

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων
Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε
Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για
Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων»**

ΜΑΡΙΑ Π. ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής Π.Κ (Επιβλέπων)
Δρ. Ευάγγελος Διαμαντόπουλος, Καθηγητής Π.Κ
Δρ. Νίκος Πασαδάκης, Λέκτορας Π.Κ.

Χανιά
Οκτώβριος 2005

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων
Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε
Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για
Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων»**

ΜΑΡΙΑ Π. ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής Π.Κ (Επιβλέπων)

Δρ. Ευάγγελος Διαμαντόπουλος, Καθηγητής Π.Κ

Δρ. Νίκος Πασαδάκης, Λέκτορας Π.Κ.

Χανιά
Οκτώβριος 2005

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα ορισμένων Θρεπτικών ουσιών και παραγόντων βιοαποικοδόμησης στην βιοδιάσπαση πετρελαιοκηλίδων.

Η βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση κατάλληλων θρεπτικών υλικών (πηγές αζώτου και φωσφόρου) που στόχο έχουν την διέγερση των αυτόχθονων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στην διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου. Ωστόσο η χρήση των ενίοτε υδατοδιαλυτών λιπασμάτων όπως είναι τα άλατα φωσφόρου και αζώτου παρουσιάζει το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης τους μέσα στο θαλάσσιο περιβάλλον δημιουργώντας έτσι περαιτέρω περιβαλλοντικά προβλήματα.

Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος εξετάζεται η χρήση λιπόφιλων φυσικών λιπασμάτων (ουρικό οξύ, λεκιθίνη) που είναι βραδείας διάλυσης και λιπόφιλα λιπάσματα τα οποία δρουν στην διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου. Η δράση τους αυτή μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) όπως είναι τα ραμνολιπίδια (rhamnolipids). Η σύζευξη των λιπόφιλων λιπασμάτων και των επιφανειοδραστικών ουσιών βοηθούν στην διασκόρπιση της πετρελαιοκηλίδας αυξάνοντας έτσι τη διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου και άρα την περιοχή δράσης των μικροοργανισμών. Οι βιολογικές αυτές επιφανειοδραστικές ουσίες προτιμώνται έναντι των χημικών διότι είναι πολύ λιγότερο τοξικές και πολύ ευκολότερα αποικοδομήσιμες. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η δράση αυτών των λιπόφιλων λιπασμάτων με ή χωρίς την προσθήκη βιολογικών επιφανειοδραστικών ουσιών όσο αφορά τον βαθμό αποικοδόμησης σε σχέση με ένα εμπορικό παράγοντα βιοεξυγίανσης (bioremediation agent) τον S-200.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). Το πρωτόκολλο αυτό σχεδιάστηκε για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοαποικοδομήσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα με την Ανάλυση του πιο Πιθανού Αριθμού (Most Probable Number) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) με τη χρήση GC-MS.

ABSTRACT

In this study the effectiveness of certain nutrients and bioremediation agents on the bioremediation of oil spills was examined.

Bioremediation of crude oil hydrocarbons is achieved by the application of certain amounts of nutrients (sources of nitrogen and phosphorous). These nutrients stimulate the indigenous microorganisms which are located at the interface of water-crude oil. The supply of these two essential elements as water-soluble salts of nitrogen and phosphorous presents several problems. These include the rapid dilution of the salts in the large volumes of polluted water and the increase in concentration of mobile nitrogen which creates further environmental problems.

To overcome these problems the use of hydrophobic sources of nitrogen (uric acid) and phosphorous (lecithin) acting at the interface of water-crude oil is investigated. Their activity is enhanced by the use of biosurfactants. Biosurfactants are heterogeneous group of surface active molecules produced by microorganisms, which can disperse oil spills and increase the interface of water-crude oil thus permit microorganisms to grow on a greater area. Biosurfactants are more preferable than chemical dispersants because they are less toxic and more easily biodegradable. The effects of the lipophilic fertilizers with or without biosurfactants on the degradation of crude oil hydrocarbons are examined. These effects are also compared with the degradation that is achieved by commercial bioremediation agents like S-200.

The method which has been used for the evaluation of these bioremediation agents is based on a modified bioremediation agent effectiveness testing protocol by EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). This protocol was designed to determine a product's ability to biodegrade oil by quantifying changes in the oil composition resulting from biodegradation. The protocol tests for microbial activity by Most Probable Number (MPN) determination and quantifies the disappearance of saturated hydrocarbons and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) by GC-MS analysis.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε με σκοπό την εύρεση νέων υλικών (θρεπτικών) που στόχο έχουν την βιοδιέγερση των εγγενών θαλάσσιων μικροοργανισμών για την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων σε περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

- Στον **κ. Καλογεράκη Νικόλαο**, Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης και επιβλέποντα, για την επιλογή του θέματος, την άριστη συνεργασία που είχαμε, καθώς επίσης και για την αμέριστη συμπαράσταση του με τις συμβουλές αλλά και για την διόρθωση της εργασίας αυτής.
- Στον **κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο**, Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης και συνεπιβλέποντα, για τον χρόνο που διέθεσε για την διόρθωση και εξέταση της εργασίας αυτής.
- Στον **κ. Πασαδάκη Νίκο**, Λέκτορα του Πολυτεχνείου Κρήτης, για τις πολύτιμες συμβουλές και συμπαράσταση του κατά την εκπόνηση των πειραμάτων αυτών στο εργαστήριο Ανάλυσης Ρευστών και Πυρήνων Υπόγειων Ταμιευτήρων, την άριστη συνεργασία που είχαμε, καθώς επίσης και για τον χρόνο που διέθεσε για την διόρθωση και εξέταση της εργασίας αυτής.

Στην προσπάθεια για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής συνέβαλαν και άλλοι συνεργάτες που θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Την επιστημονική συνεργάτιδα του εργαστηρίου Ανάλυσης Ρευστών και Πυρήνων Υπόγειων Ταμιευτήρων, **κα. Κανελλοπούλου Γεωργία** για την ουσιαστική συμβολή της στην ολοκλήρωση των πειραμάτων καθώς επίσης και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Τον συνάδελφο, συνεργάτη του εργαστηρίου Μηχανικής Πετρωμάτων και πάνω από όλα φίλο **κ. Σαρρή Ερνέστο** για τα σχόλια, διορθώσεις, παρατηρήσεις και συμπαράσταση του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Τον Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης **κ. Γκέκα Βασίλη** για τα σχόλια, και τις παρατηρήσεις του κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια ανελλιπώς και αμερίστως με στηρίζει και με συμβουλεύει στις επιλογές και στις προσπάθειες μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Περιστατικά Πετρελαιοκηλίδων.....	1
1.2	Τρόποι Αντιμετώπισης των Πετρελαιοκηλίδων σε Παράκτια Θαλάσσια Περιβάλλοντα	8
1.2.1	Φυσικές Μέθοδοι.....	9
1.2.2	Μη Χημικές Μέθοδοι	10
1.2.3	Χημικές Μέθοδοι.....	11
1.3	Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως Τεχνολογία Καθαρισμού Πετρελαιοκηλίδων	12
2	Παράγοντες που Επιδρούν στην Φυσική Βιοαποικοδόμηση του Πετρελαίου και στην Επιτυχία της Βιοεξυγίανσης.....	16
2.1	Φυσικό-Χημικές Ιδιότητες του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του.....	16
2.1.1	Χημική Σύσταση του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του.....	16
2.1.2	Φυσικές Ιδιότητες του Πετρελαίου.....	19
2.2	Συμπεριφορά του Πετρελαίου στο Περιβάλλον	21
2.2.1	Διεργασίες Γήρανσης (Weathering) Πετρελαίου	21
2.2.2	Αλληλεπιδράσεις Πετρελαίου-Ακτής.....	25
2.2.3	Εναισθησία Ακτών	26
2.3	Βιοαποικοδόμηση Πετρελαίου	27
2.3.1	Μηχανισμοί Βιοαποικοδόμησης Του Πετρελαίου: Μικροβιολογική Προσέγγιση.....	27
2.3.2	Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επιδρούν στην Βιοαποικοδόμηση του Πετρελαίου.....	31
2.3.3	Ο Ρόλος των Επιφανειοδραστικών Ενώσεων Βιολογικής Προέλευσης (biosurfactants)	34
2.3.4	Εκτίμηση του Βαθμού Βιοαποικοδόμησης του Πετρελαίου: Εφαρμογή Βιοδεικτών (biomarkers)	38
2.3.5	Γενικά Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Βιοεξυγίανσης ως Τεχνολογίας Αντιμετώπισης Πετρελαιοκηλίδων.....	40
3	Είδη Τροποποιήσεων και Παραγόντων κατά την Εφαρμογή τους.....	44
3.1	Εφαρμογή Θρεπτικών	44
3.1.1	Υδατοδιαλυτά Θρεπτικά.....	45
3.1.2	Κοκκώδη Βραδείας Απελευθέρωσης Θρεπτικά (slow-release).....	47
3.1.3	Ολεοφιλικά Θρεπτικά	48
3.2	Εφαρμογή Μικροοργανισμών.....	50
3.3	Εφαρμογή Οξυγόνου	52
3.3.1	Επιφανειακή Κατεργασία Εδάφους.....	53
3.3.2	Εξαναγκασμένος Αερισμός.....	54
3.3.3	Χημικές Μέθοδοι.....	54
3.4	Μελέτες Βιοδιέγερσης Πετρελαίου σε Περιβάλλοντα Ανοιχτής Θαλάσσης	55
3.4.1	Εργαστηριακές Μελέτες στην Βιοδιέγερση Πετρελαίου.....	56
3.4.2	Μελέτες Μεσόκοσμου στην βιοδιέγερση του πετρελαίου	60
3.5	Η επιλογή των κατάλληλων θρεπτικών προς εξέταση	61

4	Υλικά και Μέθοδοι- Δοκιμή Αποτελεσματικότητας των Παραγόντων Βιοεξυγίανσης	64
4.1	Περίληψη της Μεθόδου	64
4.2	Εργαστηριακός Εξοπλισμός	65
4.3	Αντιδραστήρια και Θρεπτικά Καλλιέργειας.....	65
4.3.1	Προετοιμασία Θαλασσινού Νερού	65
4.3.2	Προετοιμασία Πετρελαίου	66
4.3.3	Προετοιμασία του Διαλύματος Ανόργανων Θρεπτικών	66
4.4	Προκαταρτική Προετοιμασία	67
4.4.1	Δομή του Πειράματος.....	67
4.4.2	Δειγματοληψία	70
4.5	Μικροβιολογική Ανάλυση	70
4.5.1	Προετοιμασία Θρεπτικού Μέσου	71
4.5.2	Μικροβιακή Απαρίθμηση	71
4.5.2.1	Αραιώσεις	71
4.5.2.2	Εμβολιασμός των 96 microtiter well MPN plates (μικροβιακοί αποδομητές πετρελαίου)	72
4.5.2.3	Ανάλυση των Δεδομένων σε Φύλλο Excel με τη Βοήθεια του Solver	72
4.6	Χημική Ανάλυση της Σύστασης του Πετρελαίου	79
4.6.1	Προετοιμασία Δείγματος	79
4.6.2	GC/MS Ανάλυση	80
4.6.2.1	Εναλλακτική Διαδικασία Καθαρισμού του δείγματος προς GC/MS Ανάλυση.....	81
4.6.2.2	Διαδικασία Ανάλυσης στο GC/MS.....	81
5	Επεξεργασία-Συζήτηση Αποτελεσμάτων	87
5.1	Διάλυμα Ελέγχου (Control)	87
5.1.1	Φυσικές Παρατηρήσεις.....	87
5.1.2	GC-MS Ανάλυση	88
5.1.3	MPN Ανάλυση	97
5.2	Διάλυμα S200	100
5.2.1	Φυσικές Παρατηρήσεις.....	100
5.2.2	GC-MS Ανάλυση	101
5.2.3	MPN Ανάλυση	109
5.3	Διάλυμα UL	111
5.3.1	Φυσικές Παρατηρήσεις.....	111
5.3.2	GC-MS Ανάλυση	112
5.3.3	MPN Ανάλυση	120
5.4	Διάλυμα ULR.....	122
5.4.1	Φυσικές Παρατηρήσεις.....	122
5.4.2	GC-MS Ανάλυση	123
5.4.3	MPN Ανάλυση	131
5.5	Διάλυμα ULRM	133
5.5.1	Φυσικές Παρατηρήσεις.....	133
5.5.2	GC-MS Ανάλυση	134
5.5.3	MPN Ανάλυση	142
6	Συγκριτικά Αποτελέσματα-Συνολικά Συμπεράσματα.....	145

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ

Πίνακας 1.1: Πετρελαιοκηλίδες από δεξαμενόπλοια στα διεθνή ύδατα	2
Πίνακας 1.2: Συμβατικές Μέθοδοι Καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων	8
Πίνακας 2.1: Χημική σύσταση και φυσικές ιδιότητες αντιπροσωπευτικών αργών πετρελαίων [24]	19
Πίνακας 2.2: Κατάταξη ακτών με κριτήριο τις επιπτώσεις για την χλωρίδα και πανίδα των θαλάσσιων ακτών (όπου 1 είναι η λιγότερο ευαίσθητη και 10 η πιο ευαίσθητη σε ότι αφορά τη ρύπανση με πετρέλαιο και τις μεθόδους αντιμετώπισης αυτής)	26
Πίνακας 2.3: Αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί ικανοί να αποικοδομήσουν πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες [39].....	28
Πίνακας 2.4: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης.....	42
Πίνακας 3.1: Σημαντικότερα είδη θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιοαποικοδόμηση πετρελαίου.....	46
Πίνακας 3.2: Παράγοντες βιοαποικοδόμησης στο NCP κατάλογο προϊόντων [91]	49
Πίνακας 3.3: Ικανότητα διαφόρων πηγών αζώτου και φωσφόρου στην αποικοδόμηση του πετρελαίου.....	56
Πίνακας 3.4: Μικροβιακή ανάπτυξη και βαθμός αποικοδόμησης πετρελαίου από διάφορες πηγές αζώτου.....	58
Πίνακας 4. 1: Πειραματικός σχεδιασμός.....	67
Πίνακας 4. 2: Προτεινόμενο φύλλο εργασίας.....	73
Πίνακας 4. 3: Σύγκριση αποτελεσμάτων λογιστικού φύλλου επεξεργασίας με τιμές MPN που χρησιμοποιήθηκαν για δεκαδικές διαλύσεις σε πέντε σωλήνες ανά αραιώση (όπως αναφέρεται στους Cochran,1950; Alexander,1982)	74
Πίνακας 4. 4: Σύγκριση αποτελεσμάτων λογιστικού φύλλου επεξεργασίας με δημοσιευμένες τιμές MPN από άλλες πηγές που χρησιμοποιούν έξι επίπεδα αραιώσης	74
Πίνακας 4. 5: Ταξινόμηση Αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης	83
Πίνακας 4. 6: Πρωτεύοντα ιόντα για τον κάθε αναλύτη στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS	84
Πίνακας 4. 7: Αναλύτες και συστατικά αναφοράς	85
Σχήμα 5. 1: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ελέγχου	95
Σχήμα 5. 2: Συγκέντρωση των αλκανίων στο δείγμα ελέγχου τις ημέρες 0, 7 και 18.....	96
Σχήμα 5. 3: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου.....	98
Σχήμα 5. 4: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα).....	99
Σχήμα 5. 5: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα)	99
Σχήμα 5. 6: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα S-200.....	108
Σχήμα 5. 7: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα S200 τις ημέρες 0, 7 και 18.....	109
Σχήμα 5. 8: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200	110
Σχήμα 5. 9: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200	110

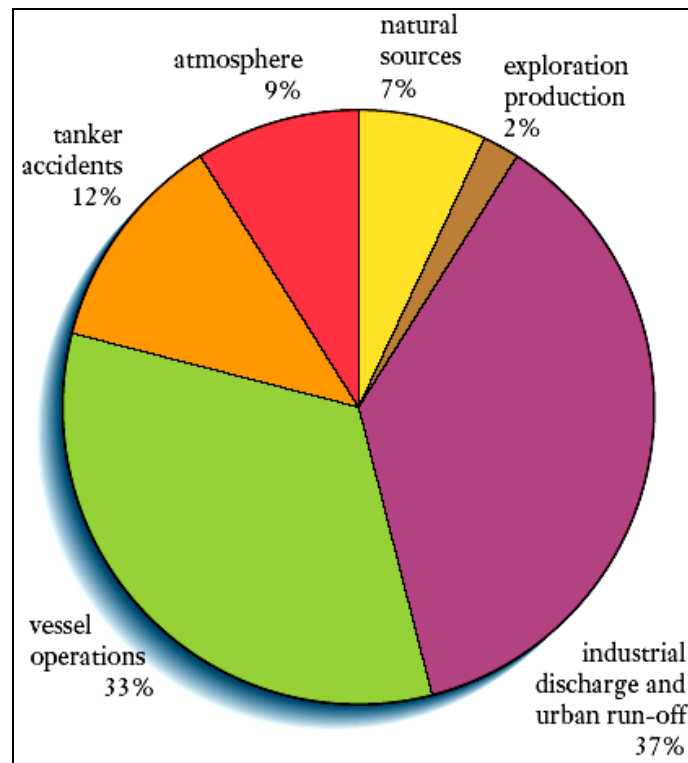
Σχήμα 5. 10: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200	111
Σχήμα 5. 11: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα UL	119
Σχήμα 5. 12: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα UL τις ημέρες 0, 7 και 18	120
Σχήμα 5. 13: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL	121
Σχήμα 5. 14: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL	121
Σχήμα 5. 15: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL	122
Σχήμα 5. 16: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ULR	130
Σχήμα 5. 17: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα ULR τις ημέρες 0, 7 και 18	131
Σχήμα 5. 18: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR	132
Σχήμα 5. 19: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR	132
Σχήμα 5. 20: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR	133
Σχήμα 5. 21: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ULRM	141
Σχήμα 5. 22: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα ULRM τις ημέρες 0, 7 και 18	142
Σχήμα 5. 23: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM	143
Σχήμα 5. 24: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM	143
Σχήμα 5. 25: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM	144
Σχήμα 6. 1: Απομάκρυνση (%) των C19-C34 αλκανίων μετά από 18 μέρες σε όλα τα διαλύματα	150
Σχήμα 6. 2: Μικροβιακή ανάπτυξη μετά από 18 μέρες σε όλα τα διαλύματα	151
Σχήμα 6. 3: Απομάκρυνση (%) των C19-C34 αλκανίων κατα στην 7η και 18η ημέρα δειγματοληψίας στα UL, ULR και ULRM διαλύματα	152
Σχήμα 6. 4: Μικροβιακή ανάπτυξη την 7η και 18η μέρα για τα UL, ULR και ULRM διαλύματα	153
Εικόνα 1.1: Κύριες εισαγωγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον [2]	1
Εικόνα 1.2: Αριθμός πετρελαιοκηλίδων πάνω από 700 τόνους	4
Εικόνα 1.3: Ποσότητες πετρελαίου που διαρρέουν στο θαλάσσιο περιβάλλον ύστερα από ατύχημα	5
Εικόνα 1.4: Τοποθεσίες επιλεγμένων πετρελαιοκηλίδων [4]	6
Εικόνα 1.5: Καταστροφικές συνέπειες των πετρελαιοκηλίδων	7
Εικόνα 1.6: Τεχνικές Αντιμετώπισης-Καθαρισμού των Πετρελαιοκηλίδων	11
Εικόνα 2.1: Αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο	18
Εικόνα 2.2: Σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης σε μια πετρελαιοκηλίδα [28]	21
Εικόνα 2.3: Μια μέση πετρελαιοκηλίδα πάνω στο νερό θα ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο σχέδιο. Το μήκος της γραμμής δείχνει την διάρκεια του κάθε σταδίου και το πάχος της γραμμής δείχνει την πιο κρίσιμη φάση κάθε σταδίου [2].	24
Εικόνα 2.4: Σχηματισμός νερό σε πετρέλαιο γαλακτωμάτων και σταθεροποίηση τους από επιφανειοδραστικές ενώσεις	37
Εικόνα 2.5: Δομές των χοπανίων [69]	40

Μαρία Νικολοπούλου-Μεταπτυχιακή Διατριβή
Πολυτεχνείο Κρήτης
X

1 Εισαγωγή

1.1 Περιστατικά Πετρελαιοκηλίδων

Η σύγχρονη κοινωνία συνεχίζει να στηρίζεται στη χρήση των υδρογονανθράκων πετρελαίου για τις ενεργειακές ανάγκες της. Παρά τις πρόσφατες τεχνολογικές προόδους, τα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες του αργού πετρελαίου και των ραφιναρισμένων προϊόντων του εμφανίζονται σε συχνή βάση κατά τη διάρκεια των διεργασιών εξαγωγής, μεταφοράς, αποθήκευσης, ραφινάρισματος και διανομής. Υπολογίζεται ότι μεταξύ 1,7 και 8,8 εκατομμυρίων μετρικών τόνων του πετρελαίου απελευθερώνεται στο υδάτινο περιβάλλον κάθε έτος [1], των οποίων περισσότερο από 90% συσχετίζεται άμεσα με τις ανθρώπινες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένης της σκόπιμης διάθεσης αποβλήτων. Αντίθετα με την κοινή αντίληψη, μόνο το 12% του πετρελαίου που απελευθερώνεται στο υδρόβιο περιβάλλον είναι από τα ατυχήματα δεξαμενόπλοιων.



Εικόνα 1.1: Κύριες εισαγωγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον [2]

Κατ' εκτίμηση 1000000000 τόνοι, το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής πετρελαίου που φορτώνεται ετησίως σε δεξαμενόπλοια, μεταφέρεται μέσω της Μεσογείου. Από αυτούς, κατ' εκτίμηση 330000 τόνοι αποβάλλονται σκόπιμα σε αυτήν την κλειστή θάλασσα, ενώ τα ατυχήματα αποτελούν μια πρόσθετη πηγή ρύπανσης 1.000000 τόνων ετησίως. Οι προκύπτουσες κηλίδες πετρελαίου ξεβράζονται στην ξηρά από τους ανέμους επάνω στις πυκνά κατοικημένες μεσογειακές ακτές. Παρά την υψηλή ευαισθησία της Μεσογείου στα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες, με βάση τη βιβλιογραφία οι προσπάθειες αντιμετώπισης αυτών των διαρροών πετρελαίου σε αυτήν την ευαίσθητη περιοχή είναι λιγοστές [3].

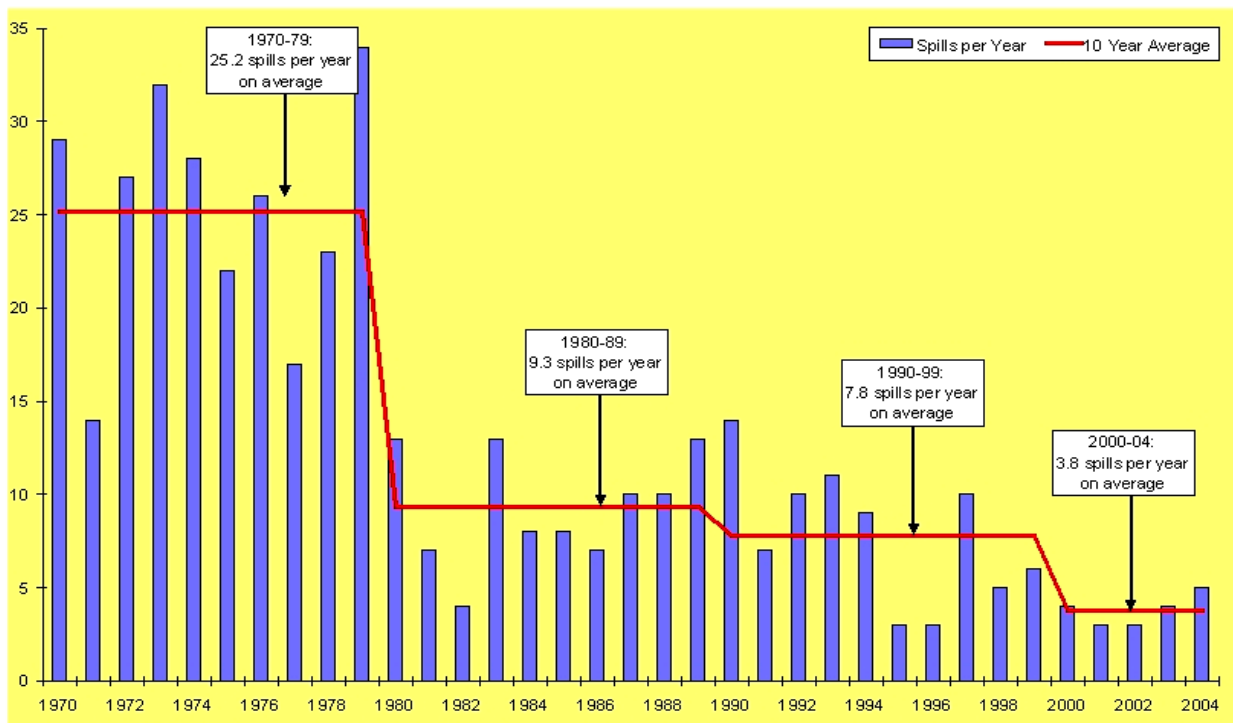
Ο πίνακας 1.1 συνοψίζει τους αριθμούς πετρελαιοκηλίδων και τις ποσότητες απελευθέρωσης από το 1970 έως το 1999 βασισμένος στη βάση δεδομένων του International Tanker Owners Pollution Federation's oil spill database [4].

Πίνακας 1.1: Πετρελαιοκηλίδες από δεξαμενόπλοια στα διεθνή ύδατα

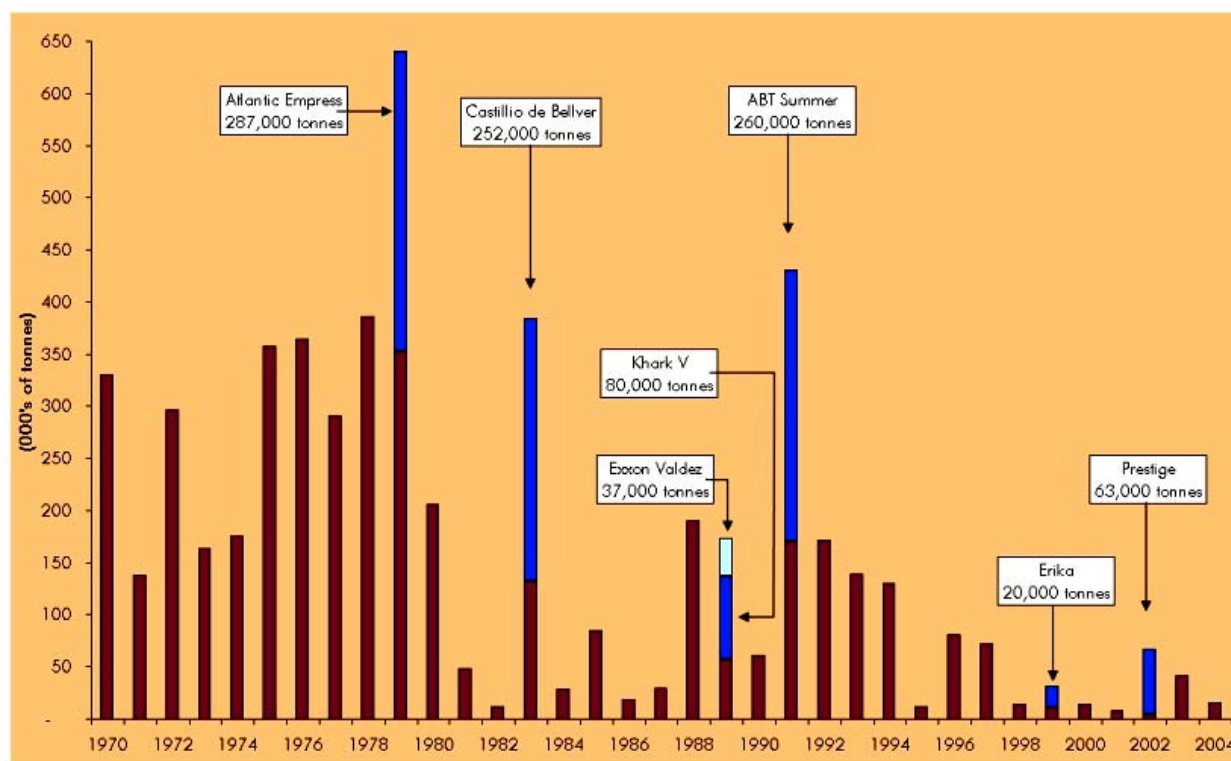
Έτος	7-700 τόνοι	>700 τόνοι	Ποσότητα (τόνοι)
1970	6	29	330.000
1971	18	14	138.000
1972	48	27	297.000
1973	27	32	164.000
1974	89	28	175.000
1975	95	22	357.000
1976	67	26	364.000
1977	68	17	291.000
1978	58	23	386.000
1979	60	34	640.000
1970s			Total 3.142.000
1980	52	13	206.000
1981	54	7	48.000

1982	45	4	12.000
1983	52	13	384.000
1984	25	8	28.000
1985	31	8	85.000
1986	27	7	19.000
1987	27	10	30.000
1988	11	10	190.000
1989	32	13	174.000
1980s			Total 1.176.000
1990	51	14	61.000
1991	29	7	430.000
1992	31	10	172.000
1993	31	11	139.000
1994	26	9	130.000
1995	20	3	12.000
1996	20	3	80.000
1997	28	10	72.000
1998	25	5	13.000
1999	19	6	31.000
1990s			Total 1.140.000
2000	19	4	14.000
2001	16	3	8.000
2002	12	3	67.000*
2003	14	4	42.000
2004	12	5	15.000

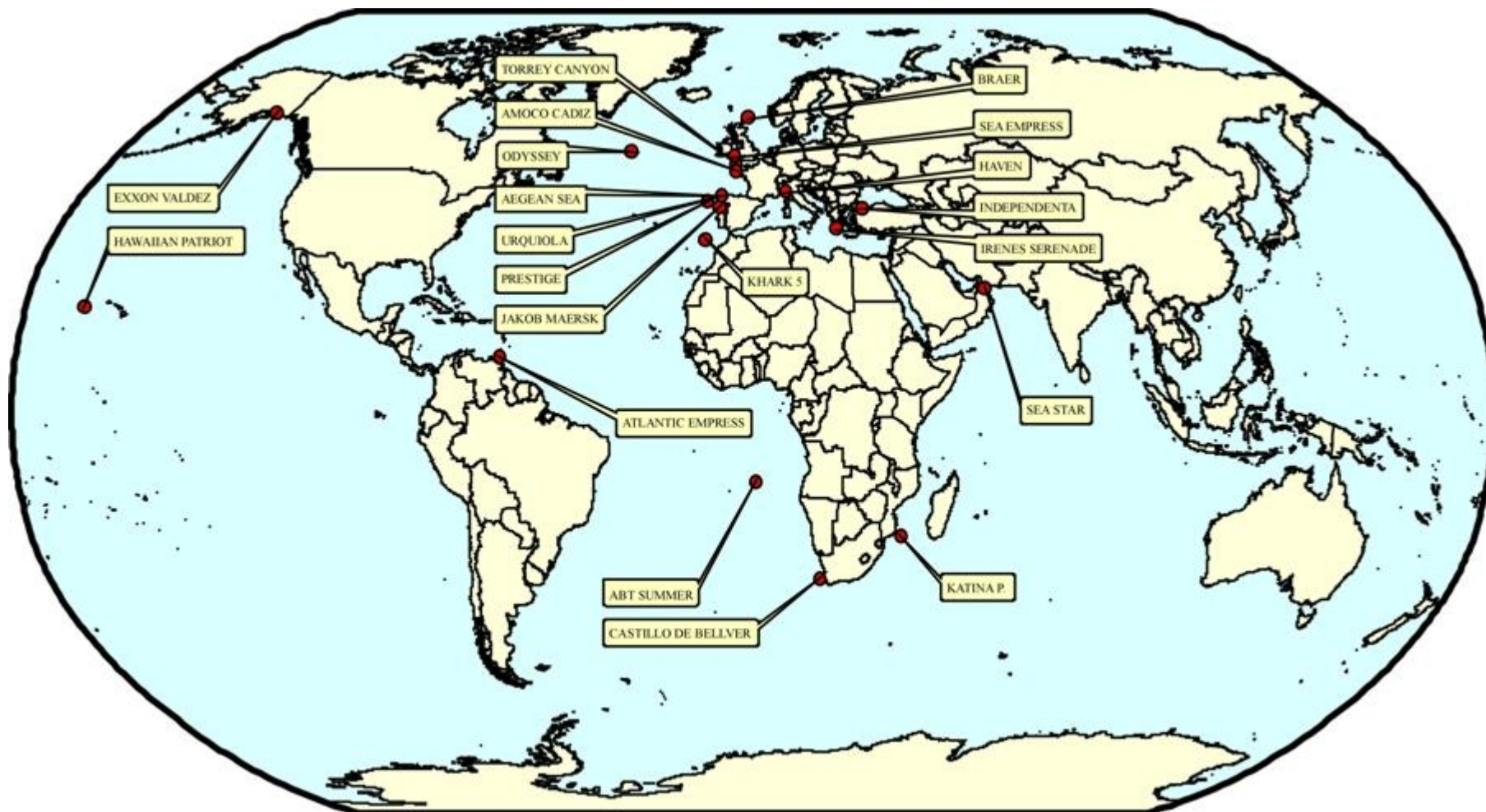
Είναι αξιοσημείωτο ότι μερικά πολύ μεγάλα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες είναι υπεύθυνα για το υψηλό ποσοστό πετρελαίου που διαρρέει στο θαλάσσιο περιβάλλον. Παραδείγματος χάριν, κατά τη δεκαετή περίοδο 1990-1999 υπήρξαν 358 πετρελαιοκηλίδες πάνω από 7 τόνους, που συμπληρώνουν συνολικά 1140 χιλιάδες τόνους, αλλά οι 830 χιλιάδες τόνοι (73%) χύθηκαν σε μόλις 10 ατυχήματα (μόλις κάτω του 3%). Οι αριθμοί για ένα συγκεκριμένο έτος μπορούν επομένως να διαστρεβλωθούν σοβαρά από ένα μεμονωμένο μεγάλο ατύχημα. Αυτό διακρίνεται σαφώς το 1979 (Atlantic Empress - 287.000 τόνοι), το 1983 (Castillo de Bellver - 252.000 τόνοι) και το 1991 (ABT Summer - 260.000 τόνοι) [4].



