελέσματα και συμπεράσματα από την αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της απορροής του αναερόβιου χωνευτήρα

Από τη συνδυασμένη αναερόβια-αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, προέκυψαν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αποτελεσματική διαχείριση του αποβλήτου με την χρήση βιολογικών μεθόδων. Η αερόβια επεξεργασία, σε σύστημα ενεργού ιλύος, του αποβλήτου που έχει προηγουμένα υποστεί αναερόβια επεξεργασία, οδηγεί σε πολύ υψηλά ποσοστά αποδόμησης οργανικού-ρυπαντικού φορτίου. Το μικρό μη βιοαποδομήσιμο κλάσμα που απομένει μπορεί να αποδομηθεί από κάποια άλλη βιολογική διεργασία ή και σε περίπτωση που αυτό δεν είναι δυνατό και χρειαστεί να γίνει χημική οξείδωση αυτού του κλάσματος, ώστε το τελικό απόβλητο να πληρεί τους όρους για ασφαλή διάθεση, το απαιτούμενο κόστος δεν θα είναι μεγάλο.

Η αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας απορροής, είναι πιο αποδοτική από την αντίστοιχη επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου της βρώσιμης - ελιάς, καθώς είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αποδόμηση οργανικού υλικού, λειτουργώντας σε μικρότερους χρόνους παραμονής. Όταν το σύστημα

τροφοδοτήθηκε με απόβλητο από την αναερόβια απορροή, διαλυτού ΧΑΟ ~ 14.7 g/l έδωσε την ίδια απομάκρυνση οργανικού υλικού τόσο για υδραυλικό χρόνο παραμονής 5 όσο και 10 ημέρες. Βέβαια όταν ο αντιδραστήρας δεχόταν απόβλητο διαλυτού ΧΑΟ ~ 9.6 g/l δεν συμπεριφέρθηκε παρόμοια για χρόνους παραμονής 5 και 10 ημερών. Κατά την λειτουργία του σε χρόνο παραμονής 5 ημερών, επέδειξε τάση αύξησης του ΧΑΟ της απορροής, που πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη οργανική φόρτιση που επιβλήθηκε στο χωνευτήρα, την δεδομένη χρονική περίοδο, (αφού ο αντιδραστήρας προηγούμενα τροφοδοτούταν με λύματα βιολογικού καθαρισμού) και δημιούργησε συνθήκες "stressing" στους αερόβιους μικροοργανισμούς. Επίσης, αρκετά πιθανό είναι, εάν αφήναμε το σύστημα για περισσότερο χρονικό διάστημα υπό αυτές τις συνθήκες λειτουργίας, η απόδοση του συστήματος να βελτιωνόταν, αφού η αερόβια καλλιέργεια θα είχε προσαρμοστεί (εγκλιματιστεί) περισσότερο. Αυτό όμως δεν αποδείχτηκε αφού το σύστημα δεν παρέμεινε σε αυτή την κατάσταση για αρκετό διάστημα, αλλά στη συνέχεια μειώσαμε την οργανική φόρτιση στην είσοδο του αντιδραστήρα, διπλασιάζοντας το χρόνο παραμονής από 5 σε 10 ημέρες. Δεδομένου ότι η αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου παρουσιάζει μικρότερη απόδοση σε σχέση με την αντίστοιχη επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας απορροής, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αναερόβια χώνευση του αποβλήτου οδηγεί στη βιομετατροπή κάποιων ενώσεων σε κάποιες άλλες, οι οποίες αποδομούνται στη συνέχεια από τους αερόβιους μικροοργανισμούς και το οποίο δεν συμβαίνει στην απευθείας αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου.

Ένα ακόμα συμπέρασμα που προέκυψε από το συνδυασμό των δύο διεργασιών, είναι ότι το απόβλητο που προέρχεται από την αερόβια απορροή δεν περιέχει ενώσεις που να περιορίζουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος "ενεργού ιλύος", αφού κατά τη λειτουργία του αντιδραστήρα ως διαλείποντος έργου δεν βελτιώθηκε η απόδοση του, που σημαίνει ότι το μικρό οργανικό κλάσμα του αποβλήτου που απομένει δεν αποδομείται από την συγκεκριμένη βιολογική διεργασία.

Η αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας απορροής, ήταν δραστική στην μείωση των φαινολικών ενώσεων και σε σχέση με την αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου. Πιο συγκεκριμένα η μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων, ανέρχεται σε ποσοστό μεταξύ 15.3% και 19.6% και για όλες τις μόνιμες καταστάσεις στις οποίες περιήλθε το σύστημα. Ακόμα και κατά την διάρκεια της

λειτουργίας του συστήματος ως διαλείποντος έργου, δεν αποδομήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών ενώσεων. Δεδομένου επίσης ότι η αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς δεν οδήγησε σε καμία μείωση του φαινολικού περιεχομένου (κεφ.4, Πιν. 4.2), ενισχύεται η άποψη που εκφράστηκε παραπάνω, ότι η αναερόβια χώνευση μετατρέπει κάποιες δομές οι οποίες μπορούν και βιομετατρέπονται πύ εύκολα από τους μετέπειτα δρώντες αερόβιους μικροοργανισμούς.

Με βάση τα πύ πάνω συμπεράσματα γίνεται εμφανές, ότι ένα μέρος του μη βιοαποδομήσιμου οργανικού υλικού, οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις του αποβλήτου που δεν αποδομούνται, ενώ ταυτόχρονα δημιουργείται η σκέψη πως η χρήση των μυκήτων «λευκής σήψης» (κεφάλαιο 2) σε αυτό το στάδιο της διεργασίας και λόγω της ιδιαίτερης ικανότητας που επιδύκνουν στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, πιθανόν να οδηγήσει σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του οργανικού υλικού, δίνοντας ένα απόβλητο που θα μπορεί να διατεθεί κατευθείαν στο περιβάλλον και χωρίς ίσως να είναι αναγκαία η μεσολάβηση κάποιας άλλης διεργασίας.