Εικόνα 1.2: Αριθμός πετρελαιοκηλίδων πάνω από 700 τόνους



Εικόνα 1.3: Ποσότητες πετρελαίου που διαρρέουν στο θαλάσσιο περιβάλλον ύστερα από ατύχημα



Εικόνα 1.4: Τοποθεσίες επιλεγμένων πετρελαιοκηλίδων [4]

Οι θαλάσσιες ακτές είναι σημαντικοί δημόσιοι και οικολογικοί πόροι που αποτελούν το σπίτι για ποικίλα είδη της άγριας φύσης και παρέχουν δημόσια αναψυχή. Οι θαλάσσιες πετρελαιοκηλίδες, ιδιαίτερα τα ατυχήματα μεγάλης κλίμακας, έχουν θέσει σε μεγάλο κίνδυνο και έχουν προκαλέσει εκτενή ζημιά στα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα. Παραδείγματος χάριν, η πετρελαιοκηλίδα 37.000 τόνων αργού πετρελαίου North Slope στον Prince William Sound, της Αλάσκας, από το *Exxon Valdez* το 1989 που οδήγησε στη θνησιμότητα χιλιάδων θαλασσοπουλιών και θαλάσσιων θηλαστικών, σε σημαντική μείωση του πληθυσμού πολλών οργανισμών και σε πολλές μακροπρόθεσμες περιβαλλοντικές επιδράσεις (εικόνα 1.5) [5].



Εικόνα 1.5: Καταστροφικές συνέπειες των πετρελαιοκηλίδων

Αυτά τα καταστροφικά ατυχήματα, ειδικά η πετρελαιοκηλίδα του *Exxon Valdez*, έχουν αυξήσει τη δημόσια ευαισθητοποίηση για τους κινδύνους που περιλαμβάνονται κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά του πετρελαίου και των προϊόντων πετρελαίου και έχουν οδηγήσει σε πιο αυστηρούς κανονισμούς. Εντούτοις, επειδή το πετρέλαιο χρησιμοποιείται ευρέως, παρά όλες τις προφυλάξεις, είναι σχεδόν σίγουρο ότι πετρελαιοκηλίδες και διαρροές θα συνεχίσουν να εμφανίζονται. Κατά συνέπεια, είναι ουσιαστικό να υπάρχουν τα αποτελεσματικά αντίμετρα για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

1.2 Τρόποι Αντιμετώπισης των Πετρελαιοκηλίδων σε Παράκτια Θαλάσσια Περιβάλλοντα

Οι στρατηγικές για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων επηρεάζονται πολύ από ποικίλους παράγοντες, όπως ο τύπος του πετρελαίου, τα χαρακτηριστικά της πληγείσας περιοχής και περιστασιακά από τις πολιτικές εκτιμήσεις. Διάφορες προσεγγίσεις και τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αναθεωρηθεί και έχουν περιγραφεί εκτενώς σε διάφορα τεχνικά έγγραφα, όπως: *Shoreline Countermeasure Manual* [6], *Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response* [7], *Understanding Oil Spills and Oil Spill Response* [8], and *Oil Spill Response in the Marine Environment* [9]. Στον πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι πιο κοινές τεχνολογίες αντιμετώπισης.

Πίνακας 1.2: Συμβατικές Μέθοδοι Καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων

Κατηγορία Μεθόδων Αντιμετώπισης	Τεχνολογία
Φυσικές Μέθοδοι	Φυσική Βιοεξυγίανση

Μη Χημικές Μέθοδοι	Booming Skimming Manual removal (Wiping) Mechanical removal Washing Sediment relocation/Surf-washing Tiling In-situ burning
Χημικές Μέθοδοι	Dispersants Demulsifiers Solidifiers Surface film chemicals

1.2.1 Φυσικές Μέθοδοι

Η φυσική βιοεξυγίανση (natural attenuation) ή η φυσική αποκατάσταση είναι βασικά η επιλογή όπου δεν λαμβάνεται κάποιο μέτρο έτσι το πετρέλαιο αφήνεται να απομακρυνθεί ή να αποικοδομηθεί με φυσικά μέσα. Για μερικές πετρελαιοκηλίδες, είναι πιθανότατα πιο αποδοτικό οικονομικά και οικολογικά υγιές να αφεθεί η ρυπασμένη με πετρέλαιο περιοχή να ανακτηθεί φυσικά από το να γίνει επέμβαση σε αυτήν. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι οι πετρελαιοκηλίδες σε μακρινές ή απρόσιτες τοποθεσίες όταν τα φυσικά ποσοστά απομάκρυνσης είναι γρήγορα, ή πετρελαιοκηλίδες σε ευαίσθητες περιοχές όπου οι ενέργειες καθαρισμού (cleanup actions) μπορούν να προκαλέσουν περισσότερη ζημιά από καλό. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι όταν χρησιμοποιείται φυσική βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού, απαιτείται ένα πρόγραμμα παρακολούθησης για να αξιολογηθεί η απόδοση της.

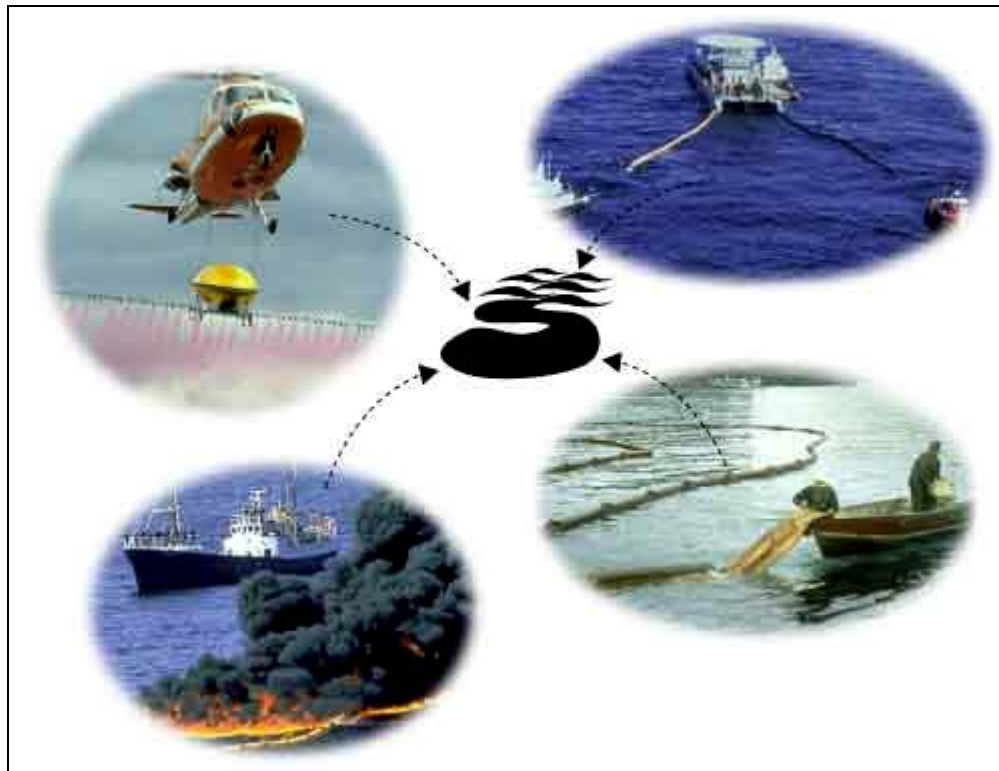
1.2.2 Μη Χημικές Μέθοδοι

Η μη χημικές μέθοδοι συγκράτησης και αποκατάστασης του μαζικού ή ελεύθερου πετρελαίου είναι η πρωταρχική επιλογή αντιμετώπισης στις Ηνωμένες Πολιτείες για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Οι συνήθεις χρησιμοποιημένες μη χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν:

- Booming and skimming: Χρήση των πλωτών φραγμών για να συγκρατηθεί και να ελεγχθεί η μετακίνηση του επιπλέοντος πετρελαίου και χρήση των εξαφριστών για να ανακτηθεί. Η περιβαλλοντική επίδραση αυτής της μεθόδου είναι ελάχιστη εάν ελέγχεται η κυκλοφορία του εργατικού δυναμικού καθαρισμού.
- Wiping with absorbent materials: Χρήση υδροφοβικών υλικών για την απομάκρυνση του πετρελαίου επάνω από τη μολυσμένη επιφάνεια. Αν και η διάθεση των ρυπασμένων απορριμμάτων είναι ένα ζήτημα, η περιβαλλοντική επίπτωση αυτής της μεθόδου είναι επίσης περιορισμένη εάν η κυκλοφορία των πληρωμάτων καθαρισμού και η παραγωγή αποβλήτων ελέγχεται.
- Μηχανική απομάκρυνση: Συλλογή και απομάκρυνση των ρυπασμένων επιφανειών με πετρέλαιο, των ιζημάτων χρησιμοποιώντας μηχανικό εξοπλισμό. Αυτή η μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν μικρά ποσά υλικών με πετρέλαιο. Δεν πρέπει να ληφθεί υπόψη στον καθαρισμό των ευαίσθητων βιότοπων ή όπου η διάβρωση είναι ζήτημα.
- Πλύση: έκπλυση του πετρελαίου που εμμένει κατά μήκος των ακτών στο νερό για συλλογή. Οι στρατηγικές έκπλυσης κυμαίνονται από χαμηλής πίεσεως έκπλυση με κρύο νερό σε έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Αυτή η μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται ειδικά με υψηλή πίεση ή καυτό νερό, πρέπει να αποφεύγεται σε υγράτους ή άλλους ευαίσθητους βιότοπους.
- Sediment relocation and tilling: Μετακίνηση του ρυπασμένου με πετρέλαιο ιζήματος από το ένα τμήμα της παραλίας σε άλλο ή με επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling) και αναμιξη του ρυπασμένου ιζήματος για να ενισχυθεί ο φυσικός καθαρισμός μέσω της διασποράς του πετρελαίου στην υδάτινη στήλη και την προώθηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πετρελαίου και των ανόργανων σωματιδίων. Η

επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διείσδυση του πετρελαίου βαθιά στα ιζήματα των ακτών. Οι πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις από την απελευθέρωση του πετρελαίου και τα ρυπασμένα ιζήματα στα παρακείμενα υδάτινα στρώματα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη.

- *In-situ* burning: Το πετρέλαιο στην ακτή καίγεται συνήθως όταν βρίσκεται πάνω σε καύσιμο υπόστρωμα όπως η βλάστηση, τα κούτσουρα και άλλα συντρίμια. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προκαλέσει σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή των φυτών και των ζώων.



Εικόνα 1.6: Τεχνικές Αντιμετώπισης-Καθαρισμού των Πετρελαιοκηλίδων

1.2.3 Χημικές Μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι, ιδιαίτερα οι χημικές ενώσεις διασποράς (dispersants), έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως σε πολλές χώρες ως επιλογή αντιμετώπισης. Για μερικές χώρες,

όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, όπου οι δύσκολες παράκτιες συνθήκες μπορούν να καταστήσουν τη μηχανική αντιμετώπιση προβληματική, οι χημικές ενώσεις διασποράς είναι η αρχική επιλογή [10]. Εντούτοις, οι χημικές μέθοδοι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω της διαφωνίας σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και της ανησυχίας περί τοξικότητας και μακροπρόθεσμων περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους ([8]). Σημαντικοί υπάρχοντες χημικοί παράγοντες είναι:

Χημικές ενώσεις διασποράς: παράγοντες διασποράς (dispersing agents), που περιέχουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες, χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια για να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη προτού το πετρέλαιο φθάσει και μολύνει την ακτή. Αυτό η πρακτική χρησιμοποιείται για να μειωθούν οι τοξικές επιδράσεις του πετρελαίου με τη διάλυση του σε κατώτατες συγκεντρώσεις και να επιταχυνθεί ο ρυθμός βιοδιάσπασης του με την αύξηση της αποτελεσματικής περιοχής επιφάνειάς του.

Demulsifiers: Χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τα πετρέλαιο σε νερό (oil-in-water) γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά.

Solidifiers: Οι χημικές ουσίες που ενισχύουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν το πετρέλαιο, για να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση και για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης.

Surface film chemicals: Οι film-forming agents μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποτρέψουν το πετρέλαιο από το να προσκολληθεί στα υποστρώματα των ακτών και για να ενισχύσουν την αφαίρεση του πετρελαίου που εμμένει στις επιφάνειες με διαδικασίες έκπλυσης με πίεση.

1.3 Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως Τεχνολογία Καθαρισμού Πετρελαιοκηλίδων

Αν και οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η φυσική απομάκρυνση (physical removal), είναι ο πρώτος τρόπος αντιμετώπισης, σπάνια επιτυγχάνουν τον πλήρη καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων. Σύμφωνα με το Office of Technology Assessment [11], οι τρέχουσες

μηχανικές μέθοδοι ανακτούν χαρακτηριστικά λιγότερο από 10-15 τοις εκατό του πετρελαίου μετά από μία μεγάλης έκτασης πετρελαιοκηλίδα. Η βιοεξυγίανση έχει προκύψει ως μια από τις πιο ελπιδοφόρες δευτεροβάθμιες επιλογές επεξεργασίας (secondary treatment options) για την απομάκρυνση πετρελαίου μετά από την επιτυχή εφαρμογή της στο ατύχημα του *Exxon Valdez* του 1989 ([12],[13]). Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως "η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης" ([14]). Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπάσιμο στη φύση ([15], [16], [17]). Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τη δυνατότητα να καθιερωθούν και να διατηρηθούν οι συνθήκες που ευνοούν τους ρυθμούς ενισχυμένης βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο ρυπασμένο περιβάλλον. Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων:

- *Βιοενίσχυση (bioaugmentation)*, στην οποία γνωστά βακτήρια που αποικοδομούν το πετρέλαιο προστίθενται για να συμπληρώσουν τον υπάρχοντα μικροβιακό πληθυσμό, και
- *Βιοδιέγερση (biostimulation)*, στην οποία η αύξηση των γηγενών μικροβιακών αποδομητών πετρελαίου υποκινείται με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών ή άλλων περιοριστικών υποστρωμάτων, ή/και από τις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. έκπλυση από τα κύματα (surf-washing), προσθήκη οξυγόνου από την ανάπτυξη των φυτών, κ.λπ.).

Τόσο οι εργαστηριακές μελέτες όσο και οι μελέτες πεδίου έχουν δείξει ότι η βιοεξυγίανση, και η βιοδιέγερση ειδικότερα, μπορεί να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στις ρυπασμένες ακτές ([17], [18]). Οι πρόσφατες μελέτες στο πεδίο επίσης έχουν καταδείξει ότι η βιοδιέγερση είναι αποτελεσματικότερη προσέγγιση επειδή η προσθήκη μικροοργανισμών που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες δεν θα ενισχύσει την διάσπαση πετρελαίου περισσότερο από την απλή προσθήκη θρεπτικών ([19], [20] δείτε το κεφάλαιο 2 λεπτομερώς). Η βιοεξυγίανση έχει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνολογιών. Κατ' αρχάς, η εφαρμογή της βιοεξυγίανσης είναι σχετικά ανέξοδη. Παραδείγματος χάριν, κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας του *Exxon Valdez*, το κόστος βιοεξυγίανσης 120 χλμ ακτής ήταν λιγότερο από τις δαπάνες μιας ημέρας για φυσική έκπλυση (physical washing) ([21]). Η βιοεξυγίανση είναι επίσης μια πιο

περιβαλλοντικά φιλική τεχνολογία δεδομένου ότι περιλαμβάνει την τελική αποικοδόμηση του πετρελαίου σε ανόργανα προϊόντα (όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό), ενώ οι φυσικές και χημικές μέθοδοι μεταφέρουν χαρακτηριστικά το ρυπαντή από το ένα περιβαλλοντικό διαμέρισμα σε άλλο. Δεδομένου ότι είναι βασισμένη σε φυσικές διεργασίες και είναι λιγότερο παρεισφρητική και αποσυνδετική για τη ρυπασμένη περιοχή, αυτή η "πράσινη τεχνολογία" μπορεί επίσης να είναι πιο αποδεκτή στο ευρύ κοινό.

Η βιοεξυγίανση όπως άλλες τεχνολογίες έχει επίσης τους περιορισμούς της. Η βιοεξυγίανση περιλαμβάνει ιδιαίτερα ετερογενείς και σύνθετες διεργασίες. Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης πετρελαίου εξαρτάται από την κατοχή των κατάλληλων μικροοργανισμών στο πεδίο με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η λειτουργική χρήση της μπορεί να περιοριστεί από τη σύνθεση του πετρελαίου. Η βιοεξυγίανση είναι επίσης μια σχετικά αργή διαδικασία, που απαιτεί εβδομάδες έως μήνες για να εφαρμοστεί, η οποία μπορεί να μην είναι εφικτή όταν απαιτείται άμεσος καθαρισμός. Ανησυχίες προκύπτουν επίσης από τα πιθανά δυσμενή αποτελέσματα που συνδέονται για με την εφαρμογή των παραγόντων βιοεξυγίανσης (bioremediation agents). Αυτά περιλαμβάνουν την τοξικότητα των ιδίων των παραγόντων βιοεξυγίανσης και των μεταβολικών παραπροϊόντων της αποικοδόμησης του πετρελαίου και τον πιθανό ευτροφισμό που συνδέεται με τον θρεπτικό εμπλουτισμό [18]. Η βιοεξυγίανση έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα οικονομικό εργαλείο επεξεργασίας, εάν χρησιμοποιείται κατάλληλα, στον καθαρισμό ορισμένων ρυπασμένων με πετρέλαιο περιβαλλόντων. Έχουν παρατηρηθεί λίγα καταστρεπτικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή της στο πεδίο.

Αυτήν την περίοδο, μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην εφαρμογή της βιοεξυγίανσης πετρελαίου είναι η έλλειψη οδηγιών σχετικά με το πότε και πώς να χρησιμοποιηθεί αυτή η τεχνολογία. Αν και έχει πραγματοποιηθεί εκτενής έρευνα για τη βιοεξυγίανση πετρελαίου κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι περισσότερες υπάρχουσες μελέτες έχουν επικεντρωθεί είτε στην αξιολόγηση της δυνατότητας πραγματοποίησης της βιοεξυγίανσης για την αντιμετώπιση της ρύπανσης πετρελαίου, είτε στη δοκιμή προϊόντων και μεθόδων [22]. Έχει πραγματοποιηθεί περιορισμένος αριθμός δοκιμών πιλοτικής κλίμακας και δοκιμών πεδίου, που μπορούν να παρέχουν πιο πειστικές επιδείξεις αυτής της τεχνολογίας. Πολλές δοκιμές πεδίου δεν έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα, δεν έχουν ελεγχθεί καλά ή δεν έχουν αναλυθεί σωστά, οδηγώντας σε σκεπτικισμό και σύγχυση την κοινότητα χρηστών [23]. Υπάρχει άμεση ανάγκη για ένα λεπτομερές και

εφαρμόσιμο σύνολο οδηγιών για την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας από τους αποκριτές των πετρελαιοκηλίδων που να απαντά στις ερωτήσεις όπως πότε να χρησιμοποιηθεί η βιοεξυγίανση, ποιοι παραγόντες βιοεξυγίανσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν, πώς να τους εφαρμόσουν και πώς να ελέγξουν και να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα. Επιστημονικά δεδομένα για την υποστήριξη ενός λειτουργικού εγγράφου οδηγιών έχουν παρασχεθεί πρόσφατα από εργαστηριακές μελέτες και δοκιμές πεδίου που πραγματοποιούνται από την U.S. Environmental Protection Agency (EPA), το πανεπιστήμιο του Cincinnati, και από τον οργανισμό Fisheries and Oceans Canada.

2 Παράγοντες που Επιδρούν στην Φυσική Βιοαποικοδόμηση του Πετρελαίου και στην Επιτυχία της Βιοεξυγίανσης

Η βιοεξυγίανση του πετρελαίου είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις του πετρελαίου και των μικροοργανισμών υπό τις συνθήκες του επικρατούντος περιβάλλοντος. Για να γίνει κατανοητό το πεδίο και οι στρατηγικές της βιοεξυγίανσης του πετρελαίου, είναι ουσιαστικό πρώτα να καταλάβει κανείς τις ιδιότητες του πετρελαίου, το εμπλεκόμενο περιβάλλον (π.χ., θαλάσσιες ακτές), τη τύχη του πετρελαίου σε εκείνο το περιβάλλον, τους μηχανισμούς της βιοδιάσπασης πετρελαίου και τους παράγοντες που ελέγχουν το ρυθμό βιοδιάσπασης του.

2.1 Φυσικό-Χημικές Ιδιότητες του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του

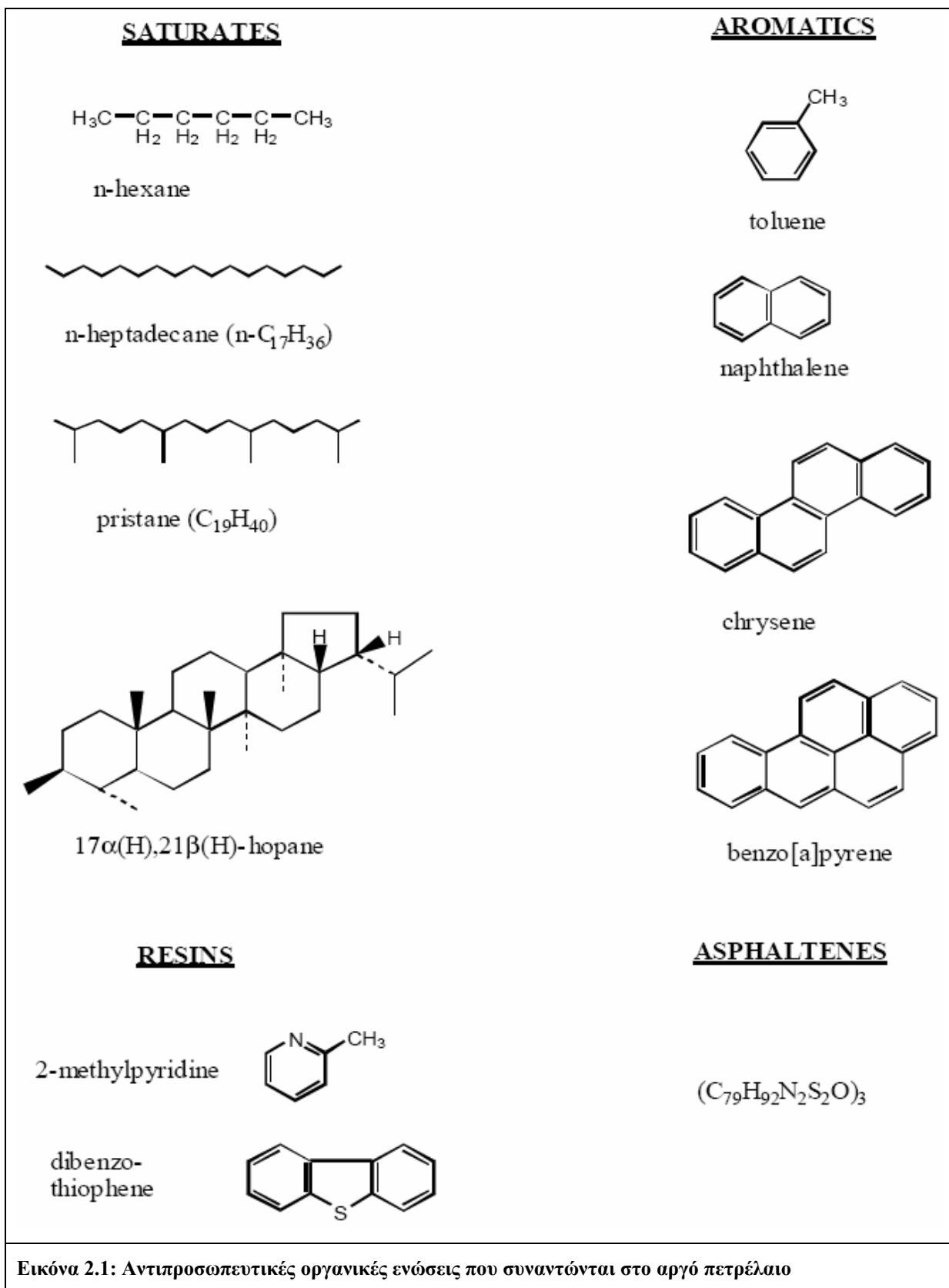
Το αργό πετρέλαιο και τα πετρελαιοειδή είναι πολύ σύνθετα και μεταβλητά μίγματα χιλιάδων μεμονωμένων ενώσεων που εκθέτουν έτσι ένα ευρύ φάσμα φυσικών ιδιοτήτων. Η κατανόηση αυτών των ιδιοτήτων είναι σημαντική στον καθορισμό της συμπεριφοράς της πετρελαιοκηλίδας και της κατάλληλης τεχνικής αντιμετώπισης. Η σύνθεση και οι ιδιότητες των διάφορων πετρελαϊκών υδρογονανθράκων πετρελαίου έχουν περιγραφεί λεπτομερώς ([24], [1]). Υπάρχουν επίσης μεγάλες βάσεις δεδομένων ιδιοτήτων πετρελαίου όπως αυτή που βρίσκεται στο διαδίκτυο από το Environment Canada (www.etcentre.org/spills), το οποίο περιέχει πληροφορίες για πάνω από 400 είδη πετρελαίων [25].

2.1.1 Χημική Σύσταση του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του

Το αργό πετρέλαιο αποτελείται τόσο από ενώσεις υδρογονανθράκων (αποτελούν το 50-98% της συνολικής σύνθεσης) όσο και από ενώσεις που δεν περιέχουν υδρογονάνθρακες (non-hydrocarbon) (που περιέχουν θείο, άζωτο, οξυγόνο και διάφορα ίχνη μετάλλων) σε μια

ευρεία σειρά συνδυασμών [24]. Η χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά διάφορων αργών πετρελαίων διακρίνονται στον πίνακα 2.1. Μερικές αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο αργό πετρέλαιο φαίνονται στην εικόνα 2.1. Τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες βασιζόμενοι στη διαφορετική διαλυτότητά τους στους οργανικούς διαλύτες [26].

1. Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες: Περιλαμβάνουν τα κανονικά και διακλαδισμένα αλκάνια με δομή C_nH_{2n+2} (αλειφατικά) και κυκλικά αλκάνια με δομή C_nH_{2n} (αλκυκυκλικά), τα οποία κυμαίνονται σε μήκος αλυσίδας από έναν άνθρακα έως και πάνω από 40 άνθρακες. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες είναι συνήθως τα συστατικά που υπάρχουν σε αφθονία στο αργό πετρέλαιο.
2. Αρωματικοί υδρογονάνθρακες: Περιλαμβάνουν τις μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις (π.χ., βενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλια) και τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) (π.χ., ναφθαλίνη, ανθρακένιο και φθενανθρένιο), οι οποίοι έχουν δύο ή περισσότερους συζυγείς αρωματικούς δακτυλίους. Τα PAHs είναι ιδιαίτερης περιβαλλοντικής σημασίας επειδή είναι πιθανές καρκινογόνες ουσίες ή μπορούν να μετασχηματιστούν σε καρκινογόνες ουσίες από το μικροβιακό μεταβολισμό.
3. Ρητίνες: Περιλαμβάνουν τις πολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, θείο και οξυγόνο (π.χ., πυριδίνες και θειοφαίνια). Αναφέρονται συχνά ως ενώσεις NSO.
4. Ασφαλτένια: Αποτελούνται από τις φτωχά χαρακτηρισμένες (poorly characterized) ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που περιλαμβάνουν τόσο υψηλού μοριακού βάρους όσο και φτωχά χαρακτηρισμένους υδρογονάνθρακες και NSOs. Τα μέταλλα όπως το νικέλιο, το βανάδιο και ο σίδηρος συνδέονται επίσης με τα ασφαλτένια.



Πίνακας 2.1: Χημική σύσταση και φυσικές ιδιότητες αντιπροσωπευτικών αργών πετρελαίων [24]

Χαρακτηριστικό ή Συστατικό	Prudhoe Bay	South Louisiana	Kuwait
API gravity (20°C)	27.8	34.5	31.4
Θείο (wt%)	0.94	0.25	2.44
Άζωτο(wt%)	0.23	0.69	0.14
Νικέλιο (ppm)	10	2.2	7.7
Βανάδιο (ppm)	20	1.9	28
Κλάσμα Νάφθας (wt%) ^a	23.2	18.6	28
Κορεσμένες Ενώσεις	19.9	16.5	20.3
Αρωματικές Ενώσεις	3.2	2.1	2.4
Ρητίνες & Ασφαλτένια	-	-	-
Κλάσμα υψηλού βρασμού (wt%) ^b	76.8	81.4	77.3
Κορεσμένες Ενώσεις	47.7	56.3	34
Αρωματικές Ενώσεις	25	16.5	21.9
Ρητίνες & Ασφαλτένια	4.1	8.6	21.4
^a	Κλάσμα που βράζει απο 20 έως 205 °C		
^b	Κλάσμα που βράζει πάνω απο 205 °C		

2.1.2 Φυσικές Ιδιότητες του Πετρελαίου

Σημαντικές φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του στο περιβάλλον και τις επιλεγμένες στρατηγικές αντιμετώπισης και καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων περιλαμβάνουν:

1. Πυκνότητα: Δύο τύποι εκφράσεων της πυκνότητας του πετρελαίου χρησιμοποιούνται συχνά: η ειδική πυκνότητα (specific gravity) και η πυκνότητα (API gravity) του American Petroleum Institute (API). Η ειδική πυκνότητα (specific gravity) είναι ο λόγος της μάζας μιας ουσίας στη μάζα του ισοδύναμου όγκου του νερού σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η πυκνότητα API (API gravity) ορίζει αυθαίρετα μια τιμή 10 για το καθαρό νερό στους 10 °C (60F). Η πυκνότητα API (API gravity)

μπορεί να υπολογιστεί από την ειδική πυκνότητα χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$API\ Gravity\ (^{\circ}) = \frac{141.5}{Specific\ Gravity\ (16\ ^{\circ}C / 60\ ^{\circ}F)} - 131.5$$

Τα πετρέλαια με μικρές πυκνότητες ή χαμηλές ειδικές πυκνότητες έχουν υψηλές API πυκνότητες. Το αργό πετρέλαιο έχει ειδική πυκνότητα με εύρος από 0,79 έως 1,00 (ισοδύναμες API πυκνότητες από 10 έως 48) [24]. Η πυκνότητα πετρελαίου είναι ένας σημαντικός δείκτης της σύνθεσης πετρελαίου που χρησιμοποιείται συχνά για να προβλέψει τη τύχη του στο νερό.

2. Ιξώδες: Το ιξώδες είναι η ιδιότητα ενός ρευστού που περιγράφει πώς αντιστέκεται σε μια αλλαγή στη μορφή ή τη μετακίνηση. Όσο χαμηλότερο ιξώδες έχει ένα ρευστό, τόσο ευκολότερα ρέει. Το ιξώδες του πετρελαίου συσχετίζεται με τη σύνθεση του πετρελαίου και την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Είναι ένας σημαντικός δείκτης του ρυθμού εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας.
3. Σημείο Ροής (Pour Point): Το σημείο ροής ενός πετρελαίου είναι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται ημιστερεό ή σταματά να ρέει. Το σημείο ροής του αργού πετρελαίου κυμαίνεται από -57 °C έως 32 °C. Είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό όσον αφορά την τύχη του πετρελαίου και τις στρατηγικές καθαρισμού.
4. Διαλυτότητα στο νερό: Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι εξαιρετικά χαμηλή και εξαρτάται από τη χημική σύνθεση του εν λόγω πετρελαϊκού υδρογονάνθρακα και τη θερμοκρασία. Για ένα χαρακτηριστικό αργό πετρέλαιο, η διαλυτότητα είναι περίπου 30 mg/L [1]. Τα πιο διαλυτά τμήματα πετρελαίου είναι οι χαμηλού μοριακού βάρους αρωματικές ουσίες όπως το βενζόλιο, το τολουόλιο και το ξυλόλιο. Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντική όσον αφορά τη τύχη του πετρελαίου, την τοξικότητα του πετρελαίου και τις διεργασίες βιοεξυγίανσης.

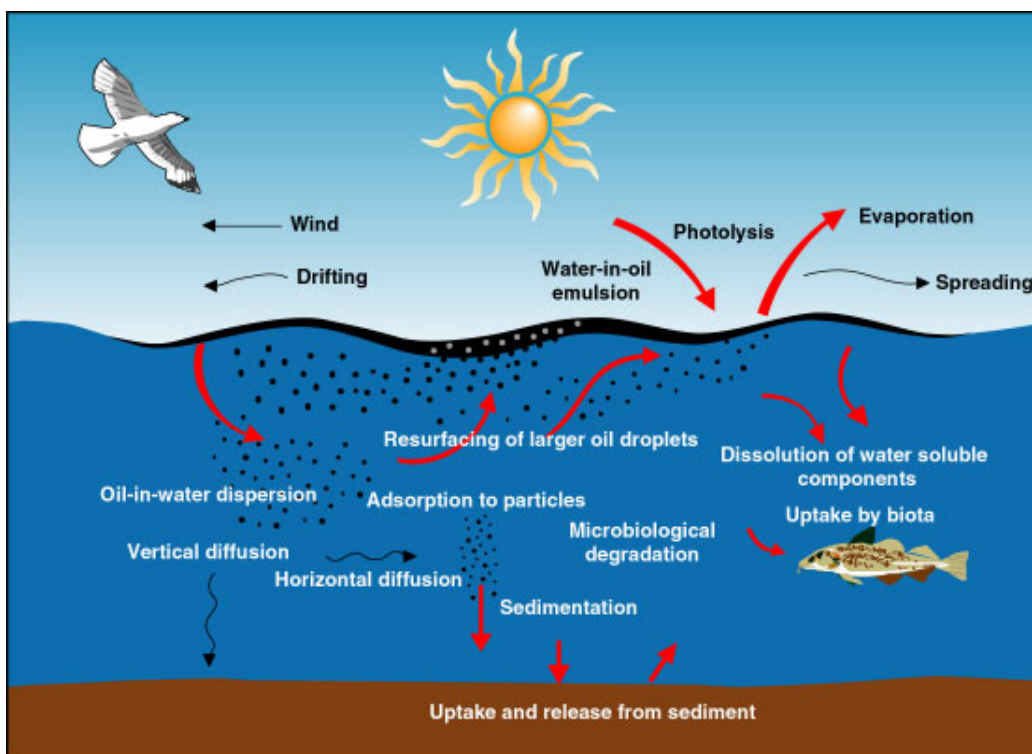
Άλλες σημαντικές φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου είναι το σημείο ανάφλεξης, η πίεση ατμού, η επιφανειακή τάση και η προσκόλληση (adhesion).

2.2 Συμπεριφορά του Πετρελαίου στο Περιβάλλον

2.2.1 Διεργασίες Γήρανσης (Weathering) Πετρελαίου

Όταν το πετρέλαιο εισάγεται στο περιβάλλον, περνά αμέσως από διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές αλλαγές (εικόνα 2.2). Αυτές οι διεργασίες γήρανσης αλλάζουν τη σύνθεση και τις ιδιότητες του πετρελαίου με τέτοιο τρόπο που μπορεί να επηρεάσει τις στρατηγικές αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων. Η βιοεξυγίανση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία που χρησιμοποιείται συχνά ως ένα δευτερεύον στάδιο κυρίως σαν ένα είδους τελευταίου «γυαλίσματος –polishing» αφότου έχουν εφαρμοστεί οι συμβατικές μέθοδοι καθαρισμού. Κατά συνέπεια το υπόλοιπο πετρέλαιο μπορεί να έχει γηρανθεί εκτενώς πριν από την ανάπτυξη των στρατηγικών βιοεξυγίανσης.

Οι διεργασίες γήρανσης, συμπεριλαμβανομένης της βιοδιάσπασης, έχουν αναθεωρηθεί και έχουν περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ([24], [27], [1]). Σημαντικές φυσικές και χημικές αλλαγές του πετρελαίου συνοψίζονται εν συντομία σε αυτό το τμήμα και η βιολογική του τύχη θα συζητηθεί στο κεφάλαιο 2.3.



Εικόνα 2.2: Σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης σε μια πετρελαιοκηλίδα [28]

Εξάπλωση (Spreading)

Η εξάπλωση του πετρελαίου στο νερό είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών μιας πετρελαιοκηλίδας, υπό τον όρο ότι το σημείο ροής του πετρελαίου είναι χαμηλότερο από την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι κύριες δυνάμεις που επηρεάζουν την εξάπλωση του πετρελαίου περιλαμβάνουν τη βαρύτητα, την αδράνεια, την τριβή, το ιξώδες και την επιφανειακή τάση. Αυτή η διεργασία αυξάνει τη ολική περιοχή επιφάνειας της πετρελαιοκηλίδας, ενισχύοντας κατά συνέπεια τη μεταφορά μάζας μέσω της εξάτμισης, της διάλυσης και της μετέπειτα βιοδιάσπασης.

Εξάτμιση (Evaporation)

Από την άποψη των περιβαλλοντικών επιδράσεων, η εξάτμιση είναι η σημαντικότερη διεργασία γήρανσης κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων μιας πετρελαιοκηλίδας δεδομένου ότι μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αφαίρεση ενός μεγάλου μέρους του πετρελαίου συμπεριλαμβανομένων των τοξικότερων και των μικρότερου μοριακού βάρους συστατικών. Για το πετρέλαιο στο νερό, η εξάτμιση αφαιρεί ουσιαστικά όλα κανονικά αλκάνια που είναι μικρότερα από C15 μέσα σε 1 έως 10 ημέρες. Οι πτητικές αρωματικές ενώσεις, όπως το βενζόλιο και το τολουόλιο, μπορούν επίσης να αφαιρεθούν γρήγορα από μια πετρελαιοκηλίδα μέσω της εξάτμισης. Εντούτοις, αυτά τα πτητικά τμήματα πετρελαίου μπορούν να είναι πιο επίμονα όταν το πετρέλαιο βρίσκεται στα ιζήματα. Τα πτητικά συστατικά αποτελούν το 20-50% των περισσότερων αργών πετρελαίων. Κατά συνέπεια, οι φυσικές ιδιότητες της υπόλοιπης πετρελαιοκηλίδας αλλάζουν σημαντικά (π.χ., αυξάνεται η πυκνότητα και το ιξώδες). Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εξάτμισης είναι η σύνθεση και οι φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου, η δράση των κυμάτων, η ταχύτητα του αέρα και η θερμοκρασία του νερού ([24],[27]).

Διάλυτοποίηση (Dissolution)

Αν και η διαλυτοποίηση είναι λιγότερο σημαντική από την άποψη της απώλειας μάζας κατά τη διάρκεια μιας πετρελαιοκηλίδας, οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων υδρογονανθράκων στο νερό είναι ιδιαίτερα σημαντικές λόγω της πιθανής επιρροή τους στην επιτυχία της βιοεξυγίανσης και της επίδραση της τοξικότητας στα βιολογικά συστήματα. Η έκταση της διαλυτοποίησης εξαρτάται από τη διαλυτότητα του πετρελαίου, τις καιρικές συνθήκες και τα χαρακτηριστικά της ρυπασμένης περιοχής. Οι αρωματικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους

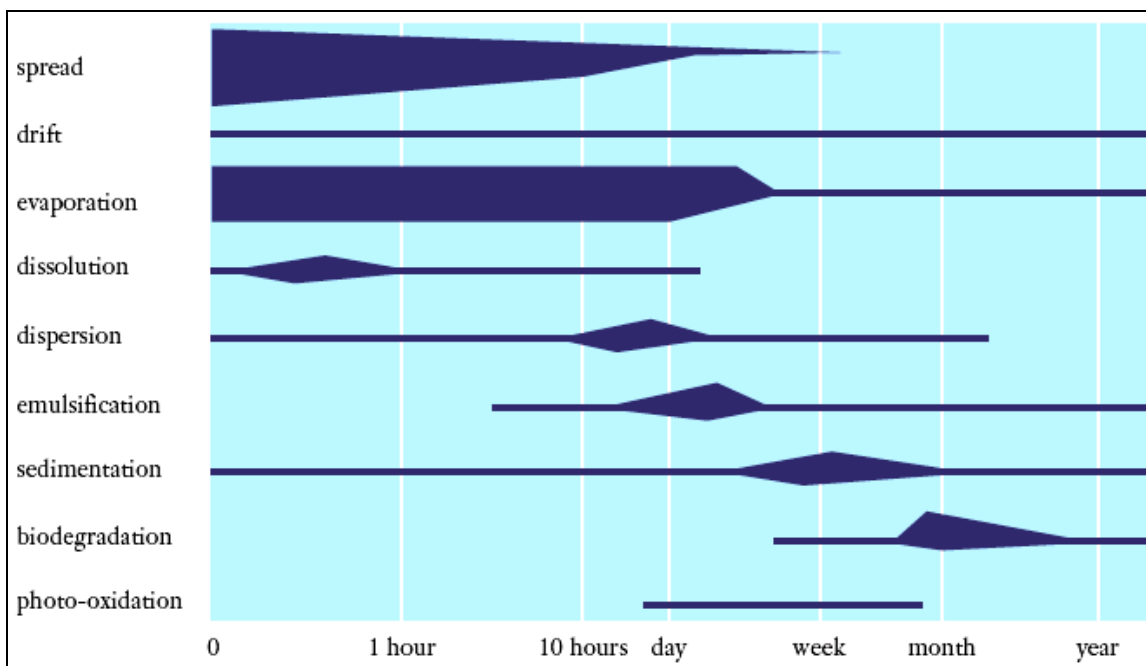
είναι τα πιο διαλυτά τμήματα του πετρελαίου και είναι επίσης τα τοξικότερα συστατικά στο αργό πετρέλαιο. Αν και πολλά από αυτά μπορούν να απομακρυνθούν μέσω της εξάτμισης, ο αντίκτυπός τους στο περιβάλλον είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι υπονοούν οι απλές εκτιμήσεις των ισοζυγίων μάζας [1]. Οι ρυθμοί διαλυτοποίησης επηρεάζονται επίσης από τις φωτοχημικές και βιολογικές διεργασίες.

Φωτοοξείδωση (Photooxidation)

Η φωτοοξείδωση είναι μια άλλη διεργασία γήρανσης που μπορεί να έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες. Παρουσία οξυγόνου, το φυσικό φως του ήλιου έχει ικανή ενέργεια για να μετασχηματίσει πολλές σύνθετες πετρελαϊκές ενώσεις όπως είναι οι αρωματικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους και οι πολικές ενώσεις σε απλούστερες ενώσεις μέσω μιας σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Αυτή η διεργασία μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό, λόγω του σχηματισμού πολικών ενώσεων όπως τα υδροπεροξειδία, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, οι φαινόλες και τα καρβοξυλικά οξέα. Τα καταστρεπτικά αποτελέσματα μπορούν να συνδεθούν με αυτήν την αύξηση στη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό (δηλ., βιολογική διαθεσιμότητα) και το σχηματισμό τοξικών ενώσεων από τη φωτοοξείδωση. Αφ' ετέρου, ο σχηματισμός πολικών ενώσεων μπορεί να αυξήσει το ρυθμό βιοδιάσπασης του πετρελαίου, ιδιαίτερα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις όπου οι επιδράσεις της άμεσης τοξικότητας είναι περιορισμένες [29].

Διασπορά (Dispersion)

Η διασπορά, ή ο σχηματισμός των πετρελαίου σε νερό γαλακτωμάτων, περιλαμβάνει την ενσωμάτωση των μικρών σταγονιδίων του πετρελαίου στην υδάτινη στήλη, με συνέπεια μια αύξηση στην περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου. Γενικά, τα πετρέλαιο σε νερό γαλακτώματα δεν είναι σταθερά. Εντούτοις, μπορούν να διατηρηθούν με συνεχή αναταραχή, αλληλεπίδραση με τα αιωρούμενα σωματίδια και την προσθήκη των χημικών διασποράς (chemical dispersants). Η διασπορά μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό βιοδιάσπασης του πετρελαίου με την αύξηση της επαφής μεταξύ του πετρελαίου και των μικροοργανισμών ή/και με την αύξηση του ρυθμού διάλυσης των πιο διαλυτών τμημάτων του πετρελαίου.



Εικόνα 2.3: Μια μέση πετρελαιοκηλίδα πάνω στο νερό θα ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο σχέδιο. Το μήκος της γραμμής δείχνει την διάρκεια του κάθε σταδίου και το πάχος της γραμμής δείχνει την πιο κρίσιμη φάση κάθε σταδίου [2].

Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

Η διαδικασία της μετατροπής του πετρελαίου σε μορφή γαλακτώματος περιλαμβάνει μια αλλαγή στη μορφή από πετρέλαιο σε νερό κηλίδα ή μια πετρέλαιο σε νερό διασπορά σε ένα νερό σε πετρέλαιο (water-in-oil) γαλάκτωμα, με τον ενδεχόμενο σχηματισμό ενός παχιού, κολλώδους μίγματος που μπορεί να περιέχει μέχρι 80% νερό, αποκαλούμενο συνήθως «μους σοκολάτας» (“chocolate mousse”). Ο σχηματισμός και η σταθερότητα των γαλακτωμάτων συσχετίζονται πρώτιστα με τη χημική σύνθεση των πετρελαίων και ενισχύονται από το κερί (wax) και τα ασφαλικά υλικά. Τα επιφανειοδραστικά υλικά που παράγονται μέσω των φωτοχημικών και βιολογικών διεργασιών περιλαμβάνονται επίσης στο σχηματισμό των γαλακτωμάτων. Ο σχηματισμός των γαλακτωμάτων καθιστά τις διαδικασίες καθαρισμού του πετρελαίου δυσκολότερες επειδή μειώνεται η αποτελεσματικότητα των φυσικών διαδικασιών αποκατάστασης των πετρελαιοκηλίδων και καταστέλλονται οι φυσικοί ρυθμοί βιοδιάσπασης του πετρελαίου.

Άλλες σημαντικές φυσικές και χημικές διεργασίες γήρανσης που επηρεάζουν το ρυθμό αποδόμησης του πετρελαίου είναι η προσρόφηση στα αιωρούμενα σωματίδια, η βύθιση και η ιζηματοποίηση και ο σχηματισμός μπαλών πίσσας.

2.2.2 Αλληλεπιδράσεις Πετρελαίου-Ακτής

Όταν οι πετρελαιοκηλίδες εμφανίζονται στο θαλάσσια περιβάλλον των ακτών, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πετρελαίου και της ακτής περιπλέκουν περαιτέρω τις διεργασίες γήρανσης. Είναι πολύ σημαντικό να γίνουν κατανοητές αυτές οι αλληλεπιδράσεις για να καθοριστούν ο σκοπός και οι περιορισμοί της βιοεξυγίανσης της πετρελαιοκηλίδας.

Η συμπεριφορά του πετρελαίου στο περιβάλλον των ακτών εξαρτάται πρώτιστα από τις ιδιότητες της ακτής, όπως το πορώδες του υποστρώματος και η ενέργεια των κυμάτων που δρουν σε μια ακτή. Η υψηλότερη έκθεση στο κυματισμό ενισχύει τόσο τις φυσικές όσο και τις διεργασίες γήρανσης στην απομάκρυνση του πετρελαίου. Οι βαλλόμενες από τα κύματα βραχώδεις ακτές τείνουν να καθαριστούν από τις πετρελαιοκηλίδες μέσα σε ένα διάστημα μηνών. Εντούτοις, η παλιρροιακή κίνηση είναι επίσης ένας παράγοντας που προωθεί τη διείσδυση πετρελαίου στα ιζήματα. Ο ρυθμός και το βάθος της διείσδυσης πετρελαίου εξαρτώνται πρώτιστα από το πορώδες του υποστρώματος. Στις χονδρόκοκκες ακτές όπως είναι οι χαλικώδεις (cobble) και αμμώδεις παραλίες, το πετρέλαιο διεισδύει βαθύτερα και παραμένει περισσότερο (όταν παγιδύεται κάτω από το όριο δράσης κυμάτων), έναντι των λεπτότερων κοκκωδών ιζημάτων όπως η ιλύς και η άργιλος. Εντούτοις, το πετρέλαιο αφαιρείται ευκολότερα με έπλυση ύδατος από τα χονδρόκοκκα ιζήματα. Οι αλληλεπιδράσεις του πετρελαίου με την παλιρροιακή δράση, τα κύματα, και το υπόστρωμα των ακτών μπορούν επίσης να διαμορφώσουν τάπητες από ασφαλτένια (asphalt-like oil-sediment mats) που είναι ανθεκτικά στην περαιτέρω βιολογική και φωτοχημική γήρανση.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πετρελαίου και των λεπτών ανόργανων σωματιδίων διαδραματίζουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο στο φυσικό καθαρισμό των θαλάσσιων ακτών ([30], [31]). Αυτή η διαδικασία της αλληλεπίδρασης του πετρελαίου με τα λεπτά σωματίδια μειώνει την προσκόλληση του πετρελαίου στα διπαλιρροιακά υποστρώματα των ακτών μέσω του σχηματισμού λεπτών συσσωματωμάτων πετρελαίου-ανόργανων σωματιδίων (oil-mineral fine flocs) που διασκορπίζονται εύκολα από την παλιρροιακή δράση και τα ρεύματα. Ιδιαίτερα, αυτά τα συσσωματώματα ενισχύουν τη διαθεσιμότητα του πετρελαίου για βιοδιάσπαση και έτσι οι ρυθμοί βιοδιάσπασης του πετρελαίου επιταχύνονται με αυτήν την διαδικασία [32].

2.2.3 Ευαισθησία Ακτών

Τα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα έχουν ένα ευρύ φάσμα ευαισθησιών στο πετρέλαιο και τις δραστηριότητες καθαρισμού. Η National Oceanic & Atmospheric Administration και το American Petroleum Institute έχουν αναπτύξει τον περιβαλλοντικό δείκτη ευαισθησίας (Environmental Sensitivity Index-ESI) για να ταξινομήσουν τους τύπους ακτών για τις τεχνικές αντιμετώπισης τους ([6], [7]). Αυτό το σχέδιο ταξινόμησης (π.χ., ο πίνακας 2.2) έχει χρησιμοποιηθεί σε στρατηγικές σχεδιασμού αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων (oil spill contingency planning) και σε επιχειρήσεις μεθόδων αντιμετώπισης τους [33]. Σημαντικοί παράγοντες που εξετάζονται στην ταξινόμηση της ευαισθησίας του φυσικού περιβάλλοντος περιλαμβάνουν τον τύπο των ακτών (υπόστρωμα, μέγεθος κόκκων, παλιρροιακή ανύψωση), την έκθεση στο κύμα και την παλιρροιακή δράση, τη βιολογική παραγωγικότητα και ευαισθησία και την ευκολία του καθαρισμού. Η βιοεξυγίανση μπορεί να είναι αποτελεσματική και να προκαλέσει τη λιγότερη ζημία τόσο στους σχετικά όσο και στους πιο ευαίσθητους τύπους ακτών.

Πίνακας 2.2: Κατάταξη ακτών με κριτήριο τις επιπτώσεις για την χλωρίδα και πανίδα των θαλάσσιων ακτών (όπου 1 είναι η λιγότερο ευαίσθητη και 10 η πιο ευαίσθητη σε ότι αφορά τη ρύπανση με πετρέλαιο και τις μεθόδους αντιμετώπισης αυτής)

Environmental Sensitivity Index (ESI)	Είδος Ακτής
1	Exposed rocky shores Sea walls and piers
2	Exposed wave-cut platforms
3	Fine-grained sand beaches
4	Coarse-grained sand beaches
5	Mixed sand and gravel beaches
6	Gravel beaches and riprap
7	Exposed tidal flats
8	Sheltered rocky shores
9	Sheltered tidal flats
10	Salt marshes and Mangroves

2.3 Βιοαποικοδόμηση Πετρελαίου

Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες που περιλαμβάνονται στη γήρανση και την τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον, ιδιαίτερα για τα μη πτητικά συστατικά του πετρελαίου. Πολυάριθμα επιστημονικά άρθρα έχουν καλύψει τις διάφορες πτυχές αυτής της διεργασίας και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό βιοδιάσπασης ([35], [36], [15], [16], [1], [37], [26]).

2.3.1 Μηχανισμοί Βιοαποικοδόμησης Του Πετρελαίου: Μικροβιολογική Προσέγγιση

Κατανομή των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποικοδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου και τις σχετικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένοι στο θαλάσσιο και όχι μόνο περιβάλλον. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα [36]. Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κυρίαρχοι βιοαποδομητές υδρογονανθράκων με εύρος κατανομής που καλύπτει ακόμη και τα ακραία κρύα ανταρκτικά και αρκτικά περιβάλλοντα ([38], [27]). Μερικοί από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες στο θαλάσσιο περιβάλλον παρατίθενται στον πίνακα 2.3.

Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλίσκουν υδρογονάνθρακες συσχετίζεται επίσης με την ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Εκείνα τα περιβάλλοντα με μια πρόσφατη ή χρόνια μόλυνση πετρελαίου θα έχουν υψηλότερο ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων σε σχέση με τις αρρύπαντες περιοχές. Στα "καθαρά (pristine)" οικοσυστήματα, οι μικροοργανισμοί που καταναλίσκουν υδρογονάνθρακες μπορεί να αποτελούν λιγότερο από 0,1% της μικροβιακής κοινότητας και

στα ρυπασμένα με πετρέλαιο περιβάλλοντα, μπορεί να αποτελούν μέχρι και το 100% των βιώσιμων μικροοργανισμών [16].

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με τη μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο αργό πετρέλαιο. Στη φύση, η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση (consortia). Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει προοδευτικές ή διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου. Έτσι παραγάγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση [40].

Πίνακας 2.3: Αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί ικανοί να αποικοδομήσουν πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες [39].

<i>Bacteria</i>	<i>Fungi</i>
Achromobacter	Allescheria
Acinetobacter	Aspergillus
Actinomyces	Aureobasidium
Aeromonas	Botrytis
Alcaligenes	Candida
Arthrobacter	Cephalosporium
Bacillus	Cladosporium
Beneckea	Cunninghamella
Brevebacterium	Debaromyces
Coryneforms	Fusarium
Erwinia	Gonytrichum
Flavobacterium	Hansenula
Klebsiella	Helminthosporium
Lactobacillus	Mucor
Leumthrix	Oidiodendrum
Moraxella	Paecilomyces
Nocardia	Phialophora
Peptococcus	Penicillium
Pseudomonas	Rhodospiridium
Sarcina	Rhodotorula
Spherotilus	Saccharomyces
Spirillum	Saccharomycopsis
Streptomyces	Scopulariopsis
Vibrio	Sporobolomyces
Xanthomyces	Torulopsis
	Trichoderma
	Trichosporon

Βιοαποικοδόμηση των συστατικών του πετρελαίου

Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες: κορεσμένα, αρωματικές ενώσεις, ρητίνες και ασφαλένια. Σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια για πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν μελετηθεί καλά και έχουν τεκμηριωθεί ([15], [16], [41], [42]) για να εξηγήσουν τις διαφορές τους στην επιδεκτικότητα τους στην βιοαποικοδόμηση.

Κορεσμένες Ενώσεις Γενικά, τα n -αλκάνια είναι τα πιο αποικοδομήσιμα συστατικά σε ένα μίγμα πετρελαίου ([35], [16]). Η Βιοδιάσπαση των n -αλκανίων με μοριακά βάρη μέχρι C44 έχει καταδειχθεί [43]. Τα αλκάνια με εύρος από C10 έως C26 θεωρούνται οι ευκολότεροι και συχνότερα χρησιμοποιούμενοι υδρογονάνθρακες ([44], [1]). Ο κυρίαρχος μηχανισμός αποικοδόμησης των n -αλκανίων περιλαμβάνει την τελική οξείδωση στην αντίστοιχη αλκοόλη, αλδεΐδες, ή κάποια δραστική ομάδα λιπαρού οξέος. Τα διακλαδισμένα αλκάνια είναι λιγότερο αποικοδομήσιμα σε σύγκριση με τα n -αλκάνια. Η μεθυλική διακλάδωση αυξάνει την αντίσταση στη μικροβιακή επίθεση επειδή λιγότεροι μικροβιακοί αποδομητές αλκανίων μπορούν να υπερνικήσουν την παρεμπόδιση της βήτα-οξείδωσης (beta-oxidation) [1]. Τα ιδιαίτερα διακλαδισμένα ισοπρενοειδή αλκάνια, όπως το πριστάνιο και το φυτάνιο, που παλαιότερα θεωρούνταν ανθεκτικά στη βιοδιάσπαση, έχουν αποδειχθεί επίσης ότι είναι εύκολα βιοδιασπάσιμα. Τα κυκλοαλκάνια, εντούτοις, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη βιοδιάσπαση. Οι σύνθετες αλκυκυκλικές ενώσεις όπως τα χοπάνια και οι στεράνες είναι μεταξύ των πιο επίμονων ενώσεων του πετρελαίου στο περιβάλλον [16].

Αρωματικές Ενώσεις Αν και οι αρωματικές ενώσεις είναι γενικά ανθεκτικότερες στη βιοδιάσπαση, μερικές αρωματικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως η ναφθαλίνη μπορούν πραγματικά να οξειδωθούν πριν από πολλά κορεσμένα [37]. Οι μονοαρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι τοξικοί σε μερικούς μικροοργανισμούς λόγω της διαλυτικής δράσης τους στις μεμβράνες των κυττάρων, αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι εύκολα βιοδιασπάσιμοι υπό αερόβιες συνθήκες. Τα PAHs με 2-4 δακτυλίους είναι λιγότερο τοξικά και βιοδιασπάσιμα σε τέτοιο βαθμό που μειώνεται με το επίπεδο πολυπλοκότητας. Τα PAHs με πέντε ή περισσότερους δακτυλίους μπορεί να αποικοδομηθούν μόνο μέσω του συμεταβολισμού, στον οποίο οι μικροοργανισμοί τυχαία μετασχηματίζουν διαφορετικά υποστρώματα καθώς μεταβολίζουν τους απλούστερους υδρογονάνθρακες ή άλλα αρχικά υποστρώματα στο πετρέλαιο. Οι αλκυλοποιημένες αρωματικές ενώσεις αποικοδομούνται

λιγότερο γρήγορα από τις μητρικές ενώσεις τους, όσο πιο αλκυλοποιημένες είναι ομάδες τόσο λιγότερο γρήγορα αποικοδομούνται. Τα μεταβολικά μονοπάτια για τη βιοδιάσπαση των αρωματικών ενώσεων έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς μελέτης ([16], [17], [41]). Η βακτηριακή αποικοδόμηση των αρωματικών ενώσεων περιλαμβάνει συνήθως το σχηματισμό μίας διόλης, που ακολουθείται από διάσπαση δακτυλίου και το σχηματισμό ενός δικαρβοξυλικού οξέος. Οι μύκητες και άλλα ευκαρυωτικά (eukaryotes) οξειδώνουν κανονικά τις αρωματικές ενώσεις χρησιμοποιώντας μονο-οξυγενασες, διαμορφώνοντας μια trans-διόλη.

Ρητίνες και ασφαλτένια Έναντι των κορεσμένων και αρωματικών ενώσεων, πολύ λίγα είναι γνωστά για την αποικοδόμηση των ρητινών και των ασφαλτενίων λόγω των πολύπλοκων δομών τους, οι οποίες είναι δύσκολο να αναλυθούν. Οι ρητίνες και τα ασφαλτένια είχαν θεωρηθεί παλαιότερα ανεπίδηκτα στην αποικοδόμηση. Εντούτοις, υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία αποικοδόμησης των ασφαλτενίων μέσω του συμμεταβολισμού [26]. Μερικές ρητίνες, ιδιαίτερα τα μικρού μοριακού βάρους μέρη της ρητίνης, μπορούν επίσης να βιοδιασπαστούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις [1]. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται ακόμα για να κατανοηθεί η βιοδιάσπαση αυτών των ενώσεων.

Εν περιλήψει, η επιδεκτικότητα των υδρογονανθράκων πετρελαίου σε μικροβιακή αποδόμηση ακολουθεί γενικά την εξής σειρά: n-αλκάνια > διακλαδισμένα αλκάνια > μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις > κυκλικά αλκάνια. Ωστόσο, αυτή η ακολουθία δεν είναι καθολική. Η συνθετική ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών πετρελαίων επηρεάζει πολύ το ρυθμό βιοδιάσπασης των συστατικών τους. Ο ρυθμός αποικοδόμησης για τα ίδια συστατικά πετρελαίου μπορεί να ποικίλει σημαντικά για διαφορετικά πετρέλαια. Ο συμμεταβολισμός διαδραματίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου. Πολλοί σύνθετοι διακλαδισμένοι, κυκλικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, που διαφορετικά δεν θα βιοδιασπώνταν ξεχωριστά, μπορούν να οξειδωθούν μέσω του συμμεταβολισμού σε ένα μίγμα πετρελαίου λόγω της πληθώρας άλλων υποστρωμάτων που μπορούν να μεταβολιστούν εύκολα μέσα στο πετρέλαιο [16]. Η βιολογική τύχη των συστατικών πετρελαίου σε ένα μίγμα πετρελαίου απαιτεί ακόμα περαιτέρω έρευνα. Ιδιαίτερα, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια ώστε να καθιερωθεί μια βάση δεδομένων σχετικά με τη βιοδιασπασιμότητα των διαφορετικών τύπων πετρελαίων και πετρελαιοειδών.

2.3.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επιδρούν στην Βιοαποικοδόμηση του Πετρελαίου

Όταν εμφανίζονται πετρελαιοκηλίδες στο περιβάλλον, ο ρυθμός βιοδιάσπασης του πετρελαίου επηρεάζεται επίσης πολύ από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση πετρελαίου είναι οι διεργασίες γήρανσης, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, η διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH.

Διεργασίες γήρανσης

Οι διεργασίες γήρανσης που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.2.1 έχουν βαθιές επιδράσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η εξάτμιση των πτητικών συστατικών του πετρελαίου μπορεί να ωφελήσει τους μικροοργανισμούς με την απομάκρυνση των τοξικότερων μικρού μοριακού βάρους συστατικών όπως το βενζόλιο και των μικρότερων *n*-αλκανίων. Εντούτοις, αυτή η διαδικασία οδηγεί επίσης σε ένα μικρότερο βιοδιασπάσιμο ποσοστό πετρελαίου, δεδομένου ότι αυτά τα συστατικά γενικά βιοδιασπώνται εύκολα ([16], [1]). Η περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου είναι σημαντική επειδή η αύξηση των βιοαποδομητών πετρελαίου εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος [45]. Ο σχηματισμός των νερό σε πετρέλαιο γαλακτωμάτων ή «μους» μειώνει την περιοχή επιφάνειας, επομένως μειώνεται η βιοδιάσπαση. Οι πίσσεις, που είναι μεγάλα σύνολα γηρασμένου και μη αποικοδομήσιμου πετρελαίου, περιορίζουν επίσης την πρόσβαση των μικροοργανισμών λόγω της περιορισμένης περιοχής επιφάνειάς τους [26]. Η διασπορά των υδρογονανθράκων στην υδάτινη στήλη υπό μορφή πετρέλαιο σε νερό γαλακτωμάτων αυξάνει την περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου και έτσι τη διαθεσιμότητά του για μικροβιακή επίθεση. Ο σχηματισμός των πετρέλαιο σε νερό γαλακτωμάτων μέσω της μικροβιακής παραγωγής και της απελευθέρωσης των επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) έχει βρεθεί επίσης ότι είναι μια σημαντική διεργασία στη λήψη των υδρογονανθράκων από τα βακτήρια και τους μύκητες [46]. Αντίθετα, η εφαρμογή των χημικών διασποράς (dispersants) έχει παραγάγει μικτά αποτελέσματα και δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να ενισχυθεί η βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η φωτοοξειδωση

οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων διαλυτών ενώσεων, οι οποίες είναι συχνά πιο βιοδιασπάσιμες. Εντούτοις, η επίδραση των διεργασιών φωτοοξειδωσης στη βιοδιάσπαση ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή [29].

Οι ρυθμοί βιοδιάσπασης επηρεάζονται επίσης από τις συγκεντρώσεις των μεμονωμένων συστατικών του πετρελαίου, τα οποία μπορούν να επηρεαστούν με τις διάφορες διεργασίες γήρανσης. Παραδείγματος χάριν, τα μικρόβια μπορούν να επιτεθούν στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των ρύπων στο περιβάλλον ανεπαρκώς [37]. Ωστόσο, οι υψηλές συγκεντρώσεις των υδρογονανθράκων μπορούν να προκαλέσουν την παρεμπόδιση της βιοδιάσπασης από τους περιορισμούς των θρεπτικών ουσιών ή του οξυγόνου ή από τις τοξικές επιδράσεις. Θα φαινόταν να υπάρχει, για πολλούς υδρογονάνθρακες, ένα βέλτιστο εύρος συγκέντρωσης για το μεταβολισμό κάτω από το οποίο δεν διεγείρεται η αποδόμηση και πάνω από το οποίο εμφανίζεται παρεμπόδιση. Οι διεργασίες γήρανσης επηρεάζουν τις τελικές συγκεντρώσεις των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον με διάφορους τρόπους. Η εξάτμιση μπορεί να μειώσει τις συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων αλλά συγκεντρώνει μερικά άλλα συστατικά. Η προσρόφηση και η γαλακτωματοποίηση συγκεντρώνουν τους ρύπους, ενώ η διασπορά και η διάλυση τείνουν να τους αραιώνουν.

Θερμοκρασία

Η ατμοσφαιρική θερμοκρασία ενός περιβάλλοντος επηρεάζει τόσο τις ιδιότητες του πετρελαίου όσο και τη δραστηριότητα του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, το ιξώδες του πετρελαίου αυξάνεται, ενώ η πτητικότητα των τοξικών μικρού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων μειώνεται, καθυστερώντας την αρχή της βιοδιάσπασης [16]. Μερικοί υδρογονάνθρακες είναι πιο διαλυτοί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (π.χ., τα αλκάνια μικρής αλυσίδας), και μερικές μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις είναι πιο διαλυτές σε υψηλότερες θερμοκρασίες [37]. Αν και η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων μπορεί να εμφανιστεί πέρα από ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, ο ρυθμός βιοδιάσπασης μειώνεται γενικά μειώνοντας τη θερμοκρασία. Υψηλότεροι ρυθμοί αποικοδόμησης εμφανίζονται γενικά στη περιοχή από 15 έως 20 °C στο θαλάσσιο περιβάλλον ([47], [39], [27]).