Η συνδυασμένη αναερόβια-αερόβια επεξεργασία δεν οδήγησε σε αποχρωματισμό του αποβλήτου. Η μείωση του σκουρόχρωμου αποβλήτου της απορροής (καφέ χρώμα) είναι μία ακόμα παράμετρος που πρέπει να ρυθμιστεί ώστε το απόβλητο να μην προκαλεί και αισθητική υποβάθμιση των φυσικών αποδεκτών στους οποίους πρόκειται να διατεθεί. Για τη μείωση του χρώματος του αποβλήτου, είναι αρκετά πιθανό να έχουν αποτελεσματική δράση, οι μύκητες «λευκής σήψης», οι οποίοι αποδομούν ενώσεις (πολυφαινόλες, κ.α) που σχετίζονται με το σκούρο χρώμα των αποβλήτων αυτού του είδους. Αυτή λοιπόν η σκέψη και σε συνδυασμό με το προηγούμενο συμπέρασμα, μας προέτρεψαν να εξετάσουμε την χρήση των μυκήτων «λευκής σήψης» ως ένα τρίτο βιολογικό στάδιο επεξεργασίας και να δούμε την επίδραση που έχουν στο απόβλητο της αναερόβιας-αερόβιας απορροής. Η επίδραση αυτή παρουσιάζεται στην συνέχεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα ακόμα ιδιαίτερης σημασίας αποτέλεσμα που προέκυψε από την αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας απορροής, ήταν η μείωση της φυτοτοξικής του δράσης. Πιο συγκεκριμένα και ενώ μετά το τέλος της αναερόβιας

χώνευσης το απόβλητο παρέμενε 100% φυτοτοξικό, τόσο ως πυκνό (100%) όσο και σε αραιώση 50%, το απόβλητο της αερόβιας απορροής σημείωσε σημαντική αύξηση του δείκτη βλαστικότητα κατά 50.6% (σε αραιώση 50%), ενώ παρέμεινε τοξικό στο μη αραιωμένο. Γίνεται έτσι φανερό ότι η αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου οδηγεί σε μείωση της φυτοτοξικότητας του και βελτιστοποίηση της διεργασίας αυτής είναι πιθανό να οδηγήσει σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα, καθιστώντας το απόβλητο κατάλληλο για διάθεση όχι μόνο σε υδάτινους αλλά και σε εδαφικούς αποδέκτες χωρίς να δημιουργεί προβλήματα τοξικότητας στις καλλιέργειες και υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του εδάφους.

Με βάση τα τελευταία συμπεράσματα φαίνεται να επαληθεύεται αυτό που αποδείξαμε και στο τρίτο κεφάλαιο (με την δράση των μυκήτων "λευκής σήψης" στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς) που αφορά τη σχέση των φαινολικών ενώσεων με την φυτοτοξικότητα του αποβλήτου, δηλαδή ότι δεν μειώθηκε καθόλου η φυτοτοξικότητα του αποβλήτου, παρ' ότι οι μύκητες αποδόμησαν υψηλή ποσότητα φαινολικών. Από την άλλη όμως πλευρά, η αερόβια επεξεργασία της αναερόβιας απορροής, οδήγησε σε σημαντική μείωση της φυτοτοξικότητας του, παρ' ότι το ποσοστό των αποδομούμενων φαινολικών δεν ήταν υψηλό, αφού σε καμία περίπτωση δεν ξεπέρασε το 20.0%. Άρα ενισχύεται η άποψη ότι οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς, συμβάλλουν κατά ένα μικρό μέρος στη φυτοτοξική δράση που παρουσιάζει το απόβλητο και ότι το μεγαλύτερο μέρος οφείλεται σε άλλες ενώσεις οι οποίες αποδομούνται πιο αποτελεσματικά από τη δράση των αερόβιων μικροοργανισμών. Από αυτό το συμπέρασμα προκύπτει ένα σημαντικό θέμα για περαιτέρω έρευνα που αφορά τον προσδιορισμό των ενώσεων που ευθύνονται για την φυτοτοξικότητα, καθώς και την εύρεση του πιο αποτελεσματικού τρόπου με τον οποίο μπορεί να γίνει πλήρη απομάκρυνση τους ώστε να εξαλειφθεί εντελώς η φυτοτοξική δράση του αποβλήτου.

Ως τελικό συμπέρασμα, της συνδυασμένης αναερόβιας αερόβιας επεξεργασίας, προκύπτει ότι το σύστημα αυτό ενδείκνυται για την αποτελεσματική διαχείριση του υγρού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς και πως με την κατάλληλη βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του μπορεί να οδηγήσει σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Ιδιαίτερα η βελτιστοποίηση του πρώτου σταδίου της αναερόβιας χώνευσης είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει και σε μεγαλύτερη απόδοση της

συνδυασμένης διεργασίας. Προς αυτή λοιπόν την κατεύθυνση και με στόχο να προσδιορίσουμε τον παράγοντα παρεμπόδισης, που περιορίζει την απόδοση της αναερόβιας χώνευσης, εξετάστηκε στη συνέχεια η επίδραση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς στην αποτελεσματικότητα της αναερόβιας διεργασίας.

5.3. Επεξεργασία του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορροής, α) με χρήση μυκητών «λευκής σήψης» και β) με χρήση οζόντος.