Η επίδραση της θερμοκρασίας περιπλέκεται επίσης από άλλους παράγοντες όπως η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού. Στα περιβάλλοντα όπου ένας ψυχρόφιλος πληθυσμός έχει

καθιερωθεί, η αποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί σε σημαντικούς ρυθμούς υπό κρύες συνθήκες. Η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασία τόσο χαμηλή όσο 0-2 °C στο θαλασσινό νερό και -1.1 °C στο έδαφος.

Οξυγόνο

Οι αερόβιες συνθήκες θεωρούνται γενικά απαραίτητες για την εκτενή αποδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον δεδομένου ότι τα σημαντικότερα μονοπάτια αποδόμησης και για τα κορεσμένα και για τα αρωματικά περιλαμβάνουν τις οξυγενάσεις ([16], [41]). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση του οξυγόνου οδηγεί σε αισθητά μειωμένες δραστηριότητες βιοδιάσπασης στα θαλάσσια ιζήματα και στα εδάφη ([16], [47]). Οι περιοριστικές συνθήκες οξυγόνου κανονικά δεν υπάρχουν στα ανώτερα επίπεδα της υδάτινης στήλης στα θαλάσσια περιβάλλοντα και στο επιφανειακό στρώμα των περισσότερων ακτών. Το οξυγόνο μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας στα υποεπιφανειακά ιζήματα, στις ανοξικές ζώνες των υδάτινων στηλών και στις περισσότερες λεπτόκοκκες θαλάσσιες ακτές. Οι παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι η δράση του κύματος και η ροή του νερού, η φυσική κατάσταση του πετρελαίου και το ποσό των διαθέσιμων υποστρωμάτων (substrates).

Η αναερόβια αποικοδόμηση του πετρελαίου σύμφωνα με κάποιες μελέτες εμφανίζεται μόνο σε αμελητέους ρυθμούς [16], οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η περιβαλλοντική σημασία της αναερόβιας αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων μπορεί να απορριφθεί. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αναερόβιος μεταβολισμός των υδρογονανθράκων μπορεί να είναι μια σημαντική διεργασία υπό ορισμένες συνθήκες [48]. Μελέτες επίσης έχουν καταδείξει ότι σε μερικά θαλάσσια ιζήματα, τα PAHs και τα αλκάνια μπορούν να αποικοδομηθούν κάτω από συνθήκες αναγωγήςθειικών σε παρόμοιους ρυθμούς με αυτούς υπό αερόβιες συνθήκες ([49], [26]). Η σημασία της αναερόβιας βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο περιβάλλον απαιτεί ακόμα περαιτέρω μελέτη.

Θρεπτικά

Θεωρητικά, χρησιμοποιούνται περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε υλικό κυττάρων [52]. Όταν μια μεγάλη πετρελαιοκηλίδα εμφανίζεται στα θαλάσσια περιβάλλοντα η παροχή άνθρακα αυξάνεται εντυπωσιακά και η

διαθεσιμότητα σε άζωτο και σε φωσφόρο γίνεται γενικά ο περιοριστικός παράγοντας για την αποικοδόμηση του πετρελαίου ([15], [26]). Στα θαλάσσια περιβάλλοντα, ο θρεπτικός περιορισμός (nutrient limitation) συσχετίζεται γενικά με τα χαμηλά επίπεδα υποβάθρου σε άζωτο και φωσφόρο στο θαλασσινό νερό [38]. Μια άλλη πιθανή περιοριστική θρεπτική ουσία (potential limiting nutrient) είναι ο σίδηρος, ο οποίος βρέθηκε να περιορίζει την αποικοδόμηση πετρελαίου στο καθαρό παράκτιο νερό [37].

Άλλοι παράγοντες

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων πετρελαίου είναι το pH και η αλατότητα. Το pH του νερού της θάλασσας είναι γενικά σταθερό και ελαφρώς αλκαλικό [47]. Τα περισσότερα ετερότροφα βακτήρια και μύκητες ευνοούν το ουδέτερο pH, με τους μύκητες να είναι πιο ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η αποικοδόμηση του πετρελαίου αυξάνεται όταν αυξάνεται το pH και ότι η βέλτιστη αποικοδόμηση παρουσιάζεται υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες ([53], [37]).

Οι αλλαγές στην αλατότητα μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου μέσω της αλλαγής του μικροβιακού πληθυσμού. Τα περισσότερα θαλάσσια είδη έχουν ένα βέλτιστο εύρος αλατότητας από 2.5 ως 3.5‰ και αυξάνονται λίγο ή καθόλου σε αλατότητα χαμηλότερη από 1.5 με 2‰ [36]. Σε μια μελέτη αλμυρών λιμνών εξάτμισης, απεδείχθη ότι ο ρυθμός μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μειώθηκε με την αύξηση στην αλατότητα σε εύρος από 3.3 έως 28.4‰ [54]. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να γίνει κατανοητή η επίδραση της αλατότητας στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου.

2.3.3 Ο Ρόλος των Επιφανειοδραστικών Ενώσεων Βιολογικής Προέλευσης (biosurfactants)

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (surfactants) είναι ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια των διαφόρων συστατικών και είναι ικανές να μειώσουν την επιφάνεια και την επιφανειακή τάση στις διεπιφάνειες των υγρών, στερεών και αερίων, με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να αναμιχθούν ή να διασκορπιστούν εύκολα ως γαλακτώματα στο νερό ή σε άλλα υγρά. Η

τεράστια αγοραστική ζήτηση για επιφανειοδραστικές ενώσεις ικανοποιείται αυτήν την περίοδο από τις πολυάριθμες συνθετικές, κυρίως πετρελαϊκού χαρακτήρα χημικές επιφανειοδραστικές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως τοξικές στο περιβάλλον και μη-βιοδιασπάσιμες. Μπορούν να βιοσυσσωρεύτουν και η παραγωγή τους, οι διεργασίες και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα. Καθώς οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται πιο αυστηροί και η συνειδητοποίηση για την ανάγκη να προστατευθεί το οικοσύστημα αυξάνεται, το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων συνεχώς αυξάνεται. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφυλες ενώσεις (amphiphilic compounds) μικροβιακής προέλευσης με ιδιαίτερη δυνατότητα σε εμπορικές εφαρμογές μέσα στις διάφορες βιομηχανίες [55]. Παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών. Είναι μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις [56], που μπορούν να παραχθούν επικερδώς υπό *ex situ* συνθήκες, ή *in situ* παραγωγή τους μπορεί να υποκινηθεί στη περιοχή της ρύπανσης και μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν [57].

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης κατατάσσονται σε πέντε μεγάλες ομάδες: (1) γλυκολιπίδια (glycolipids), (2) φωσφολιπίδια (phospholipids) και λιπαρά οξέα, (3) λιποπεπτίδια/λιποπρωτεΐνες (lipopeptide/lipoproteins), (4) πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις (polymeric surfactants) και (5) particulate surfactants ([58], [59], [60]).

Όσο αφορά τη μοριακή τους δομή αποτελούνται: (α) από ένα υδρόφοβο τμήμα που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα και/ή υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες (fatty alcohols), αντιστοίχως από (β) ένα υδρόφιλο τμήμα αποτελούμενο από μονο-, ολιγο- ή πολυσακχαρίτες, πεπτίδια ή πρωτεΐνες.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης από τον *aeruginosa pseudomonas* SB30 εξετάστηκαν για την δυνατότητά τους να απομακρύνουν το πετρέλαιο από το ρυπασμένο αμμοχάλικο της Αλάσκας (Exxon Valdez) στο εργαστήριο [61]. Ένα διάλυμα 1% αυτών των ενώσεων βρέθηκε ότι απομακρύνει 3 φορές περισσότερο πετρέλαιο σε θερμοκρασίες > 40 °C και 1 λεπτό ελάχιστο χρόνο επαφής σε σχέση με το νερό. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής

προέλευσης να απομακρύνουν περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως το πετρέλαιο, από τα φυσικά υποστρώματα.

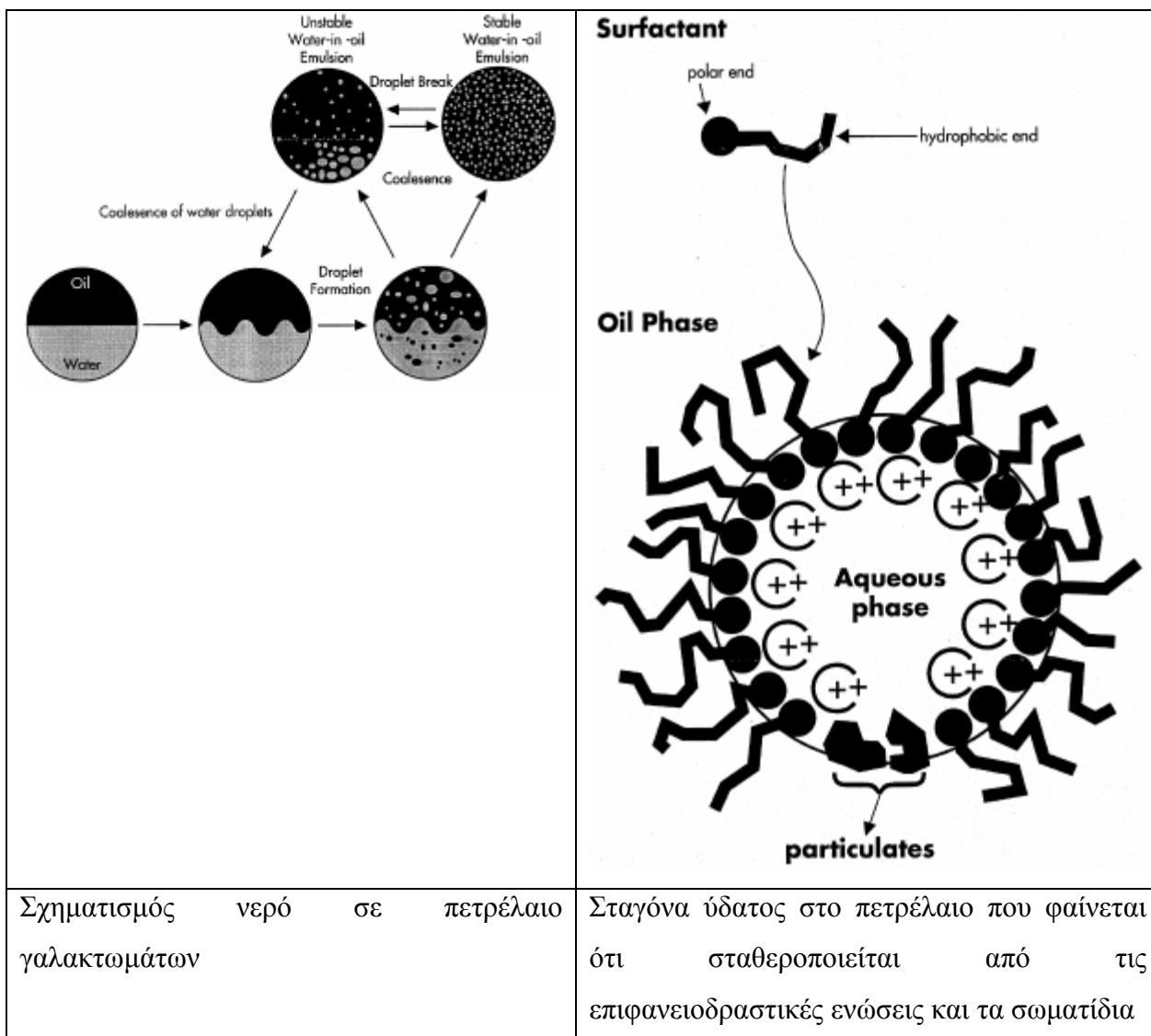
Το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο της Αλάσκας, Fairbanks, πραγματοποίησε μια δοκιμή πεδίου τον Ιούλιο του 1993 στο Sleepy κόλπο στο νησί LaTouche στο Prince William Sound για να εξετάσει την αποτελεσματικότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης στην αφαίρεση του γηρασμένου αργού πετρελαίου από το υποεπιφανειακό υλικό της παραλίας. Ανέφεραν την πλήρη αφαίρεση των υδρογονανθράκων της περιοχή ντίζελ του πετρελαίου (στο όριο 0,5 mg kg⁻¹) ενώ οι ημιπτητικοί υδρογονάνθρακες μειώθηκαν στο επίπεδο 70%, με απομάκρυνση 30% [62]. Όλες αυτές οι μελέτες είναι εργαστηριακές και η επιτυχής βιοεξυγίανση των εκτεθειμένων περιοχών ανοιχτής θαλάσσης που χρησιμοποιούν επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παραμένει μια πρόκληση.

Τα πειράματα με το *aeruginosa* isolate s8, που απομονώθηκε από το ρυπασμένο με πετρέλαιο θαλασσινό νερό, έδειξαν την ικανότητά του να αποικοδομεί εξαδεκάνιο, επταδεκάνιο, οκταδεκάνιο και δεκαεννιανιο στο νερό της θάλασσας μέχρι 47, 58, 73 και 60%, αντίστοιχα, μετά από μια περίοδο επώασης 28 ημερών [63].

Οι Rhamnolipid επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης από το *aeruginosa pseudomonas* χαρακτηρίστηκαν για τη δυνατότητά τους να απομακρύνουν τους υδρογονάνθρακες από το αμμώδες έδαφος και από το λασπώδες έδαφος [64].

Μια αξιολόγηση της δυνατότητας των υδατικών διαλυμάτων επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (αεσκίνη (aescin), λεκιθίνη, rhamnolipid, σαπωνίνη και τανίνη) για τις πιθανές εφαρμογές τους στο πλύσιμο του ρυπασμένου εδάφους με αργό πετρέλαιο πραγματοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης ήταν σε θέση να αφαιρέσουν σημαντικό ποσό αργού πετρελαίου από το ρυπασμένο έδαφος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για παράδειγμα το rhamnolipid και το SDS απομάκρυναν μέχρι 80% πετρέλαιο και η λεκιθίνη περίπου 42% [55].

Η ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να γαλακτωματοποιούν τα μίγματα υδρογονανθράκων-ύδατος ενισχύει την αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων στο περιβάλλον (εικόνα 2.4). Η παρουσία των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων στο νερό της θάλασσας καταστά τη βιοδιάσπαση μια από τις αποδοτικότερες μεθόδους για την απομάκρυνση ρυπαντών ([65], [26] [66]).



Εικόνα 2.4: Σχηματισμός νερό σε πετρέλαιο γαλακτωμάτων και σταθεροποίηση τους από επιφανειοδραστικές ενώσεις

Ένα μεγάλο ερώτημα στην βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων είναι πώς οι μικροοργανισμοί ουσιαστικά έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα. Η κατανάλωση των υδατοδιαλυτών υποστρωμάτων από τους μικροοργανισμούς φαίνεται να μην παρουσιάζει πρόβλημα, αλλά πώς οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν με υλικά τα οποία είναι αδιάλυτα όπως τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια. Συνήθως εμπλέκονται τρεις μηχανισμοί και διαφορετικά είδη βακτηρίων μπορεί να χρησιμοποιήσουν έναν ή και περισσότερους από αυτούς:

1. Αλληλεπίδραση με τα μικρά επίπεδα του διαλυμένου υλικού

2. Άμεση επαφή με τα σταγονίδια ή τις επιφάνειες της αδιάλυτης φάσης και
3. Αλληλεπίδραση με υδρογονάνθρακες οι οποίοι έχουν υποστεί «διάλυση» ύστερα από την εφαρμογή επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παίζουν σημαντικό ρόλο στους δύο τελευταίους μηχανισμούς δηλαδή πρώτα προσαρτώνται στην επιφάνεια του κυττάρου για να ενισχύσουν την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο πετρέλαιο και έπειτα εκκρίνονται στο μέσο για να ενισχύσουν την «ψευδοδιαλυτοποίηση». Εξάλλου πολλές έρευνες το έχουν αποδείξει αυτό [17].

Από οικολογική άποψη η χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης είναι προφανής. Πράγματι τα αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι είναι ελάχιστα έως καθόλου τοξικοί και εύκολα βιοδιασπάσιμοι. Επίσης οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης έχουν δείξει ότι διαθέτουν παρόμοια ή και ανώτερα φυσικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις συνθετικές επιφανειοδραστικές ενώσεις.

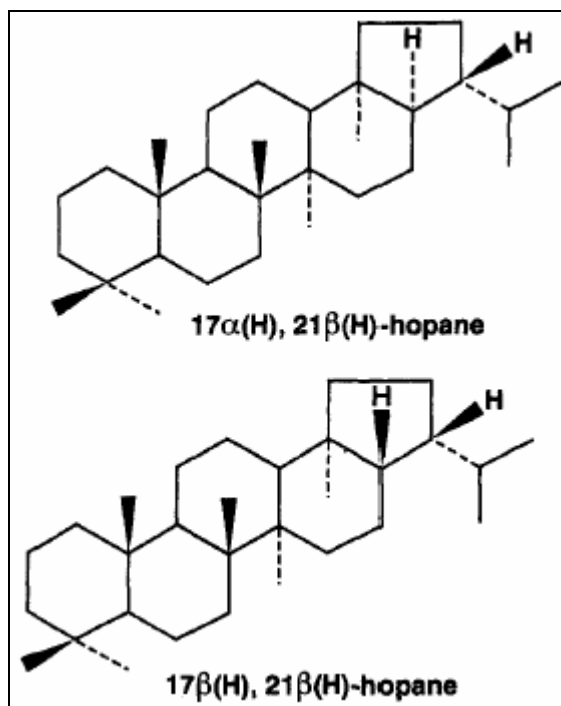
Επιπρόσθετα έρευνες έχουν δείξει την δραστική ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να σταθεροποιούν νερό σε πετρέλαιο γαλακτώματα με τη χρήση λιγότερο από 1% επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (κατ' όγκο).

2.3.4 Εκτίμηση του Βαθμού Βιοαποικοδόμησης του Πετρελαίου: Εφαρμογή Βιοδεικτών (biomarkers)

Η αξιολόγηση της βιοδιάσπασης πετρελαίου είναι ένας δύσκολος στόχος, ειδικά στο πεδίο, λόγω της περιπλοκής των διαδικασιών γήρανσης και της ετερογένειας των ρυπασμένων περιοχών. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, η φυσική και χημική γήρανση μπορεί να επιδράσει σημαντικά στη σύνθεση και τις συγκεντρώσεις των πετρελαίων. Οι ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές είναι συχνά ιδιαίτερα ετερογενείς, έτσι οι συγκεντρώσεις πετρελαίου μπορούν να ποικίλουν πολύ μέσα σε μια μικρή περιοχή. Συνεπώς, η μεταβλητότητα που συνδέεται με τις μελέτες πεδίου μπορεί να είναι τόσο υψηλή ώστε να αποκλείσει ή να παρεμποδίσει τη δυνατότητά κάποιου να διακρίνει τις σημαντικές διαφορές επεξεργασίας. Μη-βιοδιασπώμενα ή αργά βιοδιασπώμενα συστατικά στο πετρέλαιο - συχνά αποκαλούμενα βιοδείκτες - έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να μετριάσουν την υψηλή μεταβλητότητα που συνδέεται με τις

μελέτες πεδίου ([12], [20], [19]). Αυτή η προσέγγιση υπολογίζει την έκταση της βιοδιάσπασης μέσω της αξιολόγησης των λόγων των συγκεντρώσεων υδρογονανθράκων στόχων σε σχέση με τη συγκέντρωση αυτών των σταθερών βιοδεικτών. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση των βιοδεικτών μειώνει τη χωρική μεταβλητότητα (spatial variability) των δεδομένων πετρελαίου όταν συγκρίνονται με άλλες προσεγγίσεις ισοζυγίων μάζας και επιτρέπει την αποτελεσματική παρακολούθηση της βιοδιάσπασης μειώνοντας τον απαιτούμενο αριθμό δειγμάτων [67].

Οι πιο συνήθεις βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βιοαποικοδόμησης των αργών πετρελαίων είναι τα ισοπρενοειδή πριστάνιο και φυτάνιο, τα στεράνια και τα πεντακυκλικά τριτερπάνια όπως τα χοπανοειδή [68]. Ενώ τα ισοπρενοειδή πριστάνιο και φυτάνιο είναι κάπως ανθεκτικότερα στη βιοδιάσπαση από τα *n*-αλκάνια παρόλο που έχουν παρόμοια σημεία βρασμού (C17, C18), ωστόσο πρέπει να χρησιμοποιηθούν μόνο στην παρακολούθηση των αρχικών σταδίων ενός προγράμματος επεξεργασίας βιοαποικοδόμησης, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι βιοδιασπώνται υπό φυσικές συνθήκες [69]. Τα χοπάνια (hopanes) αποτελούν τους κατά προτίμηση βιοδείκτες επιλογής δεδομένου ότι είναι ανθεκτικότεροι στη μικροβιακή βιοαποικοδόμηση ([16], [68]). Η ένωση 17α(H), 21β(H)-χοπάνιο χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στον καθορισμό της αποτελεσματικότητας των δοκιμών βιοεξυγίανσης στο πεδίο που συντονίστηκαν με τις επιχειρήσεις καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας από το *Exxon Valdez* ([67], [22], [69]). Εντούτοις, πρέπει να γίνει με προσοχή η χρήση τους ως βιοδείκτες δεδομένου ότι είναι επίσης πολύ ανθεκτικοί στις φυσικές και χημικές διαδικασίες γήρανσης που επηρεάζουν πολλά αλκάνια και αρωματικές ενώσεις. Επομένως, η κανονικοποίηση με χοπάνια είναι πιο χρήσιμη στη μείωση της μεταβλητότητας που συνδέεται με την ετερογενή κατανομή του πετρελαίου ή σε περιπτώσεις όπου οι επιδράσεις της φυσικής και χημικής γήρανσης είναι αμελητέα. Η βιοδιάσπαση μπορεί επίσης να διαπιστωθεί ότι είναι ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης προσδιορίζοντας τους σχετικούς ρυθμούς διάσπασης των ομόλογων σειρών των αλκυλοποιημένων PAHs [70].



Εικόνα 2.5: Δομές των χοπανίων [69]

2.3.5 Γενικά Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Βιοεξυγίανσης ως Τεχνολογίας Αντιμετώπισης Πετρελαιοκηλίδων

Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης έχουν διάφορες ιδιότητες που, ανάλογα με την κατάσταση και τον τύπο της περιοχής μπορούν να υποστηρίξουν τη χρήση τους στην αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων (πίνακας 2.4). Πρώτον, η βιοεξυγίανση επιφέρει συνήθως την ελάχιστη φυσική διάσπαση μιας περιοχής. Αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική σε παραλίες όπου άλλες διαθέσιμες τεχνολογίες καθαρισμού (π.χ., high- and low-pressure spraying, steam cleaning, manual scrubbing, and raking of congealed oil) μπορεί να προκαλέσουν πρόσθετη ζημία στο βιόκοσμο της παραλίας. Δεύτερον, οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης φαίνεται ότι έχουν κανένα, ή μόνο μικρά και βραχύπρόθεσμα δυσμενή αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται σωστά. Αν και η έρευνα για τις πιθανές αρνητικές επιδράσεις συνεχίζεται, υπάρχουν μέχρι τώρα λίγα στοιχεία που να προτείνουν ότι τα πιθανά προβλήματα θα ήταν σημαντικά.

Τρίτον, η βιοεξυγίανση μπορεί να είναι χρήσιμη στο να απομακρυνθούν μερικά από τα τοξικά συστατικά του πετρελαίου (π.χ., οι μικρού μοριακού βάρους αρωματικοί υδρογονάνθρακες) από μια πετρελαιοκηλίδα γρηγορότερα από ότι να απομακρυνθούν μόνο από εξάτμιση. Τέταρτο, η βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων επιτυγχάνεται on-site και προσφέρει μια απλούστερη και πιο λεπτομερή λύση στις ρυπασμένες περιοχές. Αντίθετα, ο ψεκασμός με καυτό νερό μιας ρυπασμένης παραλίας με πετρέλαιο, παραδείγματος χάριν, ξεπλένει κάποιο πετρέλαιο από την επιφάνεια πίσω στο νερό και αυτό το πετρέλαιο πρέπει έπειτα να ανακτηθεί από τους εξαφριστές (skimmers). Το ανακτημένο μίγμα πετρελαίου και ύδατος πρέπει να διαχωριστεί και το πετρέλαιο να εναποτεθεί ή να ανακυκλωθεί. Επίσης, απαιτείται μεγάλος μηχανικός εξοπλισμός και λογιστική ικανότητα (logistical capability) για την αντιμετώπιση μιας μεγάλης πετρελαιοκηλίδας.

Επειδή ο εξοπλισμός και οι διοικητικές μέριμνες της βιοεξυγίανσης είναι συνήθως απλούστερες και απαιτούν λιγότερη χειρωνακτική εργασία, οι δαπάνες μπορεί να είναι χαμηλότερες απ' ό,τι για άλλες τεχνικές. Συγχρόνως, το συνολικό κόστος του καθαρισμού είναι η σημαντικότερη ανησυχία, και όπου η βιοεξυγίανση χρησιμοποιείται ως προσθήκη ή δευτεροβάθμια τεχνολογία, το συνολικό κόστος όσο και τα συνολικά οφέλη θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερα. Το κόστος παρακολούθησης της βιοεξυγίανσης πρέπει επίσης να συνυπολογιστεί.

Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης έχουν διάφορα γενικά μειονεκτήματα. Αν και η βιοεξυγίανση μπορεί να λειτουργήσει γρήγορα-ενδεχομένως πολύ πιο γρήγορα-από τη φυσική βιοδιάσπαση, δεν μπορεί να παραγάγει σημαντικά μικρής διάρκειας αποτελέσματα. Εάν οι ακτές απειλούνται από μια μεγάλη διαρροή πετρελαίου μεσοπέλαγα, για παράδειγμα, τότε η βιοεξυγίανση δεν είναι πιθανώς το κατάλληλο αρχικό αμυντικό μέτρο. Σε αυτήν την περίπτωση, θα ήταν συνήθως πιο αρμόζον να ανακτηθεί το πετρέλαιο από το νερό όσο το δυνατόν γρηγορότερα ή, διαφορετικά, να διασκορπιστεί ή να καεί προτού να παρασυρθεί επάνω στην παραλία. Η βιοεξυγίανση παίρνει πάρα πολύ χρόνο να δουλέψει ως αρχικό μέτρο αντιμετώπισης για μια τέτοια απειλή.

Δεύτερον, η προσέγγιση της βιοεξυγίανσης πρέπει να προσαρμοστεί συγκεκριμένα σε κάθε ρυπασμένη περιοχή. Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης δεν είναι και είναι απίθανο σύντομα να γίνουν, άμεσης εφαρμογής τεχνολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ίση αποτελεσματικότητα σε κάθε τοποθεσία συμβάντος. Αν και άλλες τεχνολογίες

αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων υπόκεινται σε αυτόν τον ίδιο περιορισμό, η προηγμένη γνώση που απαιτείται για τις τεχνολογίες βιοεξυγίανσης είναι μεγαλύτερη. Η προηγμένη γνώση, παραδείγματος χάριν, της αποδοτικότητας των γηγενών βακτηρίων σε μια περιοχή στην αποικοδόμηση του πετρελαίου, η διαθεσιμότητα των περιοριστικών θρεπτικών ουσιών και η ευαισθησία του συγκεκριμένου αργού πετρελαίου στη μικροβιακή επίθεση απαιτούνται, έτσι ο προληπτικός προγραμματισμός θα είναι σημαντικός.

Τέλος, το κοινό δεν είναι ακόμα εξοικειωμένο με τις τεχνολογίες βιοεξυγίανσης. Αν και η δημόσια στάση απέναντι στις "φυσικές" λύσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα είναι γενικά ευνοϊκή, η έλλειψη γνώσης για τους μικροοργανισμούς και του φυσικού ρόλου τους στο περιβάλλον θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην αποδοχή της χρήσης τους. Πριν οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης χρησιμοποιηθούν ευρέως, θα πρέπει η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους να καταδειχθούν πειστικά και να κοινοποιηθούν στο κοινό [14].

Πίνακας 2.4: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Οι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το πετρέλαιο υπάρχουν παντού και γι αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες ακτές	Παίρνει αρκετό χρόνο για να δουλέψει σε σχέση με τις φυσικές/χημικές μεθόδους
Ελάχιστη φυσική διάσπαση της περιοχής	Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βαριά ρυπασμένες ακτές εκτός και αν χρησιμοποιηθεί ως δευτερεύουσα μέθοδος αντιμετώπισης
Δεν έχει αρνητικές επιδράσεις εάν χρησιμοποιηθεί σωστά	Εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου
Απομακρύνει τα τοξικά συστατικά του πετρελαίου	Δεν πρόκειται να δουλέψει στα ανοιχτά νερά λόγω διάλυσης
Απλούστερη και πιο λεπτομερής λύση για τις ρυπασμένες περιοχές από ότι οι μηχανικές μέθοδοι αντιμετώπισης	

Πιο οικονομική τεχνολογία	
Είναι φυσική διεργασία	
Δεν παράγει περαιτέρω απόβλητα	

3 Είδη Τροποποιήσεων και Παραγόντων κατά την Εφαρμογή τους

Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τη δυνατότητά να βελτιστοποιηθούν οι διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές συνθήκες στο ρυπασμένο περιβάλλον. Οι υπάρχουσες τροποποιήσεις για την ενίσχυση της βιοδιάσπασης του πετρελαίου στις ακτογραμμές περιλαμβάνουν την προσθήκη θρεπτικών ουσιών, την προσθήκη μικροβιακών καλλιεργειών ή ενζύμων και τον εμπλουτισμό με οξυγόνο.

3.1 Εφαρμογή Θρεπτικών

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, η προσθήκη θρεπτικών έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου σε διάφορες θαλάσσιες ακτές. Θεωρητικά, περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου καταναλώνονται για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε κυτταρικό υλικό [52]. Επομένως, μια συνήθης χρησιμοποιημένη στρατηγική είναι να προστεθούν οι θρεπτικές ουσίες σε συγκεντρώσεις που πλησιάζουν τη στοιχειομετρική αναλογία C:N:P των 100:5:1. Πρόσφατα, συζητήθηκε η πιθανή εφαρμογή της (resource-ratio theory) θεωρία που βασίζεται στην αναλογία των θρεπτικών για την βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων ([48], [71]). Αυτή η θεωρία προτείνει το μεταχειρισμό της αναλογίας N:P για τον εμπλουτισμό διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών και ότι η βέλτιστη N:P αναλογία μπορεί να είναι διαφορετική για την αποικοδόμηση διαφορετικών ενώσεων (όπως οι υδρογονάνθρακες που αναμιγνύονται μέσα με άλλες βιογενείς ενώσεις στο χώμα). Εντούτοις, η πρακτική χρήση αυτών των θεωριών παραμένει μια πρόκληση. Ιδιαίτερα, στις θαλάσσιες ακτές, που η διατήρηση μιας ορισμένης αναλογίας θρεπτικών είναι αδύνατη λόγω της έκπλυσης (washout) των θρεπτικών ουσιών ως αποτέλεσμα της δράσης των παλιρροιών και των κυμάτων. Μια πρακτικότερη προσέγγιση είναι να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις της περιοριστικής θρεπτικής ουσίας ή των θρεπτικών ουσιών μέσα στο νερό των πόρων σε ένα βέλτιστο εύρος ([12], [20]). Οι πιο κοινώς χρησιμοποιημένες θρεπτικές ουσίες είναι οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες (water-

soluble nutrients), οι στερεές βραδείας απελευθέρωσης (slow-release) θρεπτικές ουσίες και τα ολεοφιλικά λιπάσματα. Κάθε είδος θρεπτικής ουσίας έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς του. Τα γενικά χαρακτηριστικά αυτών των θρεπτικών ουσιών και των σημαντικών παραγόντων που επηρεάζουν την παραμονή τους στον πεδίο, όπως είναι τα κύματα και οι παλίρροιες και η φυσική διεύθυνση, θα συζητηθούν σε αυτό το τμήμα και θα συνοψιστούν στον πίνακα 3.1.

3.1.1 Υδατοδιαλυτά Θρεπτικά

Τα κοινώς χρησιμοποιούμενα υδατοδιαλυτά θρεπτικά προϊόντα είναι τα ανόργανα άλατα (π.χ. KNO_3 , NaNO_3 , NH_3NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4), και πολλά εμπορικά ανόργανα λιπάσματα (π.χ. το λίπασμα κήπων 23:2 N:P που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του *Exxon Valdez*). Εφαρμόζονται συνήθως στο πεδίο μέσω του ψεκασμού των θρεπτικών διαλυμάτων ή της διασποράς των ξηρών κόκκων. Αυτή η προσέγγιση είναι αποτελεσματική στην ενίσχυση της βιοδιάσπασης του πετρελαίου σε πολλές δοκιμές πεδίου (Swannell *et al.*, 1996; Venosa *et al.*, 1996). Έναντι άλλων τύπων θρεπτικών ουσιών, οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες είναι άμεσα διαθέσιμες και ευκολότερο να χειριστούν για να διατηρήσουν τις θρεπτικές συγκεντρώσεις στόχους στο νερό των πόρων. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτού του είδους θρεπτικών ουσιών έναντι των οργανικών λιπασμάτων είναι ότι η χρήση των ανόργανων θρεπτικών ουσιών αποβάλλει τον πιθανό ανταγωνισμό των πηγών άνθρακα. Η μελέτη στο πεδίο έδειξε ότι αν και τα οργανικά λιπάσματα είχαν μια μεγαλύτερη επίδραση στη συνολική ανάπτυξη και δραστηριότητα των ετεροτροφών μικροβίων, οι ανόργανες θρεπτικές ουσίες ήταν αποτελεσματικότερες στην υποκίνηση της αποικοδόμησης του αργού πετρελαίου [72].