Με στόχο να επιτύχουμε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα για την αποτοξικοποίηση του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, παραθέτουμε μελέτες για την επίδραση των μυκητών «λευκής σήψης» καθώς και της οζόνωσης, στο απόβλητο που προκύπτει από την συνδυασμένη αναερόβια – αερόβια επεξεργασία, η οποία αποτελεί το «κύριο σύστημα για την αποτελεσματική διαχείριση του αποβλήτου.

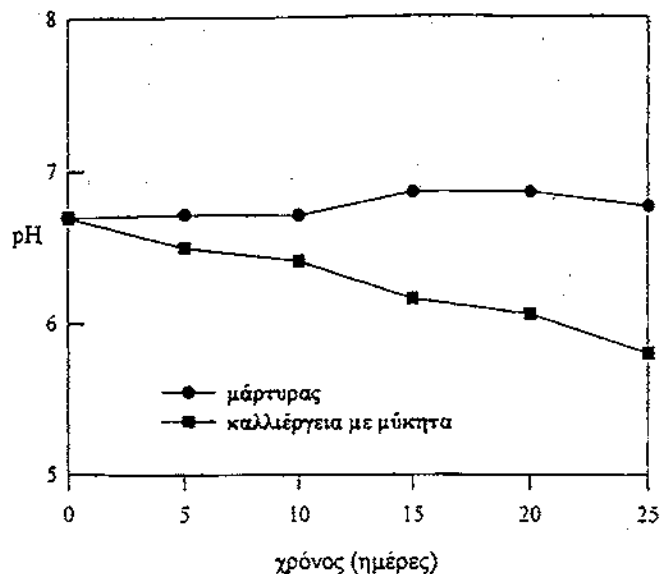
Παρά όμως το υψηλό ποσοστό αποδόμησης οργανικού υλικού που επιτυγχάνεται από τη συνδυασμένη διεργασία, τόσο το αρχικό σκούρο χρώμα του αποβλήτου όσο και η συγκέντρωση του σε φαινολικές ενώσεις δεν μειώνονται σημαντικά. Με δεδομένο ότι οι μύκητες «λευκής σήψης» επιδεικνύουν ιδιαίτερα ικανοποιητική απόδοση στα χαρακτηριστικά αυτά, σκεφτήκαμε να τους χρησιμοποιήσουμε ως ένα τρίτο στάδιο βιολογικής επεξεργασίας. Σε συνδυασμό με την μέθοδο της οζόνωσης ώστε να έχουμε τα συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των δυο διεργασιών και έτσι να προτείνουμε την πιο συμφέρουσα και αποδοτική λύση για την ολοκληρωμένη διαχείριση και την ασφαλή διάθεση του αποβλήτου.

5.4. Αποτελέσματα από τη δράση του μύκητα

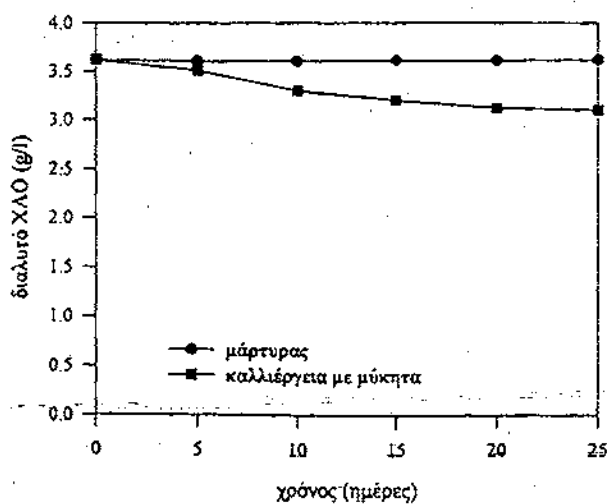
Η δειγματοληψία γινόταν ανά πέντε ημέρες αφού ο μύκητας παρουσίασε σχετικά αργή ανάπτυξη. Τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου που μετρήθηκαν ήταν : το pH, το διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (δΧΑΟ), η συγκέντρωση των φαινολικών και ο αποχρωματισμός.

Η δράση του μύκητα είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του pH (Σχήμα 5.1), κάτι ανάλογο που είχε παρατηρηθεί σε όλες τις πειραματικές διεργασίες με χρήση του μύκητα. Η μείωση του οργανικού φορτίου (Σχήμα 5.2) δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική αφού δεν ξεπέρασε το 15% και επιτεύχθηκε μετά από περίπου 20 ημέρες

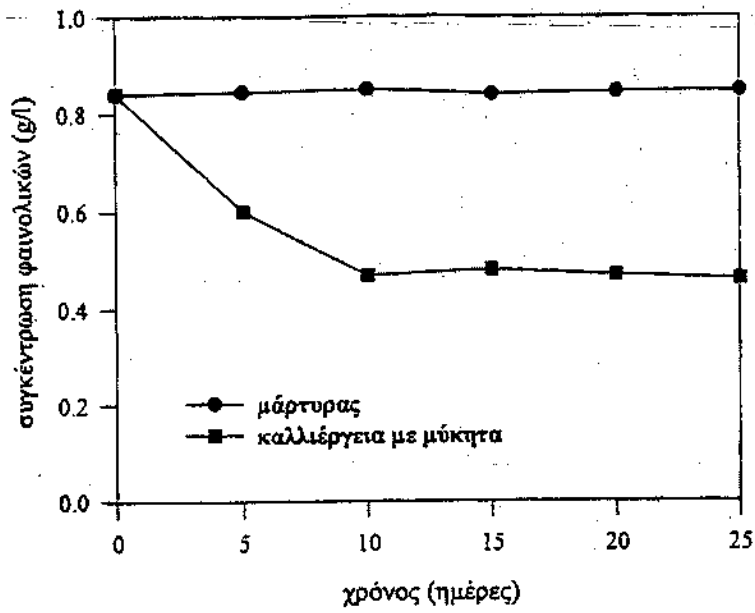
ανάπτυξης. Μετά το τέλος του πειράματος το ΧΑΟ του αποβλήτου ήταν 3.1 g/l. Σημαντική ήταν η μείωση που προκάλεσε ο μύκητας στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου (Σχήμα 5.3). Το τελικό ποσοστό αποδόμησης ανήλθε σε 40.9% και πραγματοποιήθηκε τις πρώτες 10 ημέρες ανάπτυξης. Η αποδόμηση των φαινολικών συνοδεύτηκε και από υψηλό αποχρωματισμό του αποβλήτου (Σχήμα 5.4), αφού στο τέλος του πειράματος μετρήθηκε απορρόφηση κατά 39,4% χαμηλότερη από την αρχική.



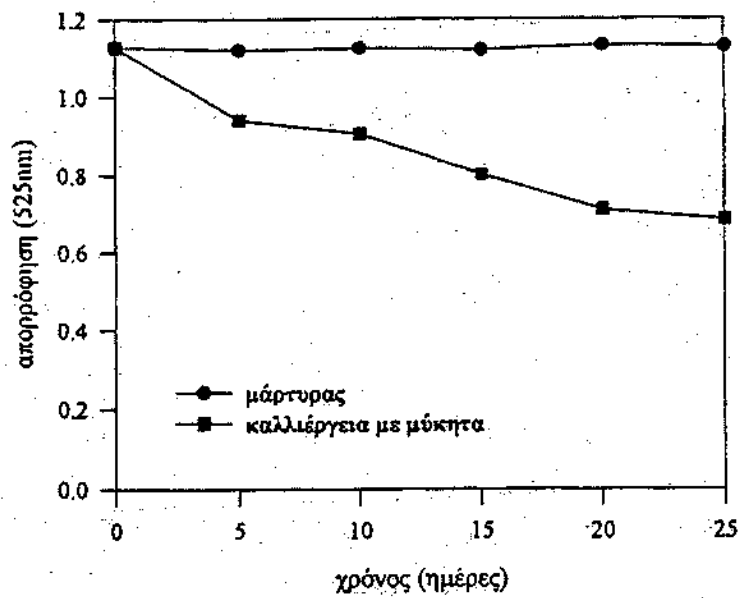
Σχήμα 5.1. Πορεία pH του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορρόφησης από τη δράση του μύκητα.



Σχήμα 5.2. Πορεία διαλυτού ΧΑΟ του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορρόφησης από την δράση του μύκητα.



Σχήμα 5.3. Πορεία αποδόμησης φαινολικών του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορροής από τη δράση του μύκητα.



Σχήμα 5.4. Πορεία αποχρωματισμού του αποβλήτου της αναερόβιας – αερόβιας απορροής από την δράση του μύκητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η διαχείριση του αποβλήτου με χρήση βιολογικών μεθόδων παρουσιάζει μειωμένο κόστος σε σχέση με τις φυσικοχημικές, δεν απαιτεί προσθήκη χημικών μέσων, ενώ ταυτόχρονα από τα διάφορα στάδια των επιμέρους διεργασιών παράγονται χρήσιμα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα που μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους.

Από τα αποτελέσματα της έρευνας μας προέκυψε ότι η αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς είναι πιο αποτελεσματική από την αναερόβια χώνευση αυτού, προκαλώντας αφαίρεση οργανικού υλικού μεγαλύτερη από 60.0% έναντι 42.0~49.0% της αναερόβιας. Η αναερόβια χώνευση περιορίζεται από την παρουσία κάποιων ενώσεων που περιέχονται στο απόβλητο με αποτέλεσμα την μεγάλη συσσώρευση οξικού οξέος. Και την χαμηλή παραγωγή βιοαερίου. Ο προσδιορισμός και η απομάκρυνση του παράγοντα παρεμπόδισης, είναι πολύ πιθανό να αυξήσει την απόδοση της αναερόβιας χώνευσης, δίνοντας μεγαλύτερη παραγωγή βιοαερίου και μικρότερους χρόνους παραμονής για την λειτουργία του συστήματος.

Ο συνδυασμός αναερόβιας και αερόβιας διεργασίας αποτελεί το βασικό σύστημα -- επεξεργασίας του αποβλήτου της βρώσιμης ελιάς, επιτυγχάνοντας αφαίρεση οργανικού υλικού ~90.0% για απόβλητο αρχικού δΧΑΟ 16.5g/l και ~83.0% για απόβλητο αρχικού δΧΑΟ 23.5g/l.

Συγκρίνοντας τα δύο αερόβια συστήματα επεξεργασίας, του αρχικού αποβλήτου και του αποβλήτου της αναερόβιας απορροής, γίνεται φανερό ότι η αναερόβια χώνευση μετατρέπει κάποιες οργανικές δομές σε κάποιες άλλες οι οποίες είναι πιο εύκολα βιοαποδομήσιμες για τους μετέπειτα δρώντες αερόβιους μικροοργανισμούς.

Τόσο η αναερόβια όσο και η αερόβια επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου αποβλήτου δεν προκαλούν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων (10.0~12.5% και 15.0~19.5%, αντίστοιχα), ενώ η συνδυασμένη αναερόβια αερόβια

επεξεργασία οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση (~30.0%).