Ωστόσο, οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες έχουν επίσης διάφορα πιθανά μειονεκτήματα. Κατ' αρχάς, είναι πιθανότερο να ξεπλυθούν από τη δράση των παλιρροιών και των κυμάτων λόγω της υδατοδιαλυτότητάς τους. Η μελέτη πεδίου στο Maine κατέδειξε ότι οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες μπορούν να ξεπλυθούν μέσα σε έναν παλιρροιακό κύκλο στις υψηλής ενέργειας παραλίες ([73], [74]). Δεύτερον, οι ανόργανες θρεπτικές ουσίες, η αμμωνία ειδικότερα, πρέπει να προστεθεί προσεκτικά για να μην ξεπεραστούν τα τοξικά όρια. Ωστόσο από τις μέχρι τώρα δοκιμές που έγιναν στο πεδίο, δεν έχει παρατηρηθεί οξεία τοξικότητα στα ευαίσθητα είδη ως αποτέλεσμα της προσθήκης

μεγάλων ποσοτήτων υδατοδιαλυτών θρεπτικών ουσιών ([22], [13]). Τρίτον, οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες ίσως να χρειάζεται να προστεθούν συχνότερα από τις βραδείας απελευθερώσεως θρεπτικές ουσίες ή τις οργανικές θρεπτικές ουσίες, με συνέπεια να είναι πιο έντονη η χειρωνακτική εργασία, πιο δαπανηρές και παρεισφρητικές εφαρμογές.

Πίνακας 3.1: Σημαντικότερα είδη θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιοαποικοδόμηση πετρελαίου

Είδος θρεπτικών	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογές στο πεδίο
Υδατοδιαλυτά (π.χ. KNO_3 , NaNO_3 , NH_3NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4)	Άμεσα διαθέσιμα Εύκολα στο χειρισμό για να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις στόχοι των θρεπτικών Δεν επιδρούν με την οργανική ύλη	Ξεπλένονται γρήγορα από τα κύμματα Απαιτείται χειρωνακτική εργασία και φυσικές παρεισφρητικές εφαρμογές Πιθανή τοξική επίδραση	Alaska (Pritchard <i>et al.</i> , 1992) Delaware (Venosa <i>et al.</i> , 1996)
Βραδείας Απελευθέρωσης (π.χ. Customblen, IBDU, Max-Bac)	Παροχή συνεχούς πηγής θρεπτικών και μπορεί να είναι πιο φθηνή η εφαρμογή τους σε σχέση με άλλου είδους θρεπτικά	Η διατήρηση βέλτιστων ρυθμών απελευθέρωσης θρεπτικών παραμένει πρόκληση	Alaska (Pritchard <i>et al.</i> , 1992) Nova Scotia (Lee <i>et al.</i> , 1993)
Ολεοφιλικά (π.χ. Inipol EAP22, F1, MM80)	Ικανά να προσκολλούνται στο πετρέλαιο και έτσι να παρέχουν θρεπτικά στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος	Ακριβά Η αποτελεσματικότητα τους είναι μεταβλητή Περιέχουν οργανικό άνθρακα, ο οποίος μπορεί να συναγωνιστεί την διάσπαση του πετρελαίου και έτσι να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ανοξικές συνθήκες	Alaska (Pritchard <i>et al.</i> , 1992) Nova Scotia (Lee <i>et al.</i> , 1987, 1989, 1995a & b)

3.1.2 Κοκκώδη Βραδείας Απελευθέρωσης Θρεπτικά (slow-release)

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να σχεδιαστεί ένα συστήματα διανομής θρεπτικών που να υπερνικά τα προβλήματα έκπλυσης (washout problems) χαρακτηριστικά των παλιρροιακών περιβαλλόντων [17]. Η χρήση των λιπασμάτων βραδείας απελευθέρωσης είναι μια από τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για να παρέχουν συνεχώς θρεπτικές ουσίες τις ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης είναι συνήθως σε στερεή μορφή, αποτελούνται από ανόργανες θρεπτικές ουσίες που επικαλύπτονται με υδροφοβικά υλικά όπως η παραφίνη ή τα φυτικά έλαια. Αυτή η προσέγγιση μπορεί επίσης να κοστίζει λιγότερο από ότι να προστίθενται υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες λόγω των λιγότερο συχνών εφαρμογών. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης είναι πολλά υποσχόμενα με βάση τις μελέτες βιοεξυγίανσης και τις εφαρμογές τους. Παραδείγματος χάριν, διαπιστώθηκε ότι η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου ενισχύθηκε αρκετά από την προσθήκη ενός επικαλυμμένου με παραφίνη $MgNH_4PO_4$ λιπάσματος [75]. Ένα άλλο λίπασμα βραδείας απελευθέρωσης, το Customblen (φωσφορικό ασβέστιο, φωσφορικό αμμώνιο και νιτρικό αμμώνιο επικαλυμμένα με φυτικό έλαιο), απέδωσε καλά σε μερικές από τις ακτές του Prince William Sound, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με ένα ολεοφιλικό λίπασμα ([76], [77], [18]). Επίσης απεδείχθη ότι οι ρυθμοί βιοδιάσπασης του πετρελαίου αυξήθηκαν με τη χρήση ενός λιπάσματος βραδείας απελευθέρωσης (ουρία επικαλυμμένη με θείο) έναντι των υδατοδιαλυτών λιπασμάτων.

Ωστόσο, η σημαντικότερη πρόκληση για αυτήν την τεχνολογία είναι ο έλεγχος των ρυθμών απελευθέρωσης έτσι ώστε οι βέλτιστες συγκεντρώσεις θρεπτικών να μπορούν να διατηρηθούν στο νερό των πόρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Παραδείγματος χάριν, εάν οι θρεπτικές ουσίες απελευθερώνονται πάρα πολύ γρήγορα, υπόκεινται σε γρήγορη έκπλυση (rapid washout) τότε δεν θα ενεργήσουν ως μακράς διάρκειας πηγή. Αφ' ετέρου, εάν απελευθερώνονται πάρα πολύ αργά, η συγκέντρωση δεν θα φτάσει ποτέ σε ένα επίπεδο που να είναι επαρκές για να υποστηρίξει γρήγορους ρυθμούς βιοδιάσπασης, και η προκύπτουσα διέγερση (stimulation) θα είναι λιγότερο αποτελεσματική από όσο θα μπορούσε να είναι. Οι δοκιμές πεδίου στις ακτές του Prince William Sound έδειξαν ότι σε ορισμένες παραλίες, οι κόκκοι Customblen ξεπλύθηκαν προφανώς μακριά προτού να καταγραφεί οποιαδήποτε σημαντική αύξηση βιοεξυγίανσης [18]. Διάφορες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μια θρεπτική ουσία βραδείας απελευθέρωσης (Max Bac, ένα

προϊόν παρόμοιο με το Customblen) απέτυχε να καταδείξει αύξηση στην αποικοδόμηση του πετρελαίου επειδή ο ρυθμός απελευθέρωσης του θρεπτικού ήταν πάρα πολύ αργός για να έχει επιδράσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου ([78], [79]).

3.1.3 Ολεοφιλικά Θρεπτικά

Μια άλλη προσέγγιση για να υπερνικηθεί το πρόβλημα των υδατοδιαλυτών θρεπτικών ουσιών (water-soluble nutrients) που ξεπλένονται γρήγορα ήταν να χρησιμοποιηθούν ολεοφιλικές οργανικές θρεπτικές ουσίες ([80], [81]). Η λογική για την στρατηγική αυτή είναι ότι η βιοδιάσπαση του πετρελαίου εμφανίζεται κυρίως στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος, δεδομένου ότι τα ολεοφιλικά λιπάσματα είναι σε θέση να εμμείνουν στο πετρέλαιο και να παρέχουν τις θρεπτικές ουσίες στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος, μπορεί να υφίστανται ενισχυμένη βιοδιάσπαση χωρίς την ανάγκη να αυξηθούν οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στο νερό των πόρων. Ένα γνωστό ολεοφιλικό λίπασμα είναι το Inipol EAP 22, μικρογαλάκτωμα (microemulsion) που περιέχει ουρία ως πηγή αζώτου, lauryl phosphate (πηγή φωσφόρου), 2-βουτοξυ-1-αιθανόλη ως επιφανειοδραστική ένωση και ελαϊκό οξύ για να δώσει στο υλικό υδροφοβικότητα. Αυτό το λίπασμα έχει υποβληθεί σε εκτενείς μελέτες υπό διάφορες συνθήκες ακτών και χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στη βιοεξυγίανση πετρελαίου στην Prince William Sound ακτή. Άλλα ολεοφιλικά οργανικά λιπάσματα είναι η πολυμερισμένη ουρία και η φορμαλδεϋδη και μερικά οργανικά λιπάσματα που προέρχονται από φυσικά προϊόντα όπως το ιχθυάλευρο (fishmeal) ([72], [82], [79]).

Η αποτελεσματικότητα των ολεοφιλικών λιπασμάτων εξαρτάται επίσης από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος όπως η δράση των κυμάτων και της παλίρροιας και οι τύποι των ιζημάτων. Με βάση διάφορες αρχικές μελέτες, τα ολεοφιλικά λιπάσματα αποδείχθηκαν αποτελεσματικότερα από τα υδατοδιαλυτά λιπάσματα όταν το πετρέλαιο πέρασε στη διαπαλιρροιακή ζώνη (intertidal zone) [83]. Αλλά δεν έχουν κανένα πλεονέκτημα στην ενίσχυση της βιοδιάσπασης του πετρελαίου στη supralittoral ζώνη όπου η μεταφορά ύδατος είναι περιορισμένη. Το Inipol EAP 22 βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικότερο σε χονδροκοκκα ιζήματα απ'ό,τι στα λεπτόκοκκα ιζήματα λόγω της δυσκολίας διείσδυσης για του ολεοφιλικού λίπασματος στα λεπτόκοκκα ιζήματα [84]. Επίσης έχουν παραχθεί Μεταβλητά αποτελέσματα σχετικά με την παραμονή των

ολεοφιλικών λιπασμάτων. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι το Inipol EAP 22 μπορεί να παραμείνει σε μια αμμώδη παραλία για πολύ καιρό κάτω από προσωμοιούμενες ενέργειες παλίρροιας και κυμάτων ([85], [86]). Άλλοι διαπίστωσαν ότι το Inipol EAP22 ξεπλύθηκε γρήγορα πριν καν διατεθεί στα βακτήρια βιοαποδομητές υδρογονανθράκων ([87], [88]). Ένα άλλο μειονέκτημα με τα ολεοφιλικά λιπάσματα είναι ότι περιέχουν οργανικό άνθρακα που μπορεί να βιοδιασπαστεί κατά προτίμηση από τους μικροοργανισμούς σε σχέση με τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου ([72], [89]) και μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ανοξικές συνθήκες ([90], [79]).

Εν περιλήψει, η αποτελεσματικότητα αυτών των διάφορων τύπων θρεπτικών ουσιών θα εξαρτηθεί από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης μπορούν να αποτελέσουν ιδανικές πηγές θρεπτικών εάν οι ρυθμοί απελευθέρωσης των θρεπτικών μπορούν να ελεγχθούν καλά. Τα υδατοδιαλυτά λιπάσματα (ater-soluble fertilizers) είναι οικονομικότερα και αποδοτικότερα σε λεπτόκοκκες χαμηλής ενέργειας ακτές όπου η μεταφορά ύδατος είναι περιορισμένη. Τα ολεοφιλικά λιπάσματα είναι καταλληλότερα για χρήση σε χονδρόκοκκες υψηλής ενέργειας παραλίες. Εντούτοις, για την επιτυχή εφαρμογή των προϊόντων βιοεξυγίανσης απαιτούνται πάντα κατάλληλες δοκιμές για την αξιολόγηση τους βασισμένες στις συγκεκριμένες συνθήκες κάθε ρυπασμένης περιοχής.

Πίνακας 3.2: Παράγοντες βιοαποικοδόμησης στο NCP κατάλογο προϊόντων [91]

Είδος	Ονομασία προϊόντος	Παρασκευαστής
Biological additives (Microbial Culture or Enzyme additives)	BET BIOPETRO	BioEnviro Tech, Tomball, TX
	BIOGEE HC	RMC Bioremediation, Shreveport, LA
	BR (formerly ENVIROZYME BR)	Enviro-Zyme, Inc., Stormville, NY
	ENZYT (LIQUID/CRYSTA)	Acorn Biotechnical Corporation Houston, TX
	MICRO-BLAZE	Verde Environmental, Inc., Houston, TX
	OPPENHEIMER FORMULA	Oppenheimer Biotechnology, Inc. Austin, TX
	PRISTINE SEA II	Marine Systems, Baton Rouge, LA
	PRP (Petroleum	Petrol Rem, Inc., Pittsburgh, PA

	Remediation Product)	
	STEP ONE	B & S Research, Inc. Embarrass, MN
	SYSTEM E.T. 20	Quantum Environmental Technologies, Inc. (QET), La Jolla, CA
	WMI-2000	Waste Microbes, Inc., Houston, TX
Nutrient additives	INIPOL EAP 22 (oleophilic)	Societe, CECA S.A. France
	LAND AND SEA RESTORATION	Land and Sea Restoration LLC, San Antonio, TX
	OIL SPILL EATER II	Oil Spill Eater International, Corporation Dallas, TX
	VB591TMWATER, VB997TMSOIL, AND BINUTRIX (partially encapsulated & oleophilic)	BioNutraTech, Inc., Houston, TX

3.2 Εφαρμογή Μικροοργανισμών

Η προσθήκη μικροοργανισμών αποδομούντων πετρέλαιο ή αλλιώς βιοενίσχυση (bioaugmentation) έχει προταθεί ως στρατηγική βιοεξυγίανσης. Η λογική σε αυτήν την προσέγγιση περιλαμβάνει τον ισχυρισμό ότι οι γηγενείς μικροβιακοί πληθυσμοί μπορεί να μην είναι ικανοί να αποικοδομήσουν το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που είναι παρόντα στα σύνθετα μίγματα όπως το πετρέλαιο και ότι ο εμβολιασμός με αυτούς μπορεί να μειώσει την λανθάνουσα περίοδο προτού αρχίσει η βιοεξυγίανση ([92], [26]). Για να είναι επιτυχής αυτή η προσέγγιση στο πεδίο, οι μικροοργανισμοί που προστίθενται πρέπει να είναι σε θέση να αποικοδομούν τα περισσότερα συστατικά του πετρελαίου, να διατηρούν τη γενετική σταθερότητα και τη βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, να επιζούν σε ξένα και εχθρικά περιβάλλοντα, να ανταγωνίζονται αποτελεσματικά με τους γηγενείς μικροοργανισμούς και να κινούνται μέσω των πόρων του ιζήματος προς τους ρυπαντές ([93], [94]).

Υπάρχουν πολλοί προμηθευτές προϊόντων βιοεξυγίανσης, οι οποίοι ισχυρίζονται ότι το προϊόν τους (οι περισσότεροι από αυτούς είναι μικροβιακοί παράγοντες) ενισχύει τη διαδικασία βιοδιάσπασης του πετρελαίου. Η U.S. EPA έχει συντάξει έναν κατάλογο με παράγοντες βιοεξυγίανσης [91] ως τμήμα του National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan (NCP) Product Schedule, το οποίο απαιτείται από τον Clean Water Act, the Oil Pollution Act of 1990 και το National Contingency Plan. Ένας τρέχων κατάλογος παραγόντων βιοεξυγίανσης στο πρόγραμμα NCP παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2. Ένα προϊόν μπαίνει σε αυτή τη λίστα μόνο όταν καταδειχθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά του υπό τους όρους ενός πρωτοκόλλου δοκιμής που αναπτύχθηκε από την EPA [95]. Εντούτοις, η λίστα δεν σημαίνει ότι το προϊόν συστήνεται ή πιστοποιείται για τη χρήση σε μια διαρροή πετρελαίου [91]. Το πρωτόκολλο δοκιμής αποτελεσματικότητας χρησιμοποιεί φιάλες ανάδευσης για να συγκρίνει την αποικοδόμηση του τεχνητά-γηρασμένου αργού πετρελαίου στο φυσικό νερό της θάλασσας με και χωρίς ένα προϊόν βιοεξυγίανσης.

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, ακόμα κι αν η προσθήκη μικροοργανισμών μπορεί να είναι σε θέση να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στο εργαστήριο, η αποτελεσματικότητά της δεν έχει καταδειχθεί πειστικά στο πεδίο. Πραγματικά, οι περισσότερες μελέτες πεδίου έδειξαν ότι η βιοενίσχυση δεν είναι αποτελεσματική στην ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου στις θαλάσσιες ακτές και ότι απεναντίας η προσθήκη θρεπτικών ή αλλιώς βιοδιέγερση (biostimulation) μόνο της είχε μεγαλύτερη επίδραση στη βιοδιάσπαση πετρελαίου ([96], [87], [31], [20]). Η αποτυχία της βιοενίσχυσης bioaugmentation στο πεδίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η ικανότητα μεταφοράς στα περισσότερα περιβαλλόντα καθορίζεται από παράγοντες που δεν επηρεάζονται από μια εξωγενή πηγή μικροοργανισμών (όπως η αρπαγή με τα πρωτόζωα, η περιοχή επιφάνειας πετρελαίου, ή η έκπλυση της συνημμένης βιομάζας από τη δραστηριότητα των κυμάτων), και ότι τα προστιθέμενα βακτήρια φαίνονται να ανταγωνίζονται λίγο με το γηγενή πληθυσμό ([97], [8], [98]). Επομένως, είναι απίθανο οι εξωτερικά προστιθέμενοι μικροοργανισμοί να παραμείνουν σε μια ρυπασμένη παραλία ακόμα και όταν προστίθενται σε υψηλούς αριθμούς. Εν ολίγοις, εκείνα τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν για μια επιτυχή αποίκιση είναι πολύ δύσκολο να ικανοποιηθούν στο πεδίο.

Ευτυχώς, μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το πετρέλαιο υπάρχουν παντού στο περιβάλλον και μπορούν να αυξηθούν κατά πολλές τάξεις μεγέθους αφού εκτεθούν στο

αργό πετρέλαιο ([16], [87], [99]). Επομένως, στα περισσότερα περιβάλλοντα, δεν υπάρχει συνήθως καμία ανάγκη να προστεθούν τα βιοαποδομητές υδρογονανθράκων. Σε ορισμένες περιστάσεις που δεν έχουν καθοριστεί καλά, όπως όταν δηλαδή τα γηγενή βακτήρια είναι ανίκανα να αποικοδομήσουν έναν ή περισσότερους σημαντικούς ρυπαντές, τότε η προσθήκη των μικροβιακών εμβολιασμών (microbial inocula) μπορεί να ληφθεί υπόψη. Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (genetically engineered organisms) δεν είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν στο κοντινό ή ακόμα και απώτερο μέλλον.

3.3 Εφαρμογή Οξυγόνου

Το οξυγόνο δεν αποτελεί συνήθως περιοριστικό παράγοντα για πολλές αμμώδεις παραλίες. Ωστόσο, ο περιορισμός σε οξυγόνο μπορεί να εμφανιστεί σε λεπτόκοκκες ακτές όπως υποδεικνύεται από μερικές μελέτες πεδίου ([100], [101]). Κάτω από τέτοιες περιστάσεις, η τροποποίηση του οξυγόνου μπορεί να θεωρηθεί ως στρατηγική βιοεξυγίανσης. Αν και ο ανεφοδιασμός οξυγόνου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βιοεξυγίανση του πετρελαίου σε εδάφη και υπόγεια νερά, αυτή η στρατηγική δεν έχει εφαρμοστεί για να ενισχύσει την αποικοδόμηση του πετρελαίου στις ακτογραμμές. Αυτό συμβαίνει επειδή η εφαρμογή του οξυγόνου περιλαμβάνει συνήθως ακριβές και περιβαλλοντικά παρεισφρητικές διεργασίες. Για τη βιοεξυγίανση μιας μεγάλης κλίμακας διαρροής πετρελαίου, η χρήση αυτής της προσέγγισης δεν είναι πρακτική ακόμα και όταν το οξυγόνο αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες που υπάρχει ρύπανση πετρελαίου μικρότερης κλίμακας και σε λιγότερο ευαίσθητους βιότοπους, η εφαρμογή του οξυγόνου μπορεί ακόμα να θεωρηθεί ως μια εναλλακτική λύση για τη βιοεξυγίανση του πετρελαίου. Οι κοινώς χρησιμοποιημένες τεχνικές παροχής οξυγόνου είναι η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling), ο εξαναγκασμένος αερισμός (forced aeration) και οι χημικές μέθοδοι ([102], [103], [104]). Αυτές οι μέθοδοι συνοψίζονται κατωτέρω. Είναι συνήθως βασισμένες σε μελέτες και πρακτικές σε εδάφη. Ιδιαίτερη προσοχή θα δοθεί στις δυνατότητες εφαρμογής τους στο θαλάσσιο περιβάλλον.

3.3.1 Επιφανειακή Κατεργασία Εδάφους

Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους είναι μια συμβατική φυσική μέθοδος για να επιταχύνει τη φυσική απομάκρυνση του πετρελαίου εκθέτοντας τα ρυπασμένα ιζήματα σε ένα πιο υψηλό επίπεδο φυσικής απόξεσης (physical abrasion) και βιοχημικής αποδόμησης [105]. Αυτή η τεχνική αποτελεί επίσης έναν αποτελεσματικό τρόπο αερισμού για το επιφανειακό στρώμα των ιζημάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να επιταχύνει τη βιοδιάσπαση στη διάθεση στο έδαφος των απορριμμάτων (landfarming) ([102], [106]). Οι παραδοσιακές μηχανές επιφανειακής κατεργασίας εδάφους, όπως οι δισκοσβάρνες (disk harrows) και τα rototillers, μπορούν να αερίσουν το επιφανειακό έδαφος σε βάθος από 6 έως 24 ίντσες. Τα ιζήματα που βρίσκονται βαθύτερα από περίπου 2 ft (60 cm) μπορούν να αεριστούν με τη χρησιμοποίηση κατασκευαστικού εξοπλισμού, όπως backhoe [104].

Αυτήν την περίοδο, η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους έχει προταθεί ως φυσική μέθοδος για να επιταχύνει τις φυσικές διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου στις αμμώδεις ή χονδρόκοκκες παραλίες [105]. Ο κύριος σκοπός αυτής της πρακτικής είναι να αυξηθεί η φυσικά απόξεση (physical abrasion) των πετρελαίων παρά να ενισχυθεί ο αερισμός δεδομένου ότι το οξυγόνο δεν είναι συνήθως περιοριστικός παράγοντας σε αυτά τα περιβάλλοντα. Εντούτοις, βασισμένοι στην υπάρχουσα εμπειρία από τη landfarming τεχνική, μπορεί να βοηθήσει η ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου σε μερικές παραλίες με λεπτό-ίζημα όπου το οξυγόνο είναι περιορισμένο. Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους θεωρείται επίσης χαμηλού κόστους τεχνολογία μεταξύ των διαθέσιμων μεθόδων αερισμού [106].

Σημαντικές ανησυχίες σχετικά με αυτήν την τεχνική αποτελούν η διαταραχή τόσο της φυσικής μορφής των ακτών όσο και της τοπικής χλωρίδας και πανίδας και η πιθανότητα απελευθέρωσης του πετρελαίου και του ρυπασμένου ιζήματος σε παρακείμενες θέσεις. Η εμπειρία από την δοκιμή πεδίου στο St. Lawrence ποταμό επίσης δείχνει ότι η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διείσδυση του πετρελαίου βαθιά στα ιζήματα των ακτών και μπορεί να μειώσει γενικά το ρυθμό βιοδιάσπασης πετρελαίου εάν το πετρέλαιο διεισδύσει στα αναερόβια ιζήματα [100].

3.3.2 Εξαναγκασμένος Αερισμός

Οι τεχνικές εξαναγκασμένου αερισμού, συμπεριλαμβανομένης της έγχυσης αεριούχου ύδατος, αέρα και καθαρού οξυγόνου, είναι ακριβές μέθοδοι και συνήθως χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της βιοεξυγίανσης στα υποεπιφανειακά ιζήματα και τα υπόγεια νερά που ρυπαίνονται με υδρογονάνθρακες πετρελαίου ([103], [104]). Η ρύπανση με πετρέλαιο των παράκτιων περιβαλλόντων, ωστόσο, εμφανίζεται συνήθως κοντά στην επιφάνεια, ειδικά όταν η ρύπανση είναι το αποτέλεσμα μιας παράκτιας πετρελαιοκηλίδας. Επιπλέον, το αργό πετρέλαιο διαπερνά σπάνια τα παράκτια ιζήματα σε βάθη μεγαλύτερα από ένα πόδι [107]. Επομένως, αυτές οι τεχνικές υποεπιφανειακού αερισμού (subsurface aeration) δεν είναι πιθανών κατάλληλες για τη χρήση στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων σε θαλάσσιες ακτές.

3.3.3 Χημικές Μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την προσθήκη εναλλακτικών πηγών οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο υδρογόνου (H_2O_2), ή την προσθήκη εναλλακτικών δεκτών ηλεκτρονίων (alternative electron acceptors) όπως το νιτρικό άλας. Το υπεροξείδιο υδρογόνου μπορεί να παράσχει οξυγόνο με ρυθμό μέχρι δύο τάξεις μεγέθους γρηγορότερα από τις τεχνικές εξαναγκασμένου αερισμού [108]. Απαιτεί επίσης λιγότερο εξοπλισμό και μικρό κεφάλαιο. Εντούτοις, τα προβλήματα συμπεριλαμβανομένης της πάρα πολύ γρήγορης αποσύνθεσης, της παρεμπόδισης αερίου (gas blockage) και της ανεπαρκούς χρήσης αντιμετωπίστηκαν σε μερικές περιοχές κατά τη χρησιμοποίηση του H_2O_2 [108]. Η χημική αυτή ουσία μπορεί επίσης να είναι τοξική στους μικροοργανισμούς σε υψηλές συγκεντρώσεις [104].

Το νιτρικό άλας έχει λάβει την περισσότερη προσοχή ως εναλλακτικός αποδέκτης ηλεκτρονίων (alternative electron acceptor) επειδή είναι σχετικά ανέξοδο, πολύ υδατοδιαλυτό και δεν αποσυντίθεται. Δεδομένου ότι το νιτρικό άλας αποτελεί επίσης μια συχνά χρησιμοποιούμενη θρεπτική πηγή για τη βιοδιέγερση του πετρελαίου, η προσθήκη του νιτρικού άλατος μπορεί να είναι μια υποσχόμενη επιλογή για τη βιοεξυγίανση του πετρελαίου υπό περιοριστικές συνθήκες οξυγόνου. Ένα πιθανό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το νιτρικό άλας μπορεί να είναι αποτελεσματικό για την αποδόμηση

λιγότερων κατηγοριών ενώσεων από ότι το οξυγόνο. Έχει αναφερθεί ότι τα βακτήρια που είναι χρήστες νιτρικών μπορούν να αποδομήσουν πολλές αρωματικές ενώσεις αλλά δεν αποδομούν τις αλειφατικές ενώσεις και το βενζόλιο υπό συνθήκες απονιτροποίησης [109]. Εντούτοις, άλλοι πρόσφατα διαπίστωσαν ότι η αποικοδόμηση αλκανίων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί υπό συνθήκες απονιτροποίησης [110]. Το θειικό άλας είναι ένας άλλος πιθανώς χρήσιμος αποδέκτης ηλεκτρονίων (electron acceptor) ειδικά σε ορισμένα θαλάσσια περιβάλλοντα, όπως τα αλμυρά έλη, όπου η αναγωγή θεικών (sulfate reduction) είναι μια από τις πιο σημαντικές φυσικές διεργασίες [111]. Μερικές εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα PAHs και τα αλκάνια μπορούν να αποδομηθούν κάτω από συνθήκες αναγωγής θεικών σε παρόμοιους ρυθμούς με αυτών υπό αερόβιες συνθήκες σε κάποια θαλάσσια ιζήματα ([50], [51]). Ωστόσο, αυτοί οι υψηλοί ρυθμοί αποδόμησης του πετρελαίου κάτω από συνθήκες αναγωγής θεικών δεν έχουν αναφερθεί ούτε έχουν καταδειχθεί στο πεδίο.

Εν περιλήψει, η δυνατότητα χρήσης της εφαρμογής οξυγόνου για την ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου στις θαλάσσιες ακτές είναι περιορισμένη. Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να θεωρηθεί ως στρατηγική αερισμού για τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στο ανώτερο στρώμα των ιζημάτων σε λιγότερο ευαίσθητους βιότοπους. Το νιτρικό άλας θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός εναλλακτικός αποδέκτης ηλεκτρονίων για τη χρήση σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων, αλλά η χρήση του ως αποτελεσματικού ενισχυτή βιοδιάσπασης είναι αμφισβητήσιμη. Περισσότερες μελέτες, ιδιαίτερα δοκιμές στο πεδίο, απαιτούνται ακόμα για να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητα αυτών των στρατηγικών.

3.4 Μελέτες Βιοδιέγερσης Πετρελαίου σε Περιβάλλοντα Ανοιχτής Θαλάσσης

Επειδή κύριος στόχος αυτής της μελέτης είναι η βιοεξυγίανση πετρελαιοκηλίδων σε περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης με τη μέθοδο της βιοδιέγερσης, παρακάτω παρατίθενται κάποιες περιπτώσεις μελέτης της βιοδιέγερσης του πετρελαίου σε συνθήκες ανοιχτής θαλάσσης.

3.4.1 Εργαστηριακές Μελέτες στην Βιοδιέγερση Πετρελαίου

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην βιοδιέγερση του πετρελαίου στα ανοιχτά εν αντιθέσει με τις ακτές είναι να διατηρηθεί η βέλτιστη συγκέντρωση θρεπτικών σε επαφή με τη φάση του πετρελαίου. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να σχεδιαστεί ένα κατάλληλο σύστημα απελευθέρωσης θρεπτικών ούτως ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα έκπλυσης. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχουν γίνει έρευνες πάνω σε νέα ολεοφιλικά και βραδείας απελευθέρωσης θρεπτικά υλικά.

Οι Atlas και Bartha (1973) εξέτασαν διαφόρους συνδυασμούς ολεοφιλικών θρεπτικών και πρότειναν τον συνδυασμό παραφινική ουρία και octylphosphate ως τον καλύτερο δυνατό. Ως πηγές αζώτου προστέθηκαν odecyl urea, trimethylenetetraurea, and Sun Oil CRNF (ένα βραδείας απελευθέρωσης λίπασμα παραφινικής ουρίας, N- 26.8%). Ως υδατοδιαλυτό διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα), χρησιμοποιήθηκε KNO_3 . Όλες οι πηγές αζώτου προστέθηκαν σε τέτοιες ποσότητες ώστε να δώσουν τελική συγκέντρωση 10 mM N. Ως πηγές φωσφόρου προστέθηκαν octylphosphate, isooctylphosphate και hexamethylphosphoramide. Ως υδατοδιαλυτό διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα), χρησιμοποιήθηκε Na_2HPO_4 . Όλες οι πηγές φωσφόρου προστέθηκαν σε τέτοιες ποσότητες ώστε να δώσουν τελική συγκέντρωση 0.5 mM P.

Πίνακας 3.3: Ικανότητα διαφόρων πηγών αζώτου και φωσφόρου στην αποικοδόμηση του πετρελαίου

Nitrogen source	Phosphorus source	Oil biodegraded, %
KNO_3	Na_2HPO_4	70
KNO_3	Octylphosphate	72
KNO_3	Isooctylphosphate	70
CRNF	Na_2HPO_4	70
CRNF	Octylphosphate	72
Dodecylurea	Na_2HPO_4	37
Dodecylurea	Octylphosphate	35
Trimethylenetetraurea	Na_2HPO_4	15
Trimethylenetetraurea	Octylphosphate	15
Hexamethylphosphoramide	Hexamethylphosphoramide	15
None added	None added	5

Το λίπασμα CRNF με το octylphosphate επιλέχθηκαν ως ο πιο πολλά υποσχόμενος συνδυασμός θρεπτικών για την αποικοδόμηση πετρελαίου.

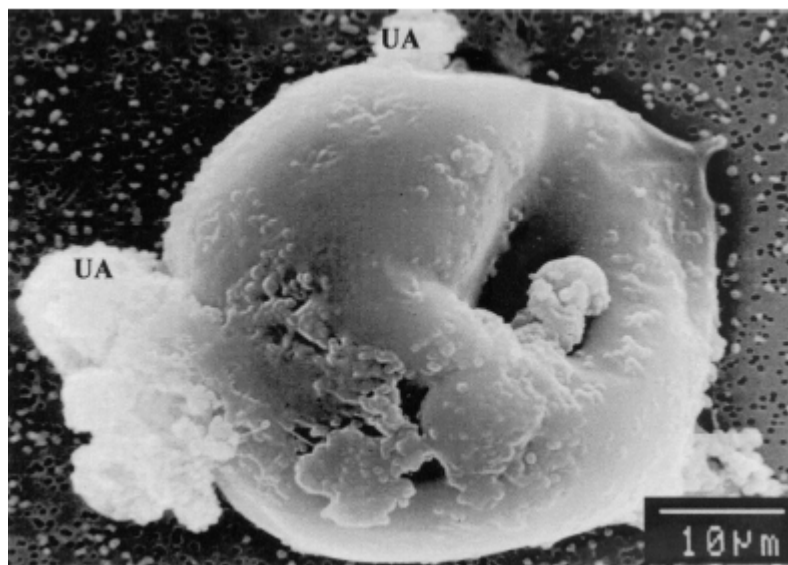
Το κόστος εφαρμογής αυτών των θρεπτικών για την επεξεργασία 1 τόνου πετρελαίου εκτιμάται ότι είναι λιγότερο από \$15 (υπολογισμένο βάσει των συνιστώμενων τιμών του παρασκευαστή για το CRNF και το octylphosphate) [80].