Το αρχικό απόβλητο της βρώσιμης ελιάς είναι ισχυρά φυτοτοξικό τόσο στο 100% όσο και σε αραιώση 50%. Στον ίδιο βαθμό φυτοτοξικό παρέμεινε και μετά το τέλος της αναερόβιας χώνευσης. Η αερόβια επεξεργασία μείωσε την φυτοτοξικότητα του αποβλήτου κατά 19.8% και μόνο σε αραιώση 50%. Ιδιαίτερα αποτελεσματική στην μείωση της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου ήταν η συνδυασμένη διεργασία, η οποία σε αραιώση 50% προκάλεσε αύξηση του δείκτη βλαστικότητας μεγαλύτερη από 50.0%. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό και οδηγεί στην ανάπτυξη ενός ενδιαφέροντος πεδίου έρευνας που αφορά τον προσδιορισμό των ενώσεων του αποβλήτου στις οποίες οφείλεται η φυτοτοξική του δράση, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να αφαιρεθούν, έτσι ώστε το απόβλητο να μην διατίθεται μόνο σε υδάτινους αποδέκτες, αλλά να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άρδευση καλλιεργήσιμων εκτάσεων.

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο απόβλητο της βρώσιμης ελιάς και αποδομούνται από την δράση του μύκητα «λευκής σήψης» δεν προκαλούν παρεμποδιστική δράση στους αναερόβιους μικροοργανισμούς ή τουλάχιστον, δεν αποτελούν τον κύριο παράγοντα παρεμπόδισης. Αντίθετα, αυτό που αποδεικνύεται από τα αναερόβια κινητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι ότι το υλικό (απόβλητο) που απομένει μετά από την δράση του μύκητα είναι πιο τοξικό για την αναερόβια χώνευση. Συνεπώς η χρήση μυκήτων «λευκής σήψης» ως ένα πρώτο στάδιο προεπεξεργασίας πριν την αναερόβια χώνευση δεν συνίσταται για αυτό το είδος του αποβλήτου.

Η χρήση μυκήτων «λευκής σήψης» τόσο σε θερμικά αποστειρωμένο (autoclaved) όσο και σε αποστειρωμένο μέσω διήθησης (filter sterilized) απόβλητο, προκάλεσε υψηλά ποσοστά αποδόμησης φαινολικών και αποχρωματισμού, μικρό ποσοστό αφαίρεσης οργανικού υλικού και καθόλου μείωση της φυτοτοξικής του δράσης. Η θερμική αποστείρωση του αποβλήτου δεν συνίσταται ως προεπεξεργασία αφού εκτός από το τεράστιο κόστος που απαιτεί, προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο διπλάσιο (δημιουργία άλλων φαινολικών δομών), δημιουργώντας ένα πολύ

πιο σκουρόχρωμο απόβλητο (μαύρου χρώματος) και πολύ πιο φυτοτοξικό σε σχέση με το αρχικό.

Η θερμική κατεργασία της παστερίωσης ($60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά) του αποβλήτου, για την ανάπτυξη των μυκήτων «λευκής σήψης», ήταν μία "καινοτομία" η οποία αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική και χωρίς να παραλλάσσει ιδιαίτερα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου. Ο μύκητας που εμβολιάστηκε σε πυκνό (100%) παστεριωμένο απόβλητο, αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα, αποδομώντας μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών ($>75.0\%$), ενώ επέφερε μείωση του οργανικού υλικού που ξεπέρασε το 42.0%. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό αποτέλεσμα που δείχνει ότι η παστερίωση μετατρέπει κάποιες οργανικές δομές οι οποίες βιομετατρέπονται πιο εύκολα από τον μύκητα και αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας που επιδέχεται ακόμα περισσότερη και πιο λεπτομερή μελέτη.

Η ακινητοποίηση (immobilization) των μυκήτων «λευκής σήψης» επάνω σε στερεούς υποστηρικτές είναι μία νέα τεχνολογία η οποία επίσης επιδέχεται περαιτέρω βελτιστοποίηση. Από τα πρώτα ενδεικτικά πειράματα ακινητοποίησης, που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σε πολυμερές πολυουρεθάνη (polyurethane foam), ο μύκητας ανταποκρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποικίζοντας τα τεμαχίδια της πολυουρεθάνης με χαρακτηριστική ταχύτητα και ευκολία, ενώ προκάλεσε μεγαλύτερους ρυθμούς και ποσοστά αποδόμησης φαινολικών ενώσεων σε σχέση με την καλλιέργεια του σε αιώρηση.

Η υψηλή αλατότητα του αποβλήτου που οφείλεται κυρίως στα ιόντα νατρίου (3200 ppm) συμβάλλει κατά ένα μικρό μέρος στην φυτοτοξικότητα του αποβλήτου, ενώ ακόμα δεν φαίνεται να περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα «λευκής σήψης».

Από τα αναερόβια κινητικά πειράματα που έγιναν, προέκυψε ότι το απόβλητο της βρώσιμης ελιάς που είχε προηγουμένα υποστεί την θερμική κατεργασία της παστερίωσης, επέδειξε καλύτερη συμπεριφορά από το αρχικό απόβλητο παράγοντας περισσότερο βιοαέριο που ήταν πλουσιότερο σε μεθάνιο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γαβαλά Χ. 1998. Αναερόβια συγχώνευση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστημίου Πατρών.

Λυμπεράτος Γ. 1995. Μηχανική υγρών αποβλήτων. Εκδόσεις Παν/μίου Πατρών.

Μπαλατσούρας Γ. 1995. Η επιτραπέζια ελιά (Β' έκδοση).

Οικονόμου Δ. 1994. Επεξεργασία αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση μεμβρανών. Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε).

Τσώνης Σ. 1988. Επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Πανεπιστημίου Πατρών.

American Public Health Association. 1995. Closed ret1LL'(colorimetric method, p. 15. In A. D. Eaton, L. S. Clescey and A. E. Greenberg (ed.) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. APHA-A WW A- WEF, Washington, D.C.

Ander, P., and K. - E. Eriksson. 1978. Lignin degradation and utilization by microorganisms, 1-58. In M. J. Bull (ed.) Progress in industrial microbiology. Elsevier, Amsterdam.

Bar, D. P., and S. D. Aust. 1994. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. Environ. Sci. Technol. 28, 79A.

Beccan, M., G. Carucci, M. Majone, and L. Tonsi. 1999. Role of lipids and phenolic compounds in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. Environ. Technol. 20, 105-110.

Beltran, J., J. Fernando, J. F. Garcia-Araya, P. Alvarez, and O. Gimeno. 1998. Effects of single and combined ozonation with hydrogen peroxide or UV radiation on the chemical degradation and biodegradability of debittering table olive industrial wastewaters. Water Res. 33, 723-732.

Benitez, J., J. Beltran-Heredia, J. Toaeirosa, J. L. Acero, and V. Cercas. 1997. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. Appl. Microbiol. Biotechnol., 47,185188.

Bitton G." 1994. Anaerobic digestion of wastewater and sludge. In: Wastewater microbiology, Wiley-Liss/Inc., New York, 229-245.

Bockle, B., M. J. Martinez, F. Guillen, and A. T. Martinez. 1999. Mechanism of peroxidase inactivation - in liquid cultures of the lignolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 923-928.

Boddy L. 1992. Development and function of fungal communities in decomposing wood. In: Carroll D.T and Wicklow O.T. (eds) *The fungal Community*. Marcel Dekker, Inc., New York, 749-782.

Bollag, J. M., K. L. Shuttleworth, and D. H. Anderson. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl Environ. Microbiol.* 54,3086-3091.

Borja R., C. J. Banks, R. Maestro-Ouran, and J. Alba. 1996. The effects of the most important phenolic constituents of olive mill wastewater on batch anaerobic methanogenesis. *Environ. Technol.* 17, 167-174.

Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267, 99-102.

Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1992. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase. in the presence of 2,2-azinobis-(3ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 823-827.

Breen, A., and F. L. Singleton. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10,252-258.

Brenes M., and A. Carrido. 1988. Regeneration de salmueras de aceitunas verdes estileo espanol con resinas cambiadoras de iones. *Grasas Aceites* 39, 96-101

Brenes, M., A. Montano, and A. Garrido. 1990. Ultrafiltration of green table olive: Influence of operating parameters and effects on polyphenol composition. *J. Food Sci.* 55,214-217.

Breure A.M., Beefink H.H, Veerkuijlen J. and van Andel J.G. 1986a. Acidogenic fermentation of protein/carbohydrates mixtures by bacterial populations adapted to one of the substrates in anaerobic chemostat cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 245-249.

Breure A.M., Beefink H.H. and van Andel J.G. 1986b. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24,426-431.

Buhr H.Q. and Andrews J.F (1977). Review paper: The thermophilic anaerobic digestion process. *Water Research*, 11, 129 - 143.

- Bumpus, J. A., M. Tiery, D. Wright, and S. D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. *Science* 228, 1434-1436.
- Buswell, J. A. 1991. Fungal degradation of lignin, p. 425-480. In D. K Arora, R. Bharat, K. G. Mukelji and G. R. Knudsen (ed.) *Handbook of applied mycology (Vol I, -Soils and Plants)* Marcel Dekker Inc, New York:
- Camarero, S., S. Sarkar, F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274, 10324-10330.
- Caramelo, I., M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 1999. A search for lignolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gammathiomethylbuttic acid and lignin model dimers. *Appl Environ. Microbiol.* 65, 916922.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.
- Chynoweth D.P. and Ma. R.A. 1971. Volatile acid formation in sludge digestion. In: *Anaerobic Biological Treatment Processes*, F.G.Pohland (ed.). *Adv. Chem. Ser.*, 105, 41-54.
- De Jong E., Cazemier A.E., Field J.A. and de Bont J.A.M. 1994. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 271-277.
- Dix N.J. and Webster J. 1995. *Fungal Ecology*. Chapman and Hall, London, 549.
- Dolfing J. 1988. Acetogenesis. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder (ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York, 417-468.
- Ehaliotis., C., K. Papadopoulou, M. Kotsou, I Mari, and C. Balis. 1999. Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiol Ecol* 30, 301-311.
- Fair G.M. and Moore E.W. 1932. Effect of temperature of incubation upon the course of digestion. *Sew. Works Jour.*, 4, 589.
- Fair G.M. and Moore E.W. 1934. Time and rate of sludge digestion and their variation with temperature. *Sew. Works Jour.*, 6, 3.
- Fair G.M. and Moore E.W. 1937. Digestion temperature range. *Sew. Works Jour.*, 9, 3.

Federici F. and Bongi G. 1983. Improved method for isolation of bacterial inhibitors from oleuropein hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 509-510.

Fernandez A.G. Vaughn R.H. 1978. Utilization of oleuropein by microorganisms associated with olive fermentations. *Can. J. Microbiology*, 24, 680-684.

Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1666-1671.

Filipakopoulou T., X. Loukakis, A. Zorpas, and A. G. Vlyssides. 1999. Treatment of waste water from table olive industries by Fenton's reactions, p. 109-113. In *Proceedings of the 2nd National Symposium of Chemical Engineers*. Department of Chemical Engineering, University of Thessaloniki, Greece.

Fleming H.P., Walter W.M. and Etchells J.L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology*, 26, 777-782.

Garcia Garcia, P. R. Jimenez Pena, J. L. Bonilla Venceslada, A. Martin Martin, M.A. Martin Santos, E. Ramos Gomez. 1999. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 35, 751-758.

Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M. and Gold M.H. 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114, 1077-1083.