Οι Olivieri et al. εξέτασαν τη χρήση ενός νέου θρεπτικού υλικού βραδείας απελευθέρωσης PSF (Paraffin-supported fertilizer, MgNH_4PO_4). Επιλέχθηκε το

συγκεκριμένο λίπασμα διότι α) το MgNH_4PO_4 έχει μικρή διαλυτότητα, που είναι χαρακτηριστική για ένα βραδείας απελευθέρωσης λίπασμα, β) το MgNH_4PO_4 περιέχει στην ίδια ένωση άζωτο και φώσφορο με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η ανισόρροπη απελευθέρωση των δύο αυτών στοιχείων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση άλλων ανόργανων αλάτων, γ) δεν είναι τοξικό και δ) η παραφινποίηση (paraffinization) των αλάτων οδηγεί σε ένα σύστημα επίπλευσης που αποτελείται από σπογγοειδή συσσωματώματα ικανά να απορροφήσουν πετρέλαιο και νερό για το σχηματισμό μικροπεριβάλλοντων κατάλληλων για μικροβιακή ανάπτυξη. Βρέθηκε λοιπόν ότι με τη χρήση του PSF ενισχύθηκε η βιοαποικοδόμηση του Sarir αργού πετρελαίου, έτσι μετά από 21 μέρες το 63% είχε απομακρυνθεί σε σχέση με το 40% στο control [75].

Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη από τους Basseres et al (1993). Εξετάστηκαν θρεπτικά υλικά όπως ιχθυάλευρα και κρεατάλευρα (fish και meat meals) (τα προϊόντα αυτά περιέχουν ζωικές πρωτεΐνες με N/P λόγο 22/1 κοντά σε αυτόν που απαιτείται από τα βακτήρια 16/1) σε σχέση με έναν εμπορικό bioremediation agent INIPOL EAP 22. Εξετάστηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά: 1) διάλυμα ελέγχου χωρίς προσθήκη θρεπτικού υλικού, 2) ιχθυάλευρο, 3) κρεατάλευρο με 70% πρωτεΐνη, 4) κρεατάλευτο με 60% πρωτεΐνη, 5) κρεατάλευρο με 80% πρωτεΐνη και 6) INIPOL EAP 22. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από μια περίοδο επώασης 18 ημερών η βακτηριακή ανάπτυξη στα διαλύματα που προστέθηκαν θρεπτικά ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν στο διάλυμα ελέγχου. Επίσης η βιοαποικοδόμηση στα διαλύματα που περιείχαν θρεπτικά υλικά έφτασε το 40-50% σε σχέση με την μηδενική βιοαποικοδόμηση που παρατηρήθηκε στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα) [112].

Μια άλλη προσέγγιση ήταν η χρήση μη υδατοδιαλύτης πηγής αζώτου, όπως είναι το ουρικό οξύ. Το ουρικό οξύ είναι κύρια πηγή αζώτου, προερχόμενη από τα απορρίμματα πουλιών, ερπετών και πολλών εντόμων. Έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και είναι κύριο συστατικό των λιπασμάτων guano (περιττώματα). Το ουρικό οξύ προσαρτίζεται στο πετρέλαιο και για αυτό γίνεται διαθέσιμο στα βακτήρια που αναπτύσσονται στην διεπιφάνεια πετρελαίου ύδατος (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Προσκόλληση ουρικού οξέος στο πετρέλαιο

Πίνακας 3.4: Μικροβιακή ανάπτυξη και βαθμός αποικοδόμησης πετρελαίου από διάφορες πηγές αζώτου

N source (concn)	Cell yield	Petroleum degradation (%)
NH ₄ SO ₄ (1 mg/ml)	8×10^8	62
NH ₄ SO ₄ (1 mg/ml)	5×10^6	2
Uric acid (1 mg/ml)	9×10^8	67
Uric acid (1 mg/ml)	4×10^8	50
Uric acid (0.5 mg/ml)	6×10^8	49
Uric acid (0.25 mg/ml)	2×10^8	48

όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα 3.4 το ουρικό οξύ μπορεί να α) χρησιμοποιηθεί σαν πηγή αζώτου για τα βακτήρια που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες και β) να δεσμεύσει το ακατέργαστο πετρέλαιο, κάνοντας το έτσι ένα πιθανά χρήσιμο λίπασμα αζώτου για την βιοεξυγίανση πετρελαιοκηλίδων σε περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης [113].

Μια σημαντική ερώτηση είναι εάν η προσθήκη πηγών οργανικού άνθρακα όπως είναι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις και οι μελάσες θα αυξήσει την ανάπτυξη των μικροβιακών αποδομητών του πετρελαίου και θα ενισχύσει έτσι την βιοαποικοδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.

Βρέθηκε ότι η προσθήκη μελάσας (0.01% v/w, i.e. 0.2 mL) που προέρχεται από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου σε 20mg πετρελαίου αύξησε αξιοπρόσεκτα την αναπνοή (respiration) και συνδέεται με την σημαντική αποικοδόμηση των n-αλκανίων. Στις μελάσσες, ο άνθρακας είναι διαθέσιμος υπό μορφή σακχάρου.

Για τις μελάσσες το ποσοστό μείωσης των n-αλκανίων ήταν υψηλότερο από ότι με το ανόργανο λίπασμα, καταδεικνύοντας ότι η προσθήκη πηγών οργανικού άνθρακα μπορεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να ενισχυθεί τη βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων σε σύγκριση με τα ανόργανα λιπάσματα που δεν έχουν πηγή άνθρακα.

Όπως αποδείχτηκε από αυτή την εργασία, τα βακτήρια που διατέθηκαν από εναλλακτικές πηγές άνθρακα και άλλα θρεπτικά, όπως οι βιταμίνες που είναι παρούσες μέσα στις μελάσσες, έδειξαν ενισχυμένη αναπνοή (respiration) σε σύγκριση με αυτά που διατέθηκαν με πετρελαιοϊκούς άνθρακες και ανόργανα λιπάσματα μόνο.

Η χρήση της μελάσσας που είναι ένα παραπροϊόν της ζάχαρης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης πετρελαιοκηλίδων και να εφαρμοστεί όπου η θάλασσα είναι ήρεμη [114].

Οι Lacotte et al εξέτασαν την επίδραση ύστερα από συνδυασμένη εφαρμογή λιπόφιλων θρεπτικών (FM, MM80) με πηγή οργανικού άνθρακα που έχει ιδιότητες επιφανειοδραστικών ενώσεων όπως είναι τα sophorolipids στην αποικοδόμηση των πετρελαιοϊκών υδρογονανθράκων. Το FM είναι ιχθυάλευρο που περιέχει 11% N και 0.5% P. Το MM80 είναι κρεατάλευρο με 80% πρωτεΐνη που περιέχει 12.7% N και 1.55% P. Τα sophorolipids είναι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης και είναι μίγμα lactones και λιπαρών οξέων.

Τα sophorolipids επιταχύνουν την βιοδιάσπαση του πετρελαίου και έχουν μια επίδραση γαλακτωματοποίησης στην αρχή της επώασης. Το ιχθυάλευρο φαίνεται ότι είχε την ίδια επίδραση αλλά σε μικρότερη κλίμακα. Ύστερα από τρεις εβδομάδες επώασης το πιο σημαντικό επίπεδο βιοαποικοδόμησης επιτεύχθηκε με το MM80. Για τις διάφορες συγκεντρώσεις FM και MM80 που εξετάστηκαν (0.1-1 mg/mL), το FM έδειξε ότι ακόμα και σε συγκέντρωση 1 mg/mL δεν επιτυγχάνει βαθμό βιοαποικοδόμησης μεγαλύτερο από αυτόν του διαλύματος ελέγχου. Αντίθετα το MM80 σε συγκέντρωση 0.5 mg/mL έδειξε ότι επιτυγχάνει παρόμοιες απομακρύνσεις με αυτές του διαλύματος ελέγχου. Αυτή λοιπόν η συγκέντρωση του MM80 συνδυάστηκε με την προσθήκη 0.1 mg/mL sophorolipids και διαπιστώθηκε ότι η κινητική της βιοαποικοδόμησης επιταχύνεται με την προσθήκη των sophorolipids αλλά το τελικό επίπεδο βιοαποικοδόμησης παραμένει ίδιο [115].

Σε έρευνα που διεξήχθη από τους Olivieri et al. (1978) εξετάστηκε η χρήση της λεκιθίνης που προέρχεται από την επεξεργασία της σόγιας με την διπλή ιδιότητα της ως πηγή φωσφόρου και επιφανειοδραστικής ένωσης βιολογικής προέλευσης. Ως εξεταζόμενες λιπόφιλες πηγές φωσφόρου χρησιμοποιήθηκαν: λεκιθίνη, octylphosphate, dibutyloctyl

phosphate, decyl phosphate, tributyl phosphate και K_2HPO_4 . Οι εξεταζόμενες πηγές αζώτου ήταν: phenyl hydantoin, butyl hydantoinate, ethyl allophanate, dodecyl urea, φαινυλοακετυλική ουρία (phenylacetyl urea) και NH_4Cl . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λεκιθίνη ενισχύει σημαντικά τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης σε σχέση με τα διαλυτά phosphates. Αποδεικνύεται δε ότι τα φυσικά φωσφολιπίδια (phospholipids) όπως η λεκιθίνη από πρακτικής απόψεως είναι κατάλληλη πηγή φωσφόρου επειδή είναι λιποδιαλυτή, μπορεί να βρεθεί σε πολύ χαμηλή τιμή αφού είναι παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας της σόγιας (oil seeds industry), έχει ιδιότητες επιφανειοδραστικής ένωσης και είναι απολύτως μη τοξική. Η χρήση επίσης τόσο του ethyl allophanate όσο και του phenyl hydantoin ως πηγών αζώτου κρίνεται κατάλληλη. Με προτίμηση στο πρώτο αφού τυχαίνει να παρασκευάζεται από φθηνά σχετικά χημικά και περιέχει περισσότερο ποσοστό αζώτου (21.2%) και φωσφόρου (15.9%) [116].

3.4.2 Μελέτες Μεσόκοσμου στην βιοδιέγερση του πετρελαίου

Η βιοαποικοδόμηση του ιρανικού ελαφρού αργού πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον εξετάστηκε σε τρεις μεσόκοσμους (mesocosms), προσομοιώνοντας το άγριο οικοσύστημα της Μεσογείου. Δύο ολεοφιλικά λιπάσματα, Inipol EAP-22 και F1 (τροποποιημένο ιχθυάλευρο), συγκρίθηκαν με βάση την βιοαποικοδόμηση που επιτυγχάνεται από το καθένα. Τα πειράματα διεξήχθησαν κάτω από τυπικές, ήπιες χειμερινές συνθήκες που συναντώνται στην Μεσόγειο σε μία δεξαμενή 3 m^3 ($3 \times 1 \times 1\text{ m}$). 3L ιρανικού ελαφρού αργού πετρελαίου αναμείχθηκαν με (α) 330 mL Inipol και (β) 330 g F1.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από την άποψη του βαθμού βιοδιάσπασης του πετρελαίου το F1 ήταν πιο αποτελεσματικό και πιο δραστικό. Ωστόσο από την άποψη της εμφάνισης, το Inipol EAP-22, απέδωσε ανώτερα αποτελέσματα σε σχέση με το F1. Η πετρελαιοκηλίδα κατά την εφαρμογή του Inipol EAP-22 είχε εξαφανιστεί πλήρως μετά από 15 μέρες [117].

Επίσης διεξήχθησαν δυο πειράματα μεσοκόσμου για να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της δράσης των κυμάτων, των λιπασμάτων (F1 και Inipol EAP-22) και του χρόνου στην βιοαποικοδόμηση του ιρανικού ελαφρού αργού πετρελαίου. Προσομοιάστηκαν τρία

επίπεδα δράσης κυμάτων («υψηλός κυματισμός»: ύψος κύματος 20 cm, 1 κύμα ανά 27 s, «μηδενικός κυματισμός»: 10 cm, 1 κύμα ανά 22 s, «μηδενικός κυματισμός»).

Στο πρώτο πείραμα 120 g F1 απλώθηκαν στην επιφάνεια της δεξαμενής και στο δεύτερο πείραμα 300 mL Inipol ψεκάστηκαν στην επιφάνεια της δεξαμενής.

Επιδράσεις F1: Η αποικοδόμηση των κορεσμένων υδρογονανθράκων είναι πιο αποτελεσματική κάτω από «μηδενικός κυματισμός» συνθήκες. Η βιοαποικοδόμηση σε ήπιες συνθήκες ήταν αρκετά χαμηλότερη από κάθε άλλη επεξεργασία σε οποιαδήποτε άλλη μέρα.

Επιδράσεις Inipol: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου ανάμεσα σε μέρες και διαφορετικές επεξεργασίες. Ο μεγαλύτερος και μικρότερος αριθμός βακτηρίων παρατηρήθηκε σε συνθήκες «μηδενικός κυματισμός» και «υψηλός κυματισμός» αντιστοίχως.

Site	Fertilizer	Biodegradation order
Surface	F1	'no-wave' > 'low-wave' > 'high-wave'
	Inipol	No differences

Στην επιφάνεια σε ότι αφορά την επεξεργασία με F1 οι συνθήκες «μηδενικός κυματισμός» ήταν οι πιο αποτελεσματικές. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει πληθώρα ή ενισχυμένη δράση βακτηρίων που αποικοδομούν το πετρέλαιο στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος σε ήρεμες συνθήκες. Πράγμα το οποίο επιβεβαιώθηκε από τις μετρήσεις του βακτηριακού πληθυσμού. Το F1 απεδείχθη πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το Inipol και σε άλλα πειράματα μεσοκόσμου που διεξήχθησαν με ίδια θερμοκρασία [85].

3.5 Η επιλογή των κατάλληλων θρεπτικών προς εξέταση

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός θρεπτικών ουσιών που να επιτυγχάνει την βιοποικοδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων στα περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης. Ωστόσο όπως περιγράφηκε και στα κεφάλαια 2 και 3 η εκλογή των κατάλληλων θρεπτικών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε

1. να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης των θρεπτικών λόγω της δράσης των κυμάτων
2. να είναι δυνατή η δράση τους στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος
3. να είναι εύκολα βιοδιασπάσιμα και μη τοξικά
4. το κόστος εφαρμογής τους μικρό.

Για να αντιμετωπιστεί λοιπόν το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης των θρεπτικών θα πρέπει τα επιλεγμένα θρεπτικά υλικά να είναι κατά προτίμηση μη υδατοδιαλυτά άρα να εμπίπτουν στην κατηγορία των βραδείας απελευθερώσεως ή ολεοφιλικών θρεπτικών. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε προηγούμενα η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο λαμβάνει χώρα στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος επομένως θέλαμε τα συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά να είναι ικανά να προσαρτηθούν στην επιφάνεια του κυττάρου ούτως ώστε να ενισχύσουν την προσκόλληση του στο πετρέλαιο και έπειτα να εκκριθούν στο μέσο για να ενισχύσουν την «ψευδοδιαλυτοποίηση» του πετρελαίου. Τέλος τα θρεπτικά αυτά υλικά θα ήταν προτιμότερο να προέρχονταν από άλλες διαδικασίες επεξεργασίας προϊόντων, δηλαδή με λίγα λόγια να αποτελούν απόβλητα άλλων διεργασιών ώστε να η εφαρμογή τους να είναι φθηνή και να αποτελεί ένα είδος εξοικονόμησης ενέργειας μέσω της επαναχρησιμοποίησης τους. Έτσι λοιπόν τα προς επιλογή θρεπτικά υλικά πρέπει α) να είναι λιπόφιλα, β) να έχουν ιδιότητες επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης, γ) να προέρχονται από διεργασίες επεξεργασίας προϊόντων και δ) να είναι απαραίτητως φιλικά προς το περιβάλλον, δηλαδή βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά.

Τα παραπάνω κριτήρια πληρούνται από τα εξής θρεπτικά υλικά:

- Πηγή αζώτου: Ουρικό οξύ επειδή είναι μια μη υδατοδιαλυτή πηγή αζώτου που εύκολα προσαρτίζεται στην πετρελαϊκή φάση και συνήθως προέρχεται από φθηνές φυσικές ύλες όπως είναι τα περιττώματα ζώων.
- Πηγή φωσφόρου: Λεκιθίνη επειδή προέρχεται από την επεξεργασία της σόγιας κ.α. ως φθηνή φυσική ύλη και επειδή δρα και ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης
- Πηγή οργανικού άνθρακα: Rhamnolipids επειδή δρα ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης και ήταν τα μόνα εμπορικά διαθέσιμα. Μελασσα επειδή αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας ζάχαρης πράγμα που την καθιστά φθηνή πρώτη ύλη και περιέχει πολύτιμα ιχνοστοιχεία και βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η μελάσσα χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον

πηγή οργανικού άνθρακα στο σύστημα για να βρεθεί κατά πόσον επηρεάζεται η αποικοδόμηση του πετρελαίου από την επιπρόσθετη παρουσία άνθρακα, αν υπάρχει δηλαδή κάποιου είδους ανταγωνιστική δράση.

Οι συνδυασμοί που επιλέχθηκαν βασιζόμενοι σε αυτές τις κύριες πηγές θρεπτικών παρατίθενται στον πίνακα 4.1 του κεφαλαίου 4 όπου και περιγράφονται αναλυτικότερα οι ποσότητες και το είδος εφαρμογής τους.

4 Υλικά και Μέθοδοι- Δοκιμή Αποτελεσματικότητας των Παραγόντων Βιοεξυγίανσης

4.1 Περίληψη της Μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). Το πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης σχεδιάστηκε για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου στο διχλωρομεθάνιο (DCM), με μια επόμενη ανταλλαγή διαλύτη σε εξάνιο. Για να ολοκληρωθούν αποτελεσματικά οι στόχοι του πρωτοκόλλου δοκιμής, είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθεί η συγκέντρωση των διάφορων αναλυτών στο πετρέλαιο σε έναν μη-βιοδιασπάσιμο δείκτη, είτε C2-ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή χοπάνιο. Η μέθοδος δοκιμής στοχεύει τα σχετικά εύκολα να διασπαστούν κανονικά αλκάνια και τα ανθεκτικότερα και τοξικά PAHs. Κανονικοποιεί τις συγκεντρώσεις τους σε C2-ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή C30 17α(H), 21β (H)-χοπάνιο σε μια βάση βάρους πετρελαίου (mg δείκτη/kg πετρελαίου, mg αναλύτη στόχου/kg πετρελαίου). Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί έναν αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (GC/MS) λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Το GC/MS έχει χρησιμοποιηθεί από καιρό για να μελετήσει τη γήρανση και τη τύχη των διαρροών πετρελαίου στο περιβάλλον. Για τις ποσοτικές αναλύσεις, το όργανο λειτουργεί στον selective ion detection (SIM) με ρυθμό ανίχνευσης μεγαλύτερο από 1,5 ανιχνεύσεις ανά δευτερόλεπτο για να μεγιστοποιηθεί το εύρος της γραμμικής ποσοτικοποίησης και η ακρίβεια του οργάνου. Η μέθοδος προετοιμασίας των δειγμάτων δεν αποκλείει την ανάλυση των

επιλεγμένων δειγμάτων από το GC/MS σε full scanning τρόπο λειτουργίας για να αξιολογηθούν ποιοτικά οι αλλαγές στο πετρέλαιο που δεν ελήφθησαν από την προσέγγιση SIM. Εκτελείται ταυτόχρονα με τη χημική ανάλυση που περιγράφεται ανωτέρω και μικροβιολογική ανάλυση. Η μικροβιολογική ανάλυση εκτελείται για να καθοριστεί και να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών πληθυσμών. Κάτω από αυτήν την διαδικασία, οι μικροβιακές απαριθμήσεις των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων εκτελούνται σε κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιώντας έναν microtiter Most Probable Number (MPN) προσδιορισμό [121].

4.2 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Τα ακόλουθα υλικά και εξοπλισμός απαιτούνται για το πρωτόκολλο: Κατάλληλες φιάλες και άλλα γυαλικά, όπως αποστειρωμένοι σωλήνες, κλιμακωτοί κύλινδροι (100-mL), αποιονισμένο νερό, p-iodonitrotetrazolium violet dye, χαρτί ζύγισης, 250-mL βοριοπυριτικές κωνικές Erlenmeyer φιάλες με βιδωτό καπάκι, πιπέτες Pasteur, microtiter MPN plates (96-well), πολυκάναλη πιπέτα, σωλήνες αραίωσης και καπάκια, αποστειρωτικός κλίβανος, επωαστικός θάλαμος, ζυγαριά ακρίβειας 0,1 mg, GC/MS όργανο εξοπλισμένο με μια DB-5 τριχοειδή στήλη (30 m, 0.25-mm I.D., and 0.25-μm film thickness) και μια split/splitless θύρα έγχυσης που λειτουργεί στο splitless τρόπο [121].

4.3 Αντιδραστήρια και Θρεπτικά Καλλιέργειας

4.3.1 Προετοιμασία Θαλασσινού Νερού

Όλα τα προϊόντα εξετάζονται σε καθαρό φυσικό θαλασσινό νερό. Καθαρό φυσικό θαλασσινό νερό σημαίνει ότι η πηγή αυτού του νερού της θάλασσας δεν πρέπει να έχει μολυνθεί βαριά με βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Παραδείγματος χάριν, το νερό της θάλασσας δεν πρέπει να ληφθεί από μια πηγή πλησίον καραβιών ή καναλιών

απόρριψης βιομηχανικών ή δημοτικών αποβλήτων, ή να έχει υψηλή θολότητα. Έτσι το θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από την περιοχή των Αγίων Αποστόλων (Χανιά). Το θαλασσινό νερό πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε επτά ημέρες από τη συλλογή του. Δεν προστίθεται κανένας μικροβιακό πληθυσμός.

4.3.2 Προετοιμασία Πετρελαίου

Ένα μέτριου βάρους αργό πετρέλαιο, (Αραβικό ελαφρύ αργό πετρέλαιο), γηραίνεται τεχνητά με θέρμανση στους 272 °C (521 F) για να αφαιρεθεί το ελαφρύ κλάσμα των υδρογονανθράκων πριν από το ξεκίνημα του πειράματος. Η μέθοδος περιγράφεται στα διεθνή πρότυπα σχεδίων ISO/DIS 8708 "αργό πετρέλαιο - προσδιορισμός των χαρακτηριστικών απόσταξης χρησιμοποιώντας 15 θεωρητικές πλάκες" από το διεθνή οργανισμό τυποποίησης. Το αργό πετρέλαιο θερμαίνεται στους 190 °C (374 F) υπό ατμοσφαιρική πίεση. Το σύστημα ψύχεται έπειτα και τοποθετείται υπό κενό (ή υπό ατμοσφαιρική πίεση των 20 mm Hg) για τελική απόσταξη σε ένα ατμοσφαιρικό ισοδύναμο σημείο βρασμού 272 °C (521 F) [118].

4.3.3 Προετοιμασία του Διαλύματος Ανόργανων Θρεπτικών

Εάν ένα εμπορικό προϊόν είναι αυστηρά μικροβιακός παράγοντας και δεν περιέχει τις δικές του θρεπτικές ουσίες, τότε ένα διάλυμα θρεπτικών θα προστεθεί εάν απαιτείται από τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή των προϊόντων. Εάν ένα εμπορικό προϊόν περιέχει τις δικές του θρεπτικές ουσίες, τότε καμία περαιτέρω θρεπτική ουσία δεν πρέπει να προστεθεί. Το θρεπτικό διάλυμα είναι ένα τροποποιημένο διάλυμα αλάτων.

4.4 Προκαταρτική Προετοιμασία

4.4.1 Δομή του Πειράματος

Η διαδικασία αποτελείται από μια πειραματική διάταξη φιαλών σε αναδευτήρα και από ένα συγκεκριμένο σύνολο μικροβιολογικών και χημικών αναλύσεων που εκτελούνται στα μεμονωμένα δείγματα των προϊόντων που δοκιμάζονται. Οι ακόλουθες φιάλες για κάθε δοκιμή προετοιμάζονται και τοποθετούνται σε ένα αναδευτήρα την ημέρα 0 για να απεικονίσουν το ακόλουθο πειραματικό σχέδιο:

Πίνακας 4. 1: Πειραματικός σχεδιασμός

Δοκιμή	Ετικέτα Δοκιμής		Αριθμός δειγμάτων σε κάθε συμβάν δειγματοληψίας				Συνολικός αριθμός αναλυτικών προσδιορισμών	
	Day 0		Day 7		Day 18		Μικροβια κές απαριθμή σεις	GC/MS
Έλεγχος (μάρτυρας)	CC0#1 ÷ 3	3	CC7#1 ÷ 2	2	CC18#1 ÷ 3	3	9 × 3	8
S-200	S2000#1 ÷ 2	2	S2007#1 ÷ 2	2	S20018#1 ÷ 3	3	9 × 3	7
Ουρικό Οξύ- λεκιθίνη	UL0#1 ÷ 2	2	UL7#1 ÷ 2	2	UL18#1 ÷ 3	3	9 × 3	7
Ουρικό Οξύ- λεκιθίνη - rhamnolipid	ULR0#1 ÷ 2	2	ULR7#1 ÷ 2	2	ULR18#1 ÷ 3	3	9 × 3	7
Ουρικό Οξύ- λεκιθίνη - rhamnolipid- μελάσσα	ULRM0#1 ÷ 2	2	ULRM7#1 ÷ 2	2	ULRM18#1 ÷ 3	3	9 × 3	7

Έλεγχος= πετρέλαιο+θαλασσινό νερό

Τα υλικά αγοράστηκαν από:

Ουρικό οξύ Fluka

Λεκιθίνη ή L-α-Phosphatidylcholine

(Type II-S from soybean with 22% purity) Sigma-Aldrich

Rhamnolipid biosurfactant Jeneil Biosurfactant Company

Μελάσσα Ελληνική βιομηχανία ζάχαρης

S-200 ήταν μια προσφορά της International Environmental Products (IEP), LLC

Η βέλτιστη εφαρμογή θρεπτικών σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι:

- 2 g N/100 g πετρελαίου 0.01 g N/0.5 g πετρελαίου 0.01 g N/100 mL διαλύματος
- 0.2 g P/ 100 g πετρελαίου 0.001 g P/0.5 g πετρελαίου 0.001 g P/100 mL διαλύματος

Έτσι λοιπόν η εφαρμοζόμενη ποσότητα θρεπτικών ήταν:

Ουρικό οξύ (33% N, MB=168,11) τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 0.01 g N/100 mL

$$\left| \begin{array}{l} 168.11 \text{ g ουρικού οξέως} \rightarrow 56 \text{ g N} \\ x \rightarrow 0.01 \text{ g N} \end{array} \right\rangle \Rightarrow x = 0.03 \text{ g ουρικού οξέως}$$

Λεκιθίνη (9.5% P, 22% καθαρότητα, MB=325) τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 0.001 g P/100 mL

$$\left| \begin{array}{l} 325 \text{ g λεκιθίνης} \rightarrow 31 \text{ g P} \\ y_1 \rightarrow 0.01 \text{ g P} \end{array} \right\rangle \Rightarrow y_1 = 0.01048 \text{ g λεκιθίνης}$$

όμως το μίγμα έχει 22% καθαρότητα επομένως:

$$\left| \begin{array}{l} 100 \text{ g μίγματος} \rightarrow 22 \text{ g λεκιθίνης} \\ y_2 \rightarrow 0.01048 \text{ g λεκιθίνης} \end{array} \right\rangle \Rightarrow y_2 = 0.0476 \text{ g λεκιθίνης}$$

Μια ενδεικτική εφαρμοζόμενη ποσότητα Rhamnolipid biosurfactant με βάση την βιβλιογραφία είναι 0.1% σε υδατικό διάλυμα δηλαδή, 1000 ppm.

Επειδή όμως το εμπορικό διάλυμα είναι 100.000 ppm. Η ποσότητα διαλύματος που πρέπει να προστεθεί θα είναι:

$$\left| 100000 \text{ ppm αρχικού διαλύματος} \times V = 1000 \text{ ppm τελικού διαλύματος} \times 100 \text{ mL διαλύματος} \right\rangle \\ \Rightarrow V = 1 \text{ mL}$$

Επίσης μια ενδεικτική εφαρμοζόμενη ποσότητα μελάσσας με βάση και πάλι την βιβλιογραφία είναι 1 mL μελάσσας σε 100 mg πετρελαίου (0.01% w/v), οπότε για 500 mg πετρελαίου θα πρέπει να προστεθούν 5 mL μελάσσας.

Ο S-200 είναι ένας εμπορικός παράγοντας βιοεξυγίανσης (bioremediation agent) που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της πετρελαιοκηλίδας του Prestige ανοιχτά των ισπανικών ακτών. Σύμφωνα λοιπόν με τον κατασκευαστή η ποσότητα εφαρμογής του

πρέπει να τηρεί την αναλογία $\frac{\text{S-200}}{\text{πετρέλαιο}} = \frac{1}{10}$

Για κάθε δοκιμή, ένα φύλλο που απαριθμεί τον αριθμό φιαλών, τους τύπους των ελέγχων (μαρτύρων), τον αριθμό επαναλήψεων, το προϊόν που εξετάζεται, και άλλες πληροφορίες προετοιμάζεται. Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να υιοθετηθούν για την πειραματική οργάνωση:

- 1 Οι βοριοπυριτικές Erlenmeyer κωνικές φιάλες (250-mL.) καθαρίζονται λεπτομερώς και αποστειρώνονται για 15 λεπτά στους 120 °C και σε 15 psi.
- 2 Οι φιάλες ονομάζονται με τον κατάλληλο κωδικό: προϊόν ή έλεγχος (μάρτυρας), ημέρα δειγματοληψίας και χαρακτηριστικό αριθμό που δείχνει την επανάληψη.
- 3 100 mL θαλασσινού νερού προστίθεται σε κάθε φιάλη.
- 4 Οι πιπέτες Pasteur πρέπει επίσης να αποστειρωθούν.
- 5 Το πετρέλαιο τοποθετείται σε φιαλίδιο και αποστειρώνεται.
- 6 Το κατάλληλο ποσό πετρελαίου (0.5 g) προστίθεται σταγόνα σταγόνα (σύνολο 37 σταγόνες) με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur. Η προσθήκη του πετρελαίου γίνεται με προσοχή για να μη χυθεί στα τοιχώματα της φιάλης. Προφυλάξεις λαμβάνονται κατά το χειρισμό και το γέμισμα των φιαλών για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μόλυνσης από εξωγενή μικρόβια. Γι αυτό λοιπόν χρησιμοποιείται νέα πιπέτα για κάθε σειρά φιαλών.
- 7 Το προϊόν προετοιμάζεται και προστίθεται στην κατάλληλη φιαλή σύμφωνα με τις οδηγίες του παραγωγού.
- 8 Οι φιάλες μεταφέρονται κατακόρυφα και τοποθετούνται προσεκτικά στους υποδοχείς της δονούμενης τράπεζας για να ελαχιστοποιηθεί το ποσό πετρελαίου που θα μείνει

στα τοιχώματα της φιάλης. Οι φιάλες στις οποίες ένα σημαντικό ποσό πετρελαίου έχει διαβρέξει τα τοιχώματα τους ξαναγίνονται.

- 9 Οι φιάλες που έχουν προετοιμαστεί αναδεύονται στα 200 rpm στους 20 °C μέχρι να απομακρυνθούν για δειγματοληψία [121].

4.4.2 Δειγματοληψία

Στον έλεγχο (μάρτυρα) και στις διάφορες δοκιμές - επεξεργασίες (φιάλες θρεπτικών ουσιών και προϊόντων) γίνεται δειγματοληψία τρεις φορές κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 18-ημέρων: ημέρα 0, ημέρα 7 και ημέρα 18. Ολόκληρη η φιάλη θυσιάζεται για την ανάλυση. Μόνο ένα μικρό μέρος 1mL αφαιρείται από κάθε φιάλη για τη μικροβιολογική ανάλυση και το υπόλοιπο κάθε φιάλης χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση. Οι συγκεκριμένες διαδικασίες και για τη μικροβιολογική και χημική ανάλυση περιγράφονται κατωτέρω. Κατά την διάρκεια κάθε γεγονότος δειγματοληψίας, καταγράφονται οι φυσικές παρατηρήσεις κάθε φιάλης.

4.5 Μικροβιολογική Ανάλυση

Για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών καλλιεργειών, εκτελούνται μικροβιακές απαριθμήσεις των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων σε κάθε γεγονός δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας έναν microtiter MPN προσδιορισμό. Αυτός χρησιμοποιείται ως δείκτης της σχετικής αλλαγής στη βιομάζα. Αυτή η δοκιμή στηρίζεται στη χρήση της απόκρισης ανάπτυξης ως ένδειξη ενισχυμένης δραστηριότητας σε σύγκριση με έναν έλεγχο (μάρτυρα) "καμίας προσθήκης".

4.5.1 Προετοιμασία Θρεπτικού Μέσου

Τα θρεπτικά για τις μικροβιακές απαριθμήσεις προετοιμάζονται προσεκτικά σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αποστειρώνονται ακολουθώντας συγκεκριμένες μεθόδους.

Προετοιμασία Bushnell-Haas (B-H) Θρεπτικού.

- 1 Ζυγίζονται τα ακόλουθα συστατικά που πρόκειται να διαλυθούν σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού.
Φωσφορικό Κάλιο, μονοβασικό KH_2PO_4 -- 1 g
Φωσφορικό Κάλιο, διβασικό K_2HPO_4 -- 1 g
Νιτρικό Αμμώνια NH_4NO_3 -- 1 g
Θειικό Μαγνήσιο, Επταένυδρο $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -- 0.2 g
Χλωριούχο Ασβέστιο CaCl_2 -- 0.02 g
Τριχλωριούχος Σίδηρος FeCl_3 -- 0.05 g
Χλωριούχο Νάτριο NaCl -- 35 g
- 2 Φτιάχνονται διαλύματα των 100 mL ξεχωριστά για το κάθε συστατικό εκτός από το χλωριούχο νάτριο (400 mL) τα οποία και αποστειρώνονται.
- 3 Έπειτα κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες αναμειγνύονται για να παράξουν το τελικό Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικό.
- 4 Ρυθμίζεται το pH στο 7 με αποστειρωμένο διάλυμα NaOH 0.1M.