Gomez-Millan, A., M. C. Duran, P. A. Garcia Garfido, F. Gonzalez, L. Rejano. F. Sanchez, and J. C. Sanchez. 1983. Elaboracion de aceitunas verdes estilo espanol de la variedad Gordal con reutilizacion de lejias Y supresion de lavados. Estudio de sus aguas residuales y algunos ensayos de purificacion. *Grasas Aceites* 3, 162-167.

Gonzalez, M. O., E. Moreno, J. Quevedo-Sarmiento, and A. Ramos-Correnzana. 1990. Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 20, 423-432.

Gottschalk G. (1986). Bacterial Fermentations. In: *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag, Inc., New York, 209-282.

Grappelli, A., W. Pietrosanti, L. Pasetti, and A. Carilli. 1991. Metabolites production during the growth of *Lentinus* species on agricultural waste waters, p. 717-720. In M. Maher (ed.) *Science and cultivation of edible fungi*. Balkema, Rotterdam.

Guillen F., Martinez A.T. and Martinez M.J. 1992. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 209, 603-611.

Gujer W. and Zehndar A.J.B. 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci Technology*, 15, 127-167.

Haars, A., and A. Hutterman. 1980. Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.*, 125, 233-237.

Hamdi and Moktar (1992) Toxicity and biodegradability of olive oil wastewaters in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37,155-163.

Hanaki K., Matsuo T. and Nagase M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII, 1591-1610.

Harvey P.J., Schoemaker H.E. and Palmer J.M. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 195, 242-246.

Hatakka A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 153-188.

International Olive Oil Council. 2000. The world market for table olives: ongoing trends. *Olivae* 82, 20-22.

Kaal E.E.J., de Jong E and Field J.A. 1993. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4031-4036.

Kerem, Z., D. Filizem, and Y. Hadar. 1992. Lignocellulose degradation during solidstate fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58,1121-1127.

Kersten P.J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 87, 2936-2940.

Kim., M. S., E. J. Huh, H. K. Kim, and K. W. Moon. 1998. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by selected white-rot fungi and the influence of lignin peroxidase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 129-133.

Kirk, T. K. 1984. Degradation of lignin, p. 339-437. In D. T. Gibson (ed.) Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, New York.

Kirk T. K., and R. L. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.

Kirk T. K., Tien M, Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E and Farrell R.L. 1990. Lignin peroxidase from fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 188, 159-171.

Kirkpatrick N. and Palmer J.M. 1987. Semi-continuous ligninase production using foam-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 129-133.

Knupp G., G. Ruecker, A. Ramos-Cormenzana, S. Garrido Hoyos, M. Neugebauer, and T. Ossenkop. 1996. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *Int. Biodeter. Biodegr.* 38, 277-282.

Kopsidas-G. C. 1992. Wastewater from the preparation of table olives. *Water Res.* 26, 629-631.

Kotze J.P., Thiel P.G. and Hattingh W.H J. 1969. Review paper: Anaerobic digestion II. The characterization and control of anaerobic digestion. *Water Research.*, 3, 459-493.

Lang, E., F. Nerud, E. Novotna, F. Zadrazil, and R. Martens. 1996. Production of ligninolytic exoenzymes and ¹⁴C-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose substrate. *Folia Microbiol.* 41, 489-493.

Lawrence A. W. and McCarty P.L. 1967. Kinetics of methane fermentation in anaerobic waste treatment. Technical report No. 5, Stanford University, Stanford California.

Leatham, F., and T. K. Kirk. 1983. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 65-67.

Lettinga G., Van Velsen I., de Zeeuw W. and Hobma S. W. 1979. The application of anaerobic digestion to industrial pollution treatment. In: Anaerobic digestion, Stafford et al., eds., Applied Science Publishers, London, England, 167-186.

Malina J.F. and Pohland F. G. 1992. Anaerobic sludge digestion, In: design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. *Water Quality Management library* - vol. 7, 41-118.

Maly J. and Fadrus H. 1971. Influence of temperature on anaerobic digestion. *Journal WPCF*, 43, 641-650.

Martirani, I., P. Giardina, L. Marzullo, and G. Sannia. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30,1914-1918.

Marzullo, I., R. Cannio, P. Giardina, M. T. Santini, and G. Sannia. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270, 38233827.

Michel, F. C. Jr., S. B. Dass, E. A. Grulke, and C.A. Reddy. 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2368-2375.

Mileski, G. J., J. A. Bumpus, M. A. Jurek, and S. D. Aust. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2885-2889.

Moreno, E., J. Perez, A. Ramos-Cormenzana, and J. Martinez. 1987. Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios* 51, 169-174.

Mueller L.E., Lunsford H.E. and Dunstan G.H. 1959. Some characteristics of anaerobic sludge digestion. I. Effect of loading. *Sewage ind. Wastes*, 31, 669-677.

Nerud, F., Z. Zouchova, and Z. Miourkova. 1991. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. *Biotechnol. Lett.* 13,657-660.

Ngo, T.T., and H.M. Lenhoff. 1980. A sensitive and versatile assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.* 105,389-397.

Orelmand R.S. 1988. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehndew (ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York,641-705.

Pavlostathis S. G. and Giraldo-Gomez E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment. *Water science Technology*, 24, 8,35-39.

Perez, I., E. Esteban, M. Gomez, and F. Gallardo-Lara. 1986. Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *J. Environ. Sci. Health* 21,349-357.

Perez, J., T. Rubia, G. Moreno, and J. Martinez. 1992. Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11,489-495.

Perie F.H and Gold M.H. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase

expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1792-1797.

Pohland F.G. 1962. Laboratory investigations on the thermological aspects and volatile acids-alkalinity behaviour during anaerobic sludge digestion. Ph.D. Thesis, Purdue University.