4.5.2 Μικροβιακή Απαρίθμηση

Πρότυπες τεχνικές για την εκτέλεση των πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) μικροβιακών απαριθμήσεων περιγράφονται κατωτέρω.

4.5.2.1 Αραιώσεις

Πριν από τη θυσία της κάθε φιάλης, αφαιρείται 1 mL ύδατος από κάθε φιάλη και προστίθεται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα αραιώσης που περιέχει 9 mL αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού (αραίωση 1:10) όπως περιγράφεται από

τους Wrenn and Venosa [119]. Χρησιμοποιώντας τεχνική αποστείρωσης, αναμειγνύονται και εκτελούνται τμηματικές αραιώσεις (1 mL της προηγούμενης αραιώσεως σε 9 mL αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού) μέχρι την 10^{-9} αραιώση.

4.5.2.2 Εμβολιασμός των 96 microtiter well MPN plates (μικροβιακοί αποδομητές πετρελαίου)

1. Χρησιμοποιώντας τεχνική αποστείρωσης, 180 μ L of B-H broth προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
2. 5 μ L πετρελαίου προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
3. 20 μ L δείγματος από κάθε διάλυση προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι στη σωστή σειρά ξεκινώντας από το πιο πυκνό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές για κάθε διάλυση. Οι δυο τελευταίες στήλες είναι έλεγχοι (μάρτυρες) (δεν προστίθεται καθόλου δείγμα).
4. Τα πλακίδια επωάζονται στους 20 °C.
5. Μετά από 14 μέρες επώασης, προστίθενται 20 μ L p-iodotetrazolium violet dye (75 mg/10mL απιονισμένου νερού) αφού πρώτα αποστειρωθεί σε κάθε πηγαδάκι για να προσδιοριστεί η μικροβιακή ανάπτυξη.
6. Μετά από μία μέρα επώασης προσδιορίζεται η αλλαγή χρώματος στα πηγαδάκια. Η εμφάνιση κόκκινου ή ροζ χρώματος πιστοποιεί θετική ένδειξη.
7. Καταγράφεται ο αριθμός των θετικών πηγαδιών και σε τη διάλυση αυτά αντιστοιχούν.
8. Εισάγονται τα δεδομένα σε πρόγραμμα.

4.5.2.3 Ανάλυση των Δεδομένων σε Φύλλο Excel με τη Βοήθεια του Solver

Πολλοί μικροβιολόγοι βασίζονται στη μέθοδο των πινάκων του «πιο πιθανού αριθμού-most probable number», για να εκτιμήσουν τους πληθυσμούς από μια σειρά αραιώσεων. Αυτή η εξάρτηση δημιουργεί περιττή ακαμψία στον πειραματικό σχεδιασμό, δηλαδή εμπλέκει μια σειρά συμμετρικών αραιώσεων με μία σταθερά, το παράγοντα αραιώσεως σε μορφή πίνακα. Επιπλέον αυτοί οι πίνακες δεν παρέχουν τις συσχετιζόμενες τιμές πιθανοτήτων για ένα συγκεκριμένο εργαστηριακό αποτέλεσμα. Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση διάφορων συνήθων προγραμμάτων σε υπολογιστές που μπορεί να

απαιτηθεί και κάποιος στοιχειώδης προγραμματισμός για να μπορούν να εφαρμοστούν τα προγράμματα αυτά στις απαιτήσεις των συγκεκριμένων συνθηκών.

Στη συνέχεια γίνεται παρουσίαση μιας απλής μεθόδου για τον προσδιορισμό του πιο πιθανού αριθμού (MPN) με την χρήση λογιστικών φύλλων επεξεργασίας (Excel). Η μέθοδος αυτή είναι απλή και δεν απαιτεί γνώσεις προγραμματισμού, αρκεί η γνώση του λογιστικού φύλλου επεξεργασίας και της εργαλειοθήκης του.

Λογισμικό και Απαιτήσεις Επεξεργαστή

Οι σχέσεις που παράγονται από την μέθοδο εκτίμησης (MPN) βασίζονται σε αυτές όπως αναφέρεται στους Halvorson και Ziegler, 1933. Η επίλυση των σχέσεων γίνεται με τον επίλυτή (Solver) του λογιστικού φύλλου και η παραγωγή του (MPN) μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικά και σε συμβατικό υπολογιστή.

Διάταξη του φύλλου εργασίας

Χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι συμβολισμοί για την δημιουργία του φύλλου εργασίας:

a: όγκος διάλυσης που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό αν θεωρηθεί μοναδική η πηγή εμβολιασμού για όλα τα επίπεδα αραιώσης.

p: αριθμός των σωλήνων όπου δείχνουν θετική αύξηση.

q: αριθμός των σωλήνων όπου δείχνουν αρνητική αύξηση.

n: αριθμός των επαναλαμβανόμενων σωλήνων που χρησιμοποιούνται σε κάθε επίπεδο αραιώσης.

x: ο πιο πιθανός αριθμός (MPN).

Ο πίνακας 4.2, παρουσιάζει το προτεινόμενο φύλλο εργασίας. Η ετικέτα του δείγματος και οι επιτευχθείσες αραιώσεις εισάγονται στην πρώτη και δεύτερη στήλη του πίνακα αντίστοιχα.

Πίνακας 4. 2: Προτεινόμενο φύλλο εργασίας

No	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Δείγμα	Αραιώση	Αριθμός Θετικών	Αριθμός Αρνητικών	Αριθμός Σωλήνων	Όγκος Εμβολίου	x	L	R	p	Εκτίμηση Πληθυσμού
2	Π.χ	0.00001	4	1	5	1	3.25	5.55	5.55	0.25	3.26E -06
3		1E - 06	3	2	5	0.1					
4		1E - 07	1	4	5	0.01					
5											

Όταν συγκρίνονται αποτελέσματα από πρότυπες τιμές πίνακα MPN, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.3, οι σχέσεις χρησιμοποιούν τρεις “κρίσιμες” αραιώσεις. Ωστόσο το εύρος των σχετικών διαλύσεων μπορεί να διευρυνθεί διότι και οι σχέσεις είναι επεκτάσιμες.

Πίνακας 4. 3: Σύγκριση αποτελεσμάτων λογιστικού φύλλου επεξεργασίας με τιμές MPN που χρησιμοποιήθηκαν για δεκαδικές διαλύσεις σε πέντε σωλήνες ανά αραιώση (όπως αναφέρεται στους Cochran,1950; Alexander,1982)

Αποτελέσματα από τρεις κρίσιμες αραιώσεις	Λογιστικό φύλλο εργασίας	Cochran, 1950
5-2-1	0.70	0.70
4-3-2	0.39	0.39
4-4-0	0.34	0.34
2-2-0	0.09	0.09
5-1-0	0.33	0.33

Συγκρίσεις εκτιμήσεων MPN από άλλες πηγές που χρησιμοποίησαν έξι επίπεδα διάλυσης φαίνονται στον πίνακα 4.4. Για χάρη απλότητας, οι σχέσεις για τις επιτευχθείσες τιμές MPN είναι για τρία επίπεδα διάλυσης μόνο. Η επέκταση ακολουθεί και μια λογική εξάπλωση των τριών πρώτων στοιχείων στις σειρές.

Πίνακας 4. 4: Σύγκριση αποτελεσμάτων λογιστικού φύλλου επεξεργασίας με δημοσιευμένες τιμές MPN από άλλες πηγές που χρησιμοποιούν έξι επίπεδα αραιώσης

Λόγος διάλυσης	n	Δεδομένα	Λογιστικό φύλλο	Woomer et al., 1990	Τιμές MPN από άλλες πηγές
4	2	2-1-1-0-0-0	42.6	42.6	36 (Vincent, 1970)
4	4	4-4-4-3-1-0	319.7	318.9	290 (Vincent, 1970)
5	4	4-4-0-2-0-0	70.7	70.7	71 (Brockwell, 1963)
10	5	5-3-1-0-0-0	106.9	106.9	110 (Alexander, 1982)
10	3	3-2-2-0-0-0	210.2	210.2	210 (De Man, 1975)
10	5	5-4-2-0-0-0	215.6	215.6	210 (De Man, 1975)

10	10	10-9-5-0-0-0	331.6	331.6	350 (De Man, 1975)
----	----	--------------	-------	-------	-----------------------

Ο πραγματικός όγκος που εμβολιάστηκε (1mL για το παράδειγμα), μπαίνει στο κελί που αντιπροσωπεύει την πρώτη κρίσιμη διάλυση (κελί F2). Οι διαδεχόμενοι όγκοι λαμβάνονται από την σχέση:

$$V_{\text{εμβολιασμού}_{(\text{Επακόλουθος})}} = \left(\frac{\text{Όγκος Εμβολιασμού}}{\text{Πηγή Διάλυσης}} \right) \times V_{\text{εμβολιασμού}_{(\text{Πραγματικός})}} \quad (1)$$

Ο συμβολισμός στο λογισμικό φύλλο εργασίας θα είναι ο εξής:

$$\begin{aligned} \text{κελί : } F3 &= (B3 / B2) * F2 \\ \text{κελί : } F4 &= (B4 / B2) * F2 \end{aligned} \quad (2)$$

Θεωρώντας σταθερό όγκο εμβολιασμού. Αν ο όγκος διαφέρει μεταξύ των σετ των σωλήνων, τότε πρέπει να εισαχθεί αυτός αντί του F2.

Η τιμή MPN (x) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\frac{a_1 P_1}{1 - e^{-a_1 x}} + \frac{a_2 P_2}{1 - e^{-a_2 x}} + \frac{a_3 P_3}{1 - e^{-a_3 x}} = a_1 n_1 + a_2 n_2 + a_3 n_3 \quad (3)$$

Το αριστερό μέρος της εξίσωσης εισάγεται στη στήλη L όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.2 με την ακόλουθη μορφή:

$$\begin{aligned} \text{κελί : } H2 &= ((F2 * C2) / (1 - EXP(-F2 * G2))) + \\ &((F3 * C3) / (1 - EXP(-F3 * G2))) + \\ &((F4 * C4) / (1 - EXP(-F4 * G2))) \end{aligned} \quad (4)$$

ενώ το δεξιό μέρος της εξίσωσης, εισάγεται στη στήλη R όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.2 με την ακόλουθη μορφή:

$$\text{κελί : } I2 = F2 * E2 + F3 * E3 + F4 * E4 \quad (5)$$

Η επίλυση για την τιμή MPN (x), επιτυγχάνεται από τον επιλυτή του λογιστικού φύλλου (Solver) που υπάρχει στο μενού-εργαλεία (menu- tools). Η λύση επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό κελιού στόχου (target cell) H2 ίσο με το αντίστοιχο κελί κάτω από την στήλη R (Η τιμή 5.55 στον πίνακα 4.2). Το τελικό βήμα είναι ο ορισμός του κελιού επίλυσης για την επίτευξη της ισότητας μεταξύ των κελιών H2 και I2, που είναι το αντίστοιχο κελί κάτω από την στήλη G, το οποίο είναι η εκτίμηση της τιμής MPN (x) όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.2. Η τιμή της πιθανότητας που συνδέεται με τους συνδυασμούς των τιμών p και q, για δεδομένη τιμή MPN (x), εισάγεται κάτω από την στήλη P. Αυτό παρέχει μια εκτίμηση της συχνότητας ενός συγκεκριμένου συνδυασμού για δεδομένο πιθανό αριθμό x, και εξάγεται από την εξίσωση:

$$P = \left(\frac{n_1!}{p_1!q_1!} \right) \left(\frac{n_2!}{p_2!q_2!} \right) \left(\frac{n_3!}{p_3!q_3!} \right) \times (e^{-a_1x})^{q_1} (e^{-a_2x})^{q_2} (e^{-a_3x})^{q_3} \times (1 - e^{-a_1x})^{p_1} (1 - e^{-a_2x})^{p_2} (1 - e^{-a_3x})^{p_3} \quad (6)$$

όπου εισάγεται στο φύλλο εργασίας με την ακόλουθη μορφή:

$$\begin{aligned} \text{κελί : J2} = & (((FACT(E2))/(FACT(C2)*FACT(D2))))* \\ & (((FACT(E3))/(FACT(C3)*FACT(D3))))* \\ & (((FACT(E4))/(FACT(C4)*FACT(D4))))* \\ & ((EXP(-F2*G2))^{D2})* \\ & ((EXP(-F3*G3))^{D3})* \\ & ((EXP(-F4*G4))^{D4})* \\ & ((1-EXP(-F2*G2))^{C2})* \\ & ((1-EXP(-F3*G2))^{C3})* \\ & ((1-EXP(-F4*G2))^{C4})) * 100 \end{aligned} \quad (7)$$

Η εκτίμηση του πληθυσμού (pop. est.) επιλύεται με πολλαπλασιασμό της υπολογισθείσας τιμής MPN (x) με τον αντίστροφο της μοναδικής πηγής διάλυσης που χρησιμοποιήθηκε σαν βάση των τιμών για τους όγκους που εμβολιάστηκαν. Στο πιο πάνω παράδειγμα, αυτή είναι η πρώτη κρίσιμη τιμή διάλυσης (10^{-5}). Στο λογιστικό φύλλο εισήχθη ως:

$$K2 = G2(1/B2) \quad (8)$$

Περιορισμοί

Ο επιλυτής (solver) χρειάζεται υποθετικές αρχικές τιμές όταν θα λύσει για την τιμή x . Μια άλλη διαδικασία υπολογισμού θα μπορούσε να ήταν η επαναληπτική επίλυση αφού ο υπολογισμός των L και R γίνεται από τους όρους a , n , p και x . Γενικά ο υπολογισμός του x συνίσταται να υπολογίζεται αρχικά με την μέθοδο δοκιμής και σφάλματος (Trial and error) όπου λαμβάνει υπόψη την αρχική τιμή στην στήλη x μέχρι το L να πάρει μια τιμή μεγαλύτερη ή ίση με του R . Η εκτίμηση του x μπορεί να επαναλυθεί με τον επιλυτή (solver) του λογιστικού φύλλου εργασίας. Είναι σημαντικό να εισαχθεί μια σωστή αρχική τιμή διότι εάν η αρχική εκτίμηση του x είναι αρκετά αποκλίνουσα τότε ο επιλυτής (solver) του λογιστικού φύλλου μπορεί να συναντήσει προβλήματα σύγκλησης. Μολονότι κάποια μη γραμμικά προβλήματα μπορεί να παρουσιάσουν τοπικά βέλτιστα σημεία, η εμπειρία διάφορων ερευνητών, έδειξε ότι μια αρχική τιμή θετικής μονάδας (+1) είναι αρκετά κοντά στο βέλτιστο του επιλυτή (solver) για να αντιμετωπιστούν τα διάφορα προβλήματα. Η διαδικασία επίλυσης διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα μόνο δεδομένου ότι η αρχική τιμή είναι αποδεκτή. Επιπλέον η ακρίβεια των υπολογισμών μπορεί να φτάσει μέχρι και στο ένατο δεκαδικό ψηφίο.

Η εμφάνιση του μηνύματος λάθους “#NUM” μπορεί να προκύψει κατά τον υπολογισμό του P . Αυτό σημαίνει ότι το λογιστικό φύλλο εργασίας συνάντησε ένα αριθμό πέραν του εύρους τιμών $\pm 1 \times 10^{307}$. Αυτό μπορεί να συμβεί μόνο όταν:

1. Οι τιμές του x είναι πολύ μεγάλες,
2. το $p = n$ και
3. $q = 0$.

Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με ακύρωση μέρους του P στην εξίσωση θέτοντας μηδενικούς τους εκθέτες, δηλαδή:

$$\begin{aligned} (e^{-a_z x})^0 &= 1 \\ (1 - e^{-a_z x})^0 &= 1 \end{aligned} \quad (9)$$

Υπολογισμός του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης

Τα όρια εμπιστοσύνης που συνδέονται με την εκτίμηση συγκεκριμένου πληθυσμού μπορούν να υπολογιστούν μέσω του παράγοντα εμπιστοσύνης (CF), που είναι ένας

αριθμός από τον οποίο μια εκτίμηση πληθυσμού μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να διαιρεθεί για να επιτευχθούν τα άνω και κάτω όρια αντίστοιχα όπως αναφέρεται από τον Cochran, 1950. Η πληροφορία που χρειάζεται για τον υπολογισμό του (CF) είναι ο λόγος διάλυσης dr και ο αριθμός των επαναλήψεων ανά επίπεδο διάλυσης (n). Ο λόγος διάλυσης αναφέρεται στον λόγο μεταξύ της κατώτερης και ανώτερης διάλυσης σε μια συγκεκριμένη σειρά. Η εξίσωση για τον υπολογισμό του (CF) στο $P=0.05$ είναι:

$$\begin{aligned} CF &= anti \log_{10}(2 \times 0.55 \times \sqrt{[(\log_{10} dr / n)]}) \quad \alpha \nu \quad dr < 10 \\ CF &= anti \log_{10}(2 \times 0.58 \times \sqrt{[(\log_{10} dr / n)]}) \quad \alpha \nu \quad dr \geq 10 \end{aligned} \quad (10)$$

Στο λογιστικό φύλλο, αυτό μπορεί να εισαχθεί χρησιμοποιώντας την συνάρτηση IF. Επειδή το n κατέχει ήδη την στήλη E όπως φαίνεται στον πίνακα 4.2, ο υπολογισμός του (CF) απαιτεί μόνο μια επιπλέον στήλη για τον λόγο διάλυσης. Οι νέες παράμετροι μπορούν να εισαχθούν σε νέες στήλες όπως φαίνεται πιο κάτω.

L	M
dr	CF
10	3.302

Οι εξισώσεις για τον υπολογισμό του (CF) στο λογιστικό φύλλο εργασίας είναι:

$$\begin{aligned} \text{κελί} : N2 &= IF(L2 < 10, 10^{(2 * 0.55 * SQRT((LOG10(L2)) / E2))), \\ &10^{(2 * 0.58 * SQRT((LOG10(L2)) / E2))}) \end{aligned} \quad (11)$$

Στο παράδειγμα που εξετάζεται, η τιμή 3.302, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιαστεί και να διαιρεθεί η εκτίμηση του πληθυσμού και έτσι να προσδιοριστεί το άνω και κάτω όριο εμπιστοσύνης. Η τιμή του (CF) μειώνεται, δηλαδή το διάστημα εμπιστοσύνης γίνεται πιο στενό, όταν ο αριθμός των επαναλήψεων αυξάνεται ή όταν ο λόγος αραίωσης μειώνεται.

Συμπεράσματα

Με την βοήθεια του λογιστικού φύλλου εργασίας, παρουσιάστηκε μια μεθοδολογία για την εκτίμηση του πιο πιθανού αριθμού MPN. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει μεγαλύτερη

ελευθερία στο σχεδιασμό πειραμάτων με διάφορες απαιτήσεις. Αυτή ευελιξία επιτρέπει τον προσδιορισμό σχημάτων αραίωσης (που δεν απαιτούν ισορροπία), ομάδων επαναληπτικών αριθμών, όγκων εμβολιασμού και παρέχει υπολογισμούς εκτίμησης σφάλματος, συμπεριλαμβανομένου του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης [120].

4.6 Χημική Ανάλυση της Σύστασης του Πετρελαίου

4.6.1 Προετοιμασία Δείγματος

Μετά από 0, 7 και 18 μέρες επώασης στον αναδευτήρα, οι κατάλληλες φιάλες θυσιάζονται και εκχυλούνται με διχλωρομεθάνιο σε αυτές προστίθεται ένα πρότυπο διάλυμα ανάκτησης υποκατάστατου (surrogate recovery standard). Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα πριν την χημική ανάλυση στο GC/MS.

- 1 Μετά από 0, 7, and 18 μέρες ανάδευσης και επώασης στους 20 °C, τα δοχεία αντίδρασης θυσιάζονται. Πριν τη χημική ανάλυση, 1-mL δείγματος της υδατικής φάσης απομακρύνεται για την μικροβιολογική ανάλυση όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- 2 Ένα πρότυπο διάλυμα ανάκτησης υποκατάστατου (surrogate recovery standard) προετοιμάζεται με τον ακόλουθο τρόπο: 2000 ppm από d₁₀-phenanthrene και 2000 ppm από 5α-androstane αναμειγνύονται σε μια ογκομετρική φιάλη των 5 mL και προστίθεται DCM μέχρι την χαραγή για να παραχθεί ένα αποθεματικό διάλυμα 400 ppm.
- 3 500 μL από το surrogate διάλυμα προστίθενται σε κάθε φιάλη. Η τελική συγκέντρωση των surrogates σε κάθε φιάλη είναι περίπου 4 ppm σε διαλύτη στο τελικό εκχύλισμα. Οι αλειφατικές ενώσεις και ο βιοδείκτης θα πρέπει να διορθωθούν για ποσοστιαία ανάκτηση με το 5α-androstane surrogate και οι αρωματικές ενώσεις με το d₁₀-phenanthrene surrogate.
- 4 Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται σε μια διαχωριστική χοάνη των 500 mL.
- 5 Μετράται ένας συνολικός όγκος 50 mL DCM για να χρησιμοποιηθεί στην εκχύλιση. Αυτός χωρίζεται σε μέρη των 20 mL και 2×15 mL έτσι ώστε να ξεπλυθεί καλά η φιάλη και όλο το περιεχόμενο να μεταφερθεί στην διαχωριστική χοάνη.

- 6 Αναμιγνύεται περίπου 50 φορές για περίπου 3-4 λεπτά μη παραλείποντας να εκτονώνεται συνεχώς η χοάνη.
- 7 Έπειτα αφήνετε η διαχωριστική χοάνη να ηρεμήσει και τα δυο μέρη νερού και DCM να διαχωριστούν πλήρως. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει περίπου 5-10 λεπτά.
- 8 Το θειικό νάτριο ενεργοποιείται στους 400 °C για 4 ώρες.
- 9 Το θειικό νάτριο τοποθετείται σε στήλη μέχρι τη χαραγή των 10 cm και ξεπλένεται με DCM.
- 10 Το στρώμα DCM ξηραίνεται περνώντας το από στήλη με άνυδρο Θεικό νάτριο (Na_2SO_4).
- 11 Συναρμολογείται ένας Kuderna-Danish (KD) συμπυκνωτής προσκολλώντας μια Snyder στήλη σε μία σφαιρική φιάλη με βαθμονομημένο σωλήνα συμπύκνωσης. Τα μέρη της Kuderna-Danish διάταξης ευθυγραμμίζονται κάθετα και εμβαπτίζονται σε ένα μπάνιο νερού. Το μπάνιο νερού ρυθμίζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία (65 °C) για να διατηρηθεί σωστά η απόσταξη.
- 12 Συλλέγεται το απόσταγμα στο KD συμπυκνωτή.
- 13 Προζυγίζεται φιαλίδιο χωρίς το καπάκι του.
- 14 Μεταφέρεται το συμπύκνωμα από την Kuderna-Danish διάταξη σε φιαλίδιο και ξηραίνεται με ρεύμα αζώτου.
- 15 Ζυγίζεται το φιαλίδιο με το περιεχόμενο χωρίς το καπάκι και καταγράφεται το βάρος του πετρελαίου που ανακτήθηκε.

4.6.2 GC/MS Ανάλυση.

Συχνά, η ανάλυση των κορεσμένων και των αρωματικών υδρογονανθράκων από την αέρια χρωματογραφία των εκχυλισμάτων DCM οδηγεί σε δημιουργία επιστρώσεων στη στήλη (column fouling) και σε επιδείνωση των χαρακτηριστικών διαχωρισμού. Μια εναλλακτική, απλή "ενός-βήματος" διαδικασία καθαρισμού δειγμάτων με αλούμινα μπορεί να εκτελεσθεί στο πετρέλαιο πριν από την έγχυση του. Αυτός ο καθαρισμός αφαιρεί τα ασφαλτένια και τις πολικές ενώσεις και μπορεί να εφαρμοστεί στα εκχυλίσματα DCM επίσης. Αυτή η διαδικασία περιγράφεται στα βήματα 1-8 κατωτέρω.

4.6.2.1 Εναλλακτική Διαδικασία Καθαρισμού του δείγματος προς GC/MS**Ανάλυση**

- 1 Η αλούμινα (neutral, 80-200 mesh) ενεργοποιείται θερμαίνοντας την για 18 ώρες στους 300 °C. Ζυγίζονται 4.0 g αλούμινας και τοποθετούνται στη στήλη μαζί με ένα στρώμα θεικού νατρίου πάνω από το στρώμα της αλούμινας.
- 2 Η στήλη ξεπλένεται με DCM.
- 3 Ζυγίζονται 50 mg \pm 0.1 mg oil σε μηδενισμένο φιαλίδιο.
- 4 Μετρώνται 10 mL DCM σε βαθμονομημένο κύλινδρο. Χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα από αυτό για να μεταφερθεί το δείγμα στη στήλη και να ξεπλυθεί καλά το φιαλίδιο με το δείγμα. Το δείγμα από τη στήλη συλλέγεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.
- 5 Γνωστός όγκος του δείγματος (3 mL) μεταφέρεται από την ογκομετρική φιάλη σε προζυγισμένο φιαλίδιο.
- 6 Το δείγμα στο φιαλίδιο ξηραίνεται με άζωτο.
- 7 Ζυγίζεται το φιαλίδιο με το ξηραμένο δείγμα και καταγράφεται το βάρος και προσδιορίζεται το βάρος του δείγματος.
- 8 Διαλύεται 1 mL εξανίου στο φιαλίδιο με το ξηραμένο δείγμα. Το δείγμα είναι έτοιμο για τη διαδικασία ανάλυσης στο GC/MS.

4.6.2.2 Διαδικασία Ανάλυσης στο GC/MS

Αμέσως πριν από την έγχυση, ένα εσωτερικό πρότυπο (internal standard) διάλυμα τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων προστίθεται στα εκχυλίσματα των δειγμάτων. Τα δείγματα ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου για τα αλειφατικά και τα αρωματικά κλάσματα των εκχυλισμάτων πετρελαίου προκειμένου να παρασχεθούν ικανοποιητικές πληροφορίες ότι το πετρέλαιο αποδομείται. Για να διασφαλιστεί ότι η παρατηρηθείσα πτώση στους αναλύτες στόχους προκαλείται από βιοαποικοδόμηση παρά από φυσική απώλεια από την κακομεταχείριση ή την ανεπαρκή εκχύλιση, είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθούν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στόχων μέσω εσωτερικών δεικτών "conserved internal marker". Εσωτερικοί δείκτες που έχουν βρεθεί χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση είναι C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-

χρυσένιο και C3017α(H),21β(H)-χοπάνιο. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί το ο σχετικός συντελεστής απόκρισης (relative response factor - RRF) για τους αναλύτες στόχους. Για να υπολογιστούν οι "κανικοποιημένες συγκεντρώσεις," η συγκέντρωση του αναλύτη στόχου σε έναν δεδομένο χρόνο δειγματοληψίας διαιρείται απλά με την επιλεγμένη διατηρημένη συγκέντρωση αναλύτη στην ίδια χρονική. Η GC/MS ανάλυση διεξάγεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία.

- 9 Ένα (1) mL από το διάλυμα εξανίου (απο τη προετοιμασία δείγματος παραπάνω) τοποθετείται σε 1.5-mL φιαλίδιο.
- 10 Σε αυτό το διάλυμα 25 μ L από το διάλυμα 400 ppm των εσωτερικών προτύπων προστίθεται και το δείγμα είναι έτοιμο για ένεση στο GC. Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 10 ppm. Αυτό το διάλυμα περιέχει 4 δευτεριωμένα συστατικά: d₈-naphthalene, d₁₀-anthracene, d₁₂-chrysene και d₁₂-perylene.
- 11 Ένα τυφλό οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν από την ανάλυση των αγνώστων αναλυτών. Τα εσωτερικά πρότυπα συνδυάζονται με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων και εγχύονται μαζί σε κάθε ανάλυση για να ελεγχθεί η απόδοση του οργάνου κατά τη διάρκεια κάθε σειράς αναλύσεων.
- 12 Οι απαραίτητες πληροφορίες (όνομα, ποσότητα, συνθήκες, κ.λ.π.) σε σχέση με το δείγμα που εισάγεται κάθε φορά προς ανάλυση περιγράφονται στο acquisition form του προγράμματος του αέριου χρωματογράφου
- 13 Το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 10 ppm αντί 40 ppm. Έτσι αποκτάται μια καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό όπως φαίνεται στον πίνακα 4.5 πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 1, 5, 10, 25 και 50 ppm. Η βαθμονόμηση των 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο μείγμα συστατικών για να προσδιοριστούν τα RRFs για κάθε αναλύτη. Το πρότυπο μείγμα (εκτός του βιοδείκτη) για την καμπύλη βαθμονόμησης αποκτήθηκε από την Absolute Standards, Inc. Οι βιοδείκτες C3017β(H),21α(H)-hopane και C3017α(H),21β(H)-hopane που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την Chiron.
- 14 Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RF = \frac{A_x \times C_{is}}{C_x \times A_{is}} \quad (12)$$

όπου:

RRF = Σχετικός συντελεστής απόκρισης

A_x = Το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται (αναλύτη)

A_{is} = Το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο

C_x = Συγκέντρωση του συστατικού που μετράται (ng/μL)

C_{is} = Συγκέντρωση του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου (10 ng/μL). (Αυτή η συγκέντρωση είναι σταθερή στην εξίσωση για την καμπύλη βαθμονόμησης.)

- 15 Αναγνωρίζεται κάθε αναλύτης βασιζόμενοι στη integrated abundance από το πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.6.
- 16 Ποσοτικοποιείται ο κάθε αναλύτης χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αυτό που έχει χρόνο έκλυσης κοντά στον δοσμένο αναλύτη (Πίνακας 4.7) [121].

Πίνακας 4. 5: Ταξινόμηση Αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης

Εσωτερικό Πρότυπο	d ₈ -naphthalene	d ₁₀ -anthracene	d ₁₂ -chrysene	d ₁₂ -perylene
Αλκάνια	nC10-nC15	nC16-nC23	nC24-nC29	nC30-nC35
		Pristane		C3017 _β (H),21 _α (H)-hopane
		Phytane		
		5 α -androstane		
Αρωματικές Ενώσεις	Naphthalene	Dibenzothiophene	Fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene
		Fluorene	Pyrene	Benzo(k)fluoranthene
		Anthracene	Chrysene	Benzo(e)pyrene
		Phenanthrene		Benzo(a)pyrene
				Perylene
				Indeno(g,h,i)pyrene
				Dibenzo(a,h)anthracene
				Benzo(1,2,3-cd)perylene

Πίνακας 4. 6: Προτεινόμενα ιόντα για τον κάθε αναλύτη στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS

Συστατικό	Ιόν
n-alkanes (C ₁₀ -C ₃₅)	85
Pristane	85
Phytane	85
Naphthalene	128
C1-naphthalenes	142
C2-naphthalenes	156
C3-naphthalenes	170
C4-naphthalenes	184
Fluorene	166
C1-fluorenes	180
C2-fluorenes	194
C3-fluorenes	208
Dibenzothiophenes	184
C1-dibenzothiophenes	198
C2-dibenzothiophenes	212
C3-dibenzothiophenes	226
Anthracene	178
Phenanthrene	178
C1-phenanthrenes	192
C2-phenanthrenes	206
C3-phenanthrenes	220
Fluoranthene/pyrene	202
C1-pyrenes	216
C2-pyrenes	230
Chrysene	228
C1-chrysenes	242
C2-chrysenes	256
Hopanes (177 family)	177
Hopanes (191 family)	191
Steranes (217 family)	217
Benzo(b)fluoranthene	252
Benzo(k)fluoranthene	252
Benzo(e)pyrene	252
Benzo(a)pyrene	252
Perylene	252
Ideno(g,h,i)pyrene	276
Dibenzo(a,h)anthracene	278
Benzo(1,2,3-cd)perylene	276
d ₈ -naphthalene	136
d ₁₀ -anthracene	188
d ₁₀ -phenanthrene	188
d ₁₂ -chrysene	240
d ₁₂ -perylene	264
α-androstane	260

Πίνακας 4. 7: Αναλύτες και συστατικά αναφοράς

Αναλύτης	Συστατικό αναφοράς	Αναλύτης	Συστατικό αναφοράς
n-C10	n-C10	C2-naphthalene	Naphthalene.
n-C11	n-C11	C3-naphthalene	Naphthalene.
n-C12	n-C12	C4-naphthalene	Naphthalene.
n-C13	n-C13	Fluorene	Fluorene.
n-C14	n-C14	C1-fluorene	Fluorene.
n-C15	n-C15	C2-fluorene	Fluorene.
n-C16	n-C16	C3-fluorene	Fluorene.
n-C17	n-C17	Dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Pristane	Pristane	C1-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C18	n-C18	C2-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Phytane	Phytane	C3-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C19	n-C19	Phenanthrene	Phenanthrene.
n-C20	n-C20	Anthracene	Anthracene.
n-C21	n-C21	C1-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C22	n-C22	C2-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C23	n-C23	C3-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C24	n-C24	Fluoranthene	Fluoranthene.
n-C25	n-C25	Pyrene	Pyrene.
n-C26	n-C26	C1-pyrene	Pyrene.
n-C27	n-C27	C2-pyrene	Pyrene.
n-C28	n-C28	Chrysene	Chrysene.
n-C29	n-C29	C1-chrysene	Chrysene.
n-C30	n-C30	C2-chrysene	Chrysene.
n-C31	n-C31	Benzo(b)fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene.
n-C32	n-C32	Benzo(k)fluoranthene	Benzo(k)fluoranthene.
n-C33	n-C33	Benzo(e)pyrene	Benzo(e)pyrene.
n-C34	n-C34	Benzo(a)pyrene	Benzo(a)pyrene.
n-C35 C ₃₀ 17 _α (H),21 β (H)- hopane	n-C35 C ₃₀ 17 _α (H),21 β (H)- hopane	Perylene ideno(g,h,i)pyrene	Perylene ideno(g,h,i)pyrene

5 _α -androstane	5 _α -androstane	Dibenzo(a,h)anthracene	Dibenzo(a,h)anthracene.
C1-naphthalene	Naphthalene	Benzo(1,2,3-cd)perylene	Benzo(1,2,3-cd)perylene

17 Χρησιμοποιείται η εξίσωση 13 για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των αναλυτών σε ng/mg (ppm) στο πετρέλαιο:

$$\text{Συγκέντρωση (ng/mg)} \quad C_T = \frac{C_x \times 10000 \times 35}{3 \times V_i \times M_o} \quad (13)$$

όπου:

V_i = Όγκος εισαγωγής στο χρωματογράφο του εκχυλίσματος (1 μ L, κυμαινόμενο)

M_o = Συνολική μάζα του πετρελαίου που προστίθεται στη φιάλη, (500 mg, σταθερή)

C_x = Συγκέντρωση του εκάστοτε συστατικού που μετράται στο GC-MS και δίνεται με βάση τους σχετικούς συντελεστές απόκρισης

5 Επεξεργασία-Συζήτηση Αποτελεσμάτων




Ακολουθεί η επεξεργασία και συζήτηση των αποτελεσμάτων για κάθε διάλυμα με διαφορετικό συνδυασμό θρεπτικών ξεχωριστά που εξετάστηκε.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μπόρεσαν να αναλυθούν τα αποτελέσματα για τους επιλεγμένους αρωματικού υδρογονάνθρακες καθότι βρέθηκαν κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Επίσης δεν έγινε κανονικοποίηση των αναλυτών στόχων ως προς το χοπάνιο καθότι και αυτό εβρέθηκε κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης.