Raper, C. A., J. R. Raper, and R. E. Miller. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64, 1088-1117.

Rayner A.D.M and Boddy L. (1988). *Fungal Decomposition of Wood. Its Biology and Ecology*. John Wiley, Chichester, 587.

Richards B.K, Cummnings R.J., Jewell W.G. amd Herndon F.G. 1991. High solids anaerobic_methane fermentation of sorghum and cellulose. *Biomass and Bioenergy*, 1, 47-53.

Rodriguez, E., M. A. Pi6kard, and R. Vazquez-Duhalt. 1999. Industnal dye decolonization by laccases from lignolytic fungi. *Curr.Microbiol.* 38,27-32.

Ruckenstein E. and. Wang X.B. 1994. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous Poly(Styrene-Divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 79-86.

Ruiz-Duenas, F. J., M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 1999. Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase concerning its ability to oxidize Mn^{2+} and different aromatic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 65,4705-4707.

Ruttimann-Johnson C., Salas L., Vicuna R. and Kirk T.K. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1792-1797.

Sahm H. 1984. Anaerobic wastewater treatment. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 29, 84-115.

Saiz-Jimenez, C., and G. Gomez-Alarcon. 1986. Effects of vegetation water on fungal microflora, p. 61-76. In F.A.O. (ed.) *International symposium on olive by-products valorization*. F.A.o., Madrid.

Sanjust, E., R. Pompei, A. Rescigno, A. Rinaldi, and M. Ballero. 1991. Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 31, 223-235.

Sawyer C.N. and McCarty P.L. 1978a. Chemical Oxygen Demand, In: Chemistry for Environmental Engineering, McGraw-Hill, 433-438.

Sawyer C.N. and McCarty P.L. 1978b. Nitrogen, In: Chemistry for Environmental Engineering, McGraw-Hill, 439-453.

Sayadi, S., and R. Ellouz. 1992. Decolourization of olive mill waste-waters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 813-817.

Sayadi, S., and R. Ellouz. 1993. Screening of white-rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 141-146.

Sayadi, S., and R. Ellouz. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1098-1103.

Schink B. 1988. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder (ed.). John Wiley and Sons Inc., New York, 771-846.

Setti, I., S. Maly, A. Iacondini, G. Spinozzi, and P. G. Pifferi. 1998. Biological treatment of olive milling waste waters by *Pleurotus ostreatus*. *Ann. Chirn.* 88, 201

Sierra-Alvarez R., and G. Lettinga. 1990. The methanogenic toxicity of wastewater lignins and lignins-related-compounds. *J. Chem.Tech. Biotechnol* 50,443-455.

Sorensen A. H., Winther-Nielsen M. and Ahring B.K. (1991). Kinetics of lactate, acetate and propionate in unadapted and lactate adapted thermophilic, anaerobic sewage sludge: the influence of sludge adaptation for start-up of thermophilic UASBreactors. *Applied Microbiology Biotechnology*, 34, 823-827.

Srebotnic E., Messner K. and Foisner R. 1988. Penetrability of white-rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2608-2614.

Srebotnic E., Jensen K.A and Hammel K.E. 1994. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 91, 12794-12797.

Stroppiana R. 1995. Olive tree, cultivation and production in France, in the European union and in the world. *Comptes Rendus de l' Academie d' Agriculture de France*, 81 (7).

- Symons G.E. and Buswell A.M. 1933. The methane fermentation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.*, 55, 2028-2036.
- Tarvin D. and Buswell A.M. 1934. The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 1751-1755.
- Tien, M., and T. K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*. 221. 661-663.
- Tien, M., and T. K. Kirk. 1984. Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* Purification, characterisation, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81, 2280-2284.
- Toerien D.F. and Hattingh W.H.J. 1969. Review paper: Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion *Wat. Res.*, 3, 385-416.
- Toerien D.F., Siebert M.I. and Hattingh W.H.J. 1967. The bacterial nature of the acid-forming phase of anaerobic digestion. *Wat. Res.*, 1, 497-507.
- Valmaseda, M., M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 1991. Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* - lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 481-484.
- Verstraete W. and Vandevivere P. 1997. Broader and newer application of anaerobic digestion. *Proceedings of the 8th International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan*, vol 1, 67-74.
- Vogels G.D., Keltjens J.t. and van der Drift C. 1988. Biochemistry of methane production. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder (ed.) John Wiley and Sons, Inc., New York, 707-770.
- Water Quality Management Library, vol. 7, 1992.
- Waterman, P. G., and S. Mole. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. In J. H. Lawton and G. E. Likens (ed.) *Methods in ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wilson, S. C., and K. C. Jones. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ. Pollution* 81, 229-249.
- Zeikus T.C. 1980. Microbial populations in digesters. In: *Anaerobic digestion*, O.A. Stafford, B.I. Wheatley and D.E. Hungus (eds), Applied Science Publishers, London, 61-89.

Zervakis, G., and C. Balis. 1996. Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass, p. 311-323. in D. Royse (ed.) Proceedings of the 2nd international conference on mushroom biology and mushroom products. PennState University, Pennsylvania.

Zervakis, G., and G. Balis. 1996. A pluralistic approach στη the study of Pleurotus species, with emphasis στη compatibility and physiology of the European morphotaxa. Mycol. Res. 100,717-731.

Zervakis, G., P. Yiatras, and C. Balis. 1996. Edible mushrooms from olive mill wastes. Int. Biodeter. Biodegr. 38, 237-243.

Zhang T.C. and Noike T. 1994. Influence of retention time στη reactor performance and bacterial trophic populations in anaerobic digestion processes. Wat. Res., 28, 1, 27-36.

Zucconi, F., A. Peta, M. Forte, and M. De Bertoldi. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. Biocycle 22,54-57.