5.1 Διάλυμα Ελέγχου (Control)

Στα διαλύματα ελέγχου δεν προστέθηκε κανένα θρεπτικό παρά μόνο πετρέλαιο.

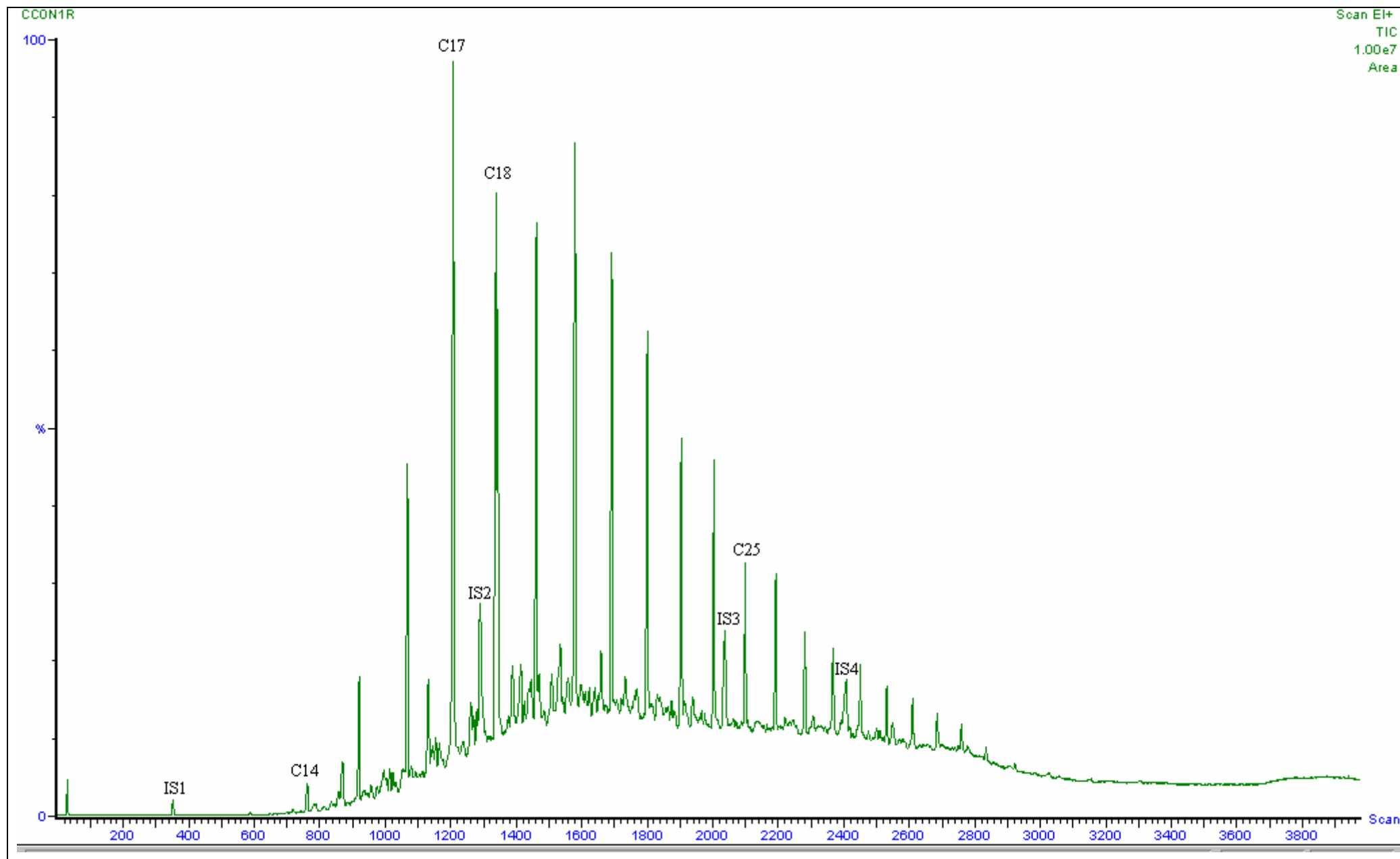
5.1.1 Φυσικές Παρατηρήσεις

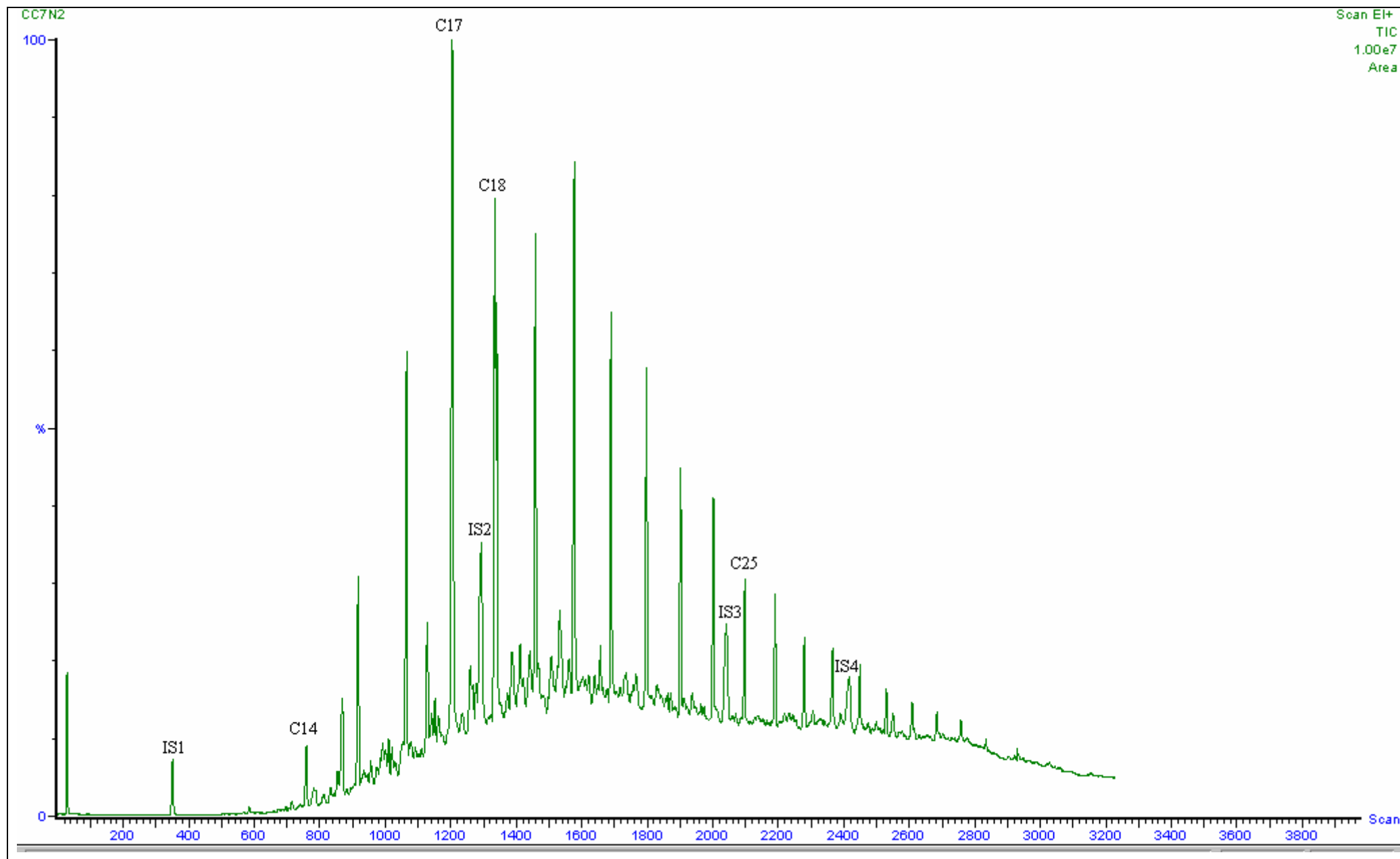
		
CC0	CC7	CC18
Δημιουργία μπαλών πίσσας (tar balls)		

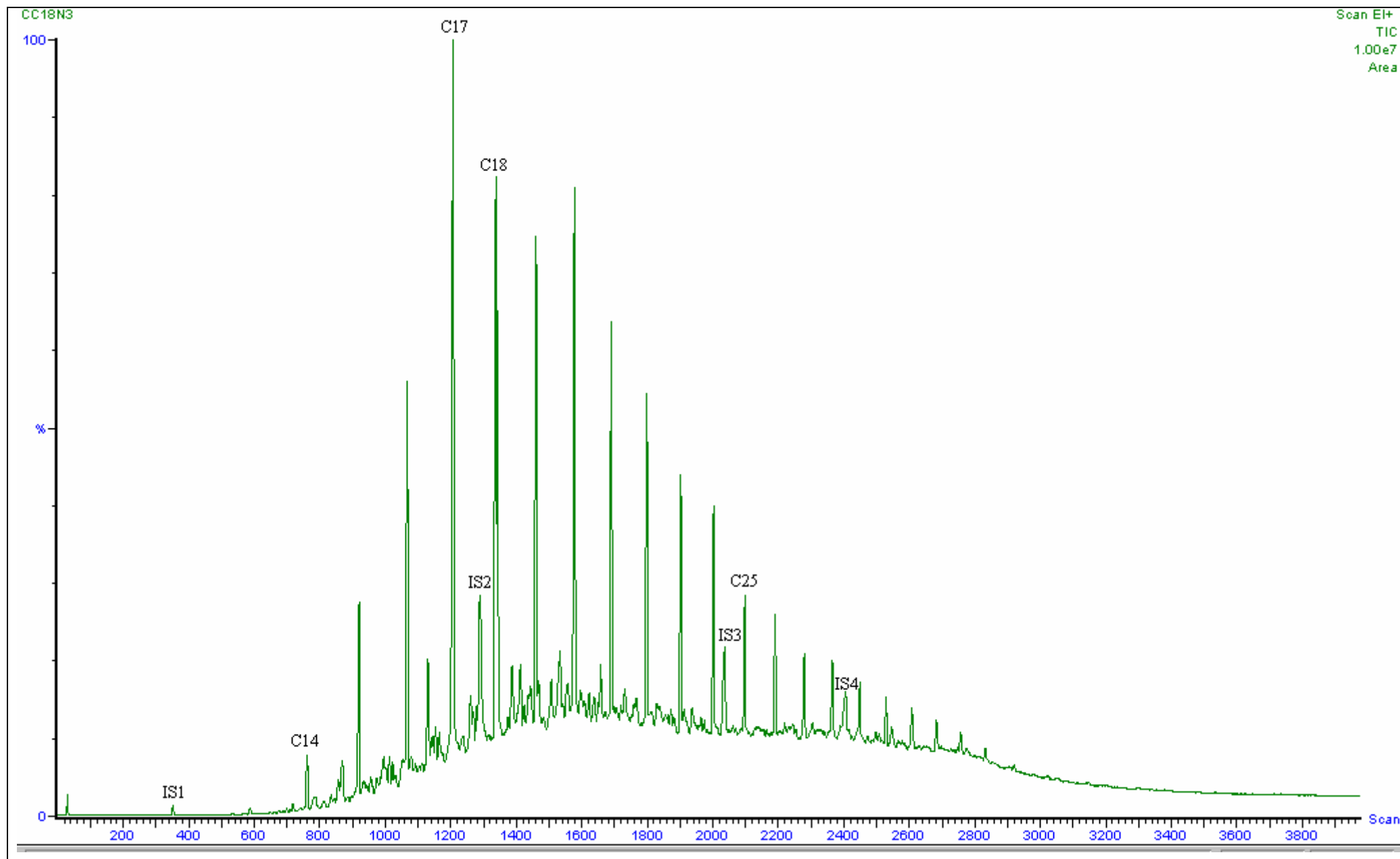
5.1.2 GC-MS Ανάλυση

Ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων

Η τάση των συστατικών στα χρωματογραφήματα δείχνει το βαθμό αποτελεσματικότητας του εκάστοτε προϊόντος που προστέθηκε στο διάλυμα.







Εικόνα 5.1: Χρωματογραφήματα διαλυμάτων ελέγχου κατά την 0, 7 και 18 ημέρα δειγματοληψίας

IS1: Naphalene-d8

IS2: Phenanthrene-d10

IS3: Chrysene-d12

IS4: Perylene-d12

Σύμφωνα λοιπόν με την τάση των παραπάνω χρωματογραφημάτων για το διάλυμα ελέγχου δεν φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη διακύμανση στη μορφή των κορυφών. Πράγμα που δείχνει ότι ουσιαστικά απουσία θρεπτικών υλικών οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί είναι ανίκανοι να αντεπεξέλθουν στα μεγάλα φορτία οργανικού άνθρακα που δημιουργούν συνθήκες περιορισμού σε άζωτο και φώσφορο. Αυτή η τάση πιστοποιείται και παρακάτω με την ποσοτική ανάλυση των αλκανίων.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το GC-MS έδωσε τα εξής:

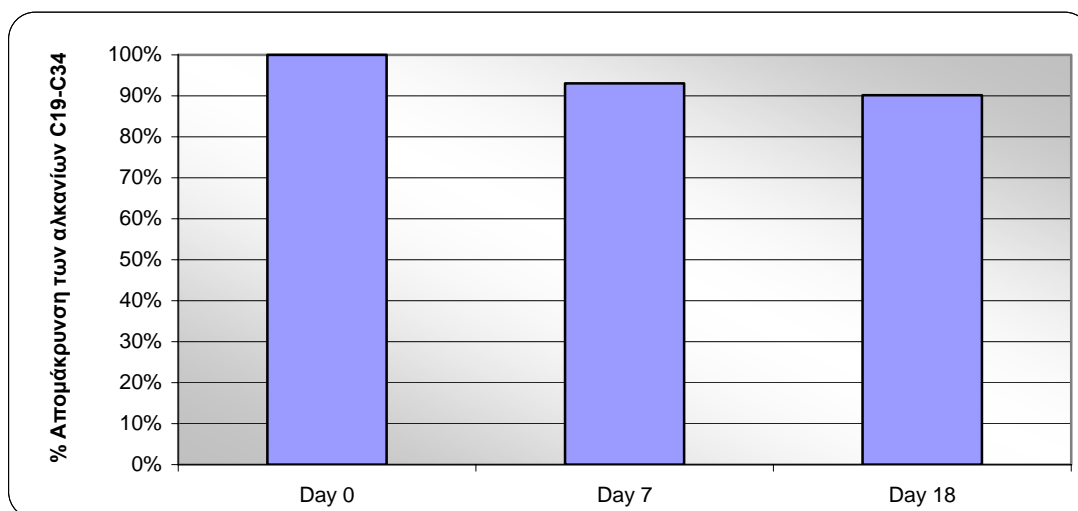
	Abudance							
	Day 0			Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος							
Αλκάνια	CC0#1	CC0#2	CC0#3	CC7#1	CC7#2	CC18#1	CC18#2	CC18#3
C10								
C11								
C12								
C13			105677		44031		298591	
C14	189938	397084	831023	2824870	410253	68349	2048535	186586
C15	2068175	2114170	3056292	7035585	1652524	1645923	5579609	1218931
C16	6368316	4890142	5790515	10067202	3635227	5998899	8365474	3179193
C17	13770517	10481427	11402162	16583281	7195069	12379415	13568976	7067460
C18	10620960	7881088	8161384	14684434	5802916	9317824	9673555	4986385
C19	8810708	5670097	5988707	6834883	4509914	6469094	7139446	3927112
C20	7379504	5179041	5638987	5668167	4348448	4876415	6604105	3798795
C21	4917573	3623974	3852442	3247282	3036566	2829778	4886650	2638109
C22	3534733	3056908	3053345	2178114	2656329	1969669	3908426	2120292
C23	2089476	1910650	1946209	1112245	1788077	982301	2382309	1294544
C24	1625228	1602608	1494475	874277	1488098	760000	2002814	1116025
C25	775976	853827	839750	396707	821600	333642	1150104	582027
C26	586396	678872	618453	290256	667652	252349	835875	451917
C27	305010	366019	331500	144030	363365	136390	458552	238541
C28	256680	280671	251702	109784	284178	117656	353430	185867
C29	159056	184863	162495	90211	176780	70737	214027	123735
C30	109874	139516	125850	67012	130466	62550	145599	93051
C31	101427	100161	88961	54871	85028	54489	100044	69993
C32	69489	68891	60445	38756	57785	40661	66940	54102
C33	53243	52676	52072	36322	46807	32567	46164	42255
C34	33974	28958	22832	3825	28642	25825	28453	27926
C35	22361	28746	14320			13733	16428	
IS								
Chrysene-d12	7549326	8214649	8269796	4973510	7887986	4904446	7128682	5455978
Perylene-d12	5350270	6524284	6589643	2887840	5209715	3329593	5928866	3994541

Σύμφωνα με τους σχετικούς συντελεστές απόκρισης (RRFs) και την σχέση 13 του κεφαλαίου 4 η συγκέντρωση των παραπάνω αλκανίων σε ppm εκφρασμένα σε ng/mg αργού πετρελαίου είναι αυτή που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

	Συγκέντρωση (ppm, ng/mg αργού πετρελαίου)							
	Day 0			Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος							
Αλκάνια	CC0#1	CC0#2	CC0#3	CC7#1	CC7#2	CC18#1	CC18#2	CC18#3
C10								
C11								
C12								
C13			464		216		983	
C14	628	1563	3152	18362	1735	451	5825	1254
C15	6110	7431	10353	40843	6243	9690	14171	7316
C16	10805	9871	11265	33564	7887	20282	12201	10959
C17	22356	20245	21225	52904	14937	40049	18938	23311
C18	15872	14012	13984	43121	11089	27747	12427	15139
C19	11784	9023	9184	17964	7713	17242	8209	10671
C20	9007	7520	7891	13594	6787	11860	6929	9420
C21	5800	5085	5210	7526	4580	6651	4955	6322
C22	3809	3919	3773	4612	3660	4230	3621	4642
C23	2077	2260	2219	2173	2273	1946	2036	2615
C24	3376	3961	3560	3569	3953	3146	3577	4710
C25	1703	2229	2113	1711	2305	1459	2170	2595
C26	1228	1691	1485	1194	1788	1053	1505	1923
C27	635	907	791	589	967	566	821	1009
C28	552	718	621	464	782	504	654	812
C29	391	541	458	436	556	346	452	618
C30	387	521	452	566	630	458	376	644
C31	355	373	318	461	409	397	257	482
C32	258	271	229	345	294	314	182	395
C33	212	222	211	346	255	269	134	330
C34	120	109	83	33	139	190	74	195
C35	94	128	61	0	0	120	50	0

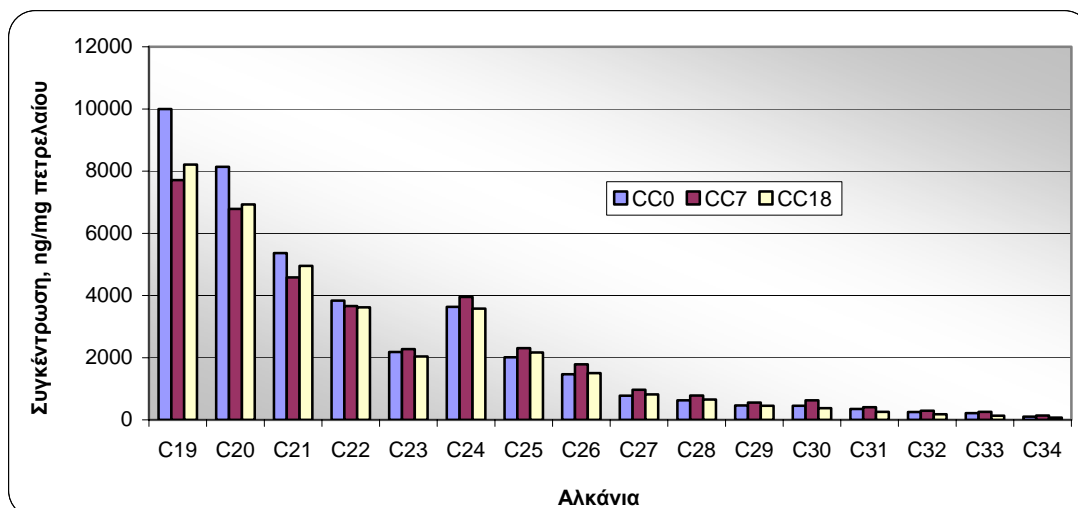
Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι επιλέχθηκαν τα αλκάνια C19-C34 επειδή οι μετρήσεις τους ήταν πιο αξιόπιστες και ότι η ποσοτικοποίηση των αλκανίων από C19-C29 έγινε με βάση το Chrysene-d12 και των αλκανίων από C30-C34 έγινε με βάση το Perylene-d12.

	Διάλυμα	Συνολική συγκέντρωση C19-C34 (ppm)	Μέση Τιμή	% Απομάκρυνση
Day 0	CC0#1	41694.22	39880.41	
	CC0#2	39350.74		
	CC0#3	38596.27		
Day 7	CC7#1	55582.98	37091.88	7%
	CC7#2	37091.88		
Day 18	CC18#1	50632.06	35950.08	10%
	CC18#2	35950.08		
	CC18#3	47383.03		



Σχήμα 5. 1: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ελέγχου

όπως φαίνεται και στο γράφημα η απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα (Day 0) είναι πολύ μικρή σχεδόν ασήμαντη. Τις πρώτες 7 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 7% ενώ στις 18 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 10%.



Σχήμα 5. 2: Συγκέντρωση των αλκανίων στο δείγμα ελέγχου τις ημέρες 0, 7 και 18

Παρατηρούμε από το παραπάνω γράφημα ότι οι συγκέντρωση των αλκανίων μικρού μοριακού βάρους από C19-C23 στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα) μειώνεται σταδιακά όχι όμως σημαντικά τις πρώτες ήδη 7 ημέρες και εν συνεχεία τις υπόλοιπες 10 μέρες. Ωστόσο δεν παρατηρείται το ίδιο και για τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλκάνια από C24-C32, όπου υπάρχει μια στασιμότητα σε ότι αφορά την αποικοδόμηση τους. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες όπου έδειξαν ότι τα αλκάνια από C10-C24 μεταβολίζονται πολύ πιο εύκολα. Σε φυσιολογικές θερμοκρασίες τα αλκάνια από C20-C40 είναι υδρόφοβα στερεά (κεριά) και βιοαποικοδομούνται πολύ πιο αργά. Τα χαμηλού μοριακού βάρους αλκάνια μέχρι το C12 έχει προβλεφθεί ότι απομακρύνονται φυσικά μέσω της εξάτμισης. Εντούτοις στην παρούσα μελέτη τα αλκάνια μέχρι και το C14 απομακρύνθηκαν μέσω τεχνητής γήρανσης (weathering) (Draft International Standard ISO/DIS 8708 "Crude Petroleum Oil -- Determination of Distillation Characteristics Using 15 Theoretical Plates Columns" by the International Organization for Standardization).

Η σχετική συγκέντρωση των αλκανίων στο εκάστοτε διάλυμα έχει υπολογιστεί με βάση την συγκέντρωση του κάθε συστατικού στο διάλυμα εκφρασμένο ως ποσοστό των συνολικών αλκανίων (C19-C34) σε κάθε περίοδο δειγματοληψίας (Day 0, 7 & 18) και κανινοκοποιημένο προς την συγκέντρωση του κάθε συστατικού στο αρχικό διάλυμα (Day 0).

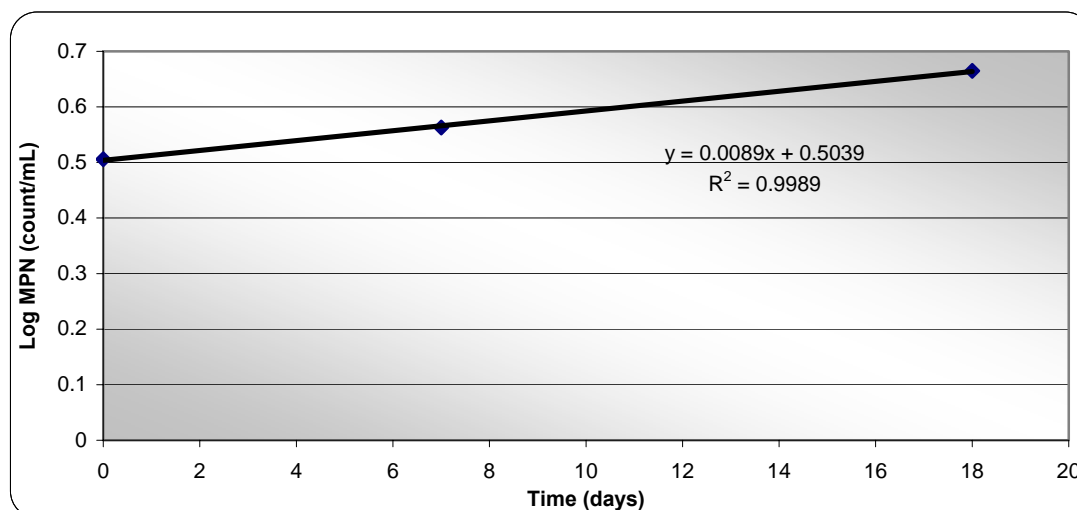
5.1.3 MPN Ανάλυση

Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με την MPN διαδικασία κάνοντας χρήση λογιστικών φύλλων του Microsoft excel. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα δεδομένα και τα αποτελέσματα όπως αυτά εισήχθησαν στο excel. Η MPN ανάλυση των υπολοίπων δειγμάτων γίνεται με τον ίδιο τρόπο και ανάπτυξη των πινάκων παρατίθεται στο παράρτημα Β.

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC0#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

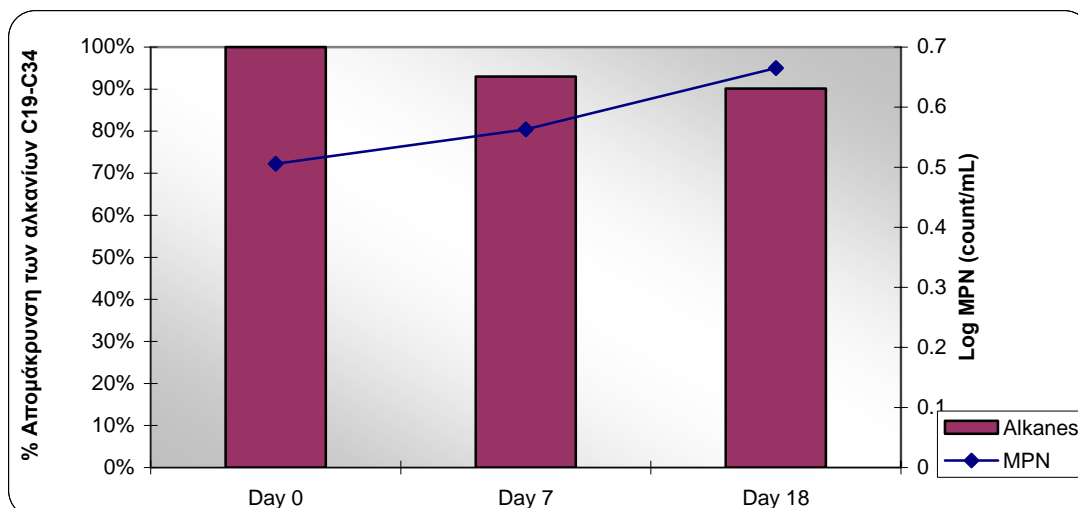
Από τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στον συγκεντρωτικό πίνακα:

	Διάλυμα	MPN/mL	Μέση Τιμή
Day 0	CC0#1	2.3026	3.2046
	CC0#2	5.0087	
	CC0#3	2.3026	
Day 7	CC7#1	5.0087	3.65565
	CC7#2	2.3026	
Day 18	CC18#1	2.3026	4.6235
	CC18#2	1.4899	
	CC18#3	10.0779	



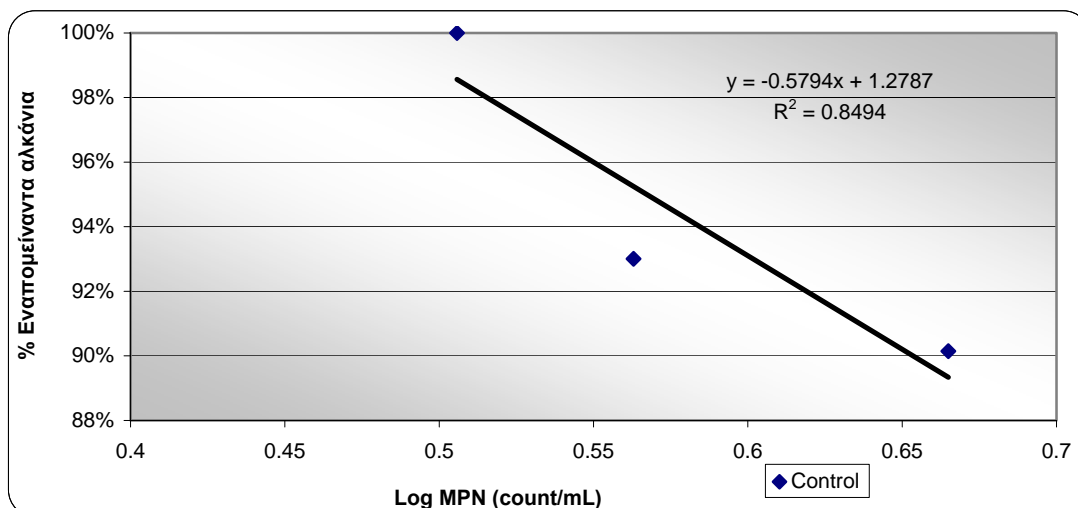
Σχήμα 5. 3: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου

Η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα) μπορεί να είναι αργή αλλά είναι σταθερή και αύξουσα. Έτσι τις πρώτες 7 ημέρες παρατηρείται αύξηση 12.33% στην μικροβιακή μάζα και στις 18 ημέρες η μικροβιακή μάζα αυξάνεται κατά 30% σχεδόν διπλασιάστηκε μέσα στις απόμενες 11 ημέρες.



Σχήμα 5. 4: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα)

Από το γράφημα τις απομάκρυνσης των αλκανίων και της μικροβιακής ανάπτυξης στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα) εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μικροβιακή ανάπτυξη συνάδει με την απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα. Όσο δηλαδή, μεγαλύτερη είναι η αύξηση στην μικροβιακή μάζα τόσο μεγαλύτερο θα είναι και το ποσοστό απομάκρυνσης των αλκανίων από το διάλυμα. Αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ μικροβιακής ανάπτυξης και απομάκρυνσης των αλκανίων στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα) φαίνεται και στο ακόλουθο γράφημα.

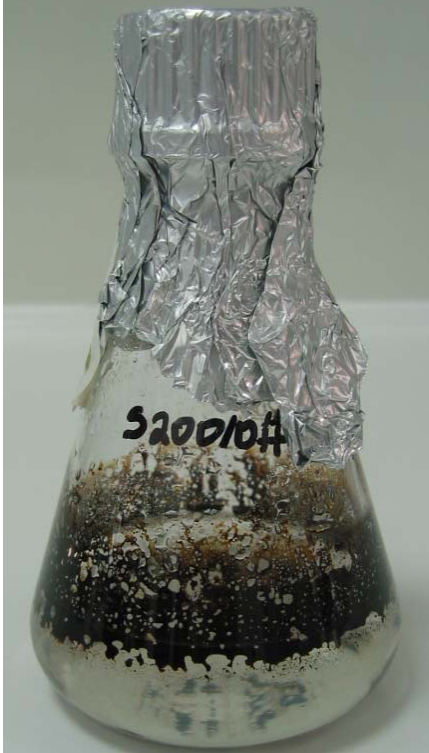







Σχήμα 5. 5: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα)

5.2 Διάλυμα S200

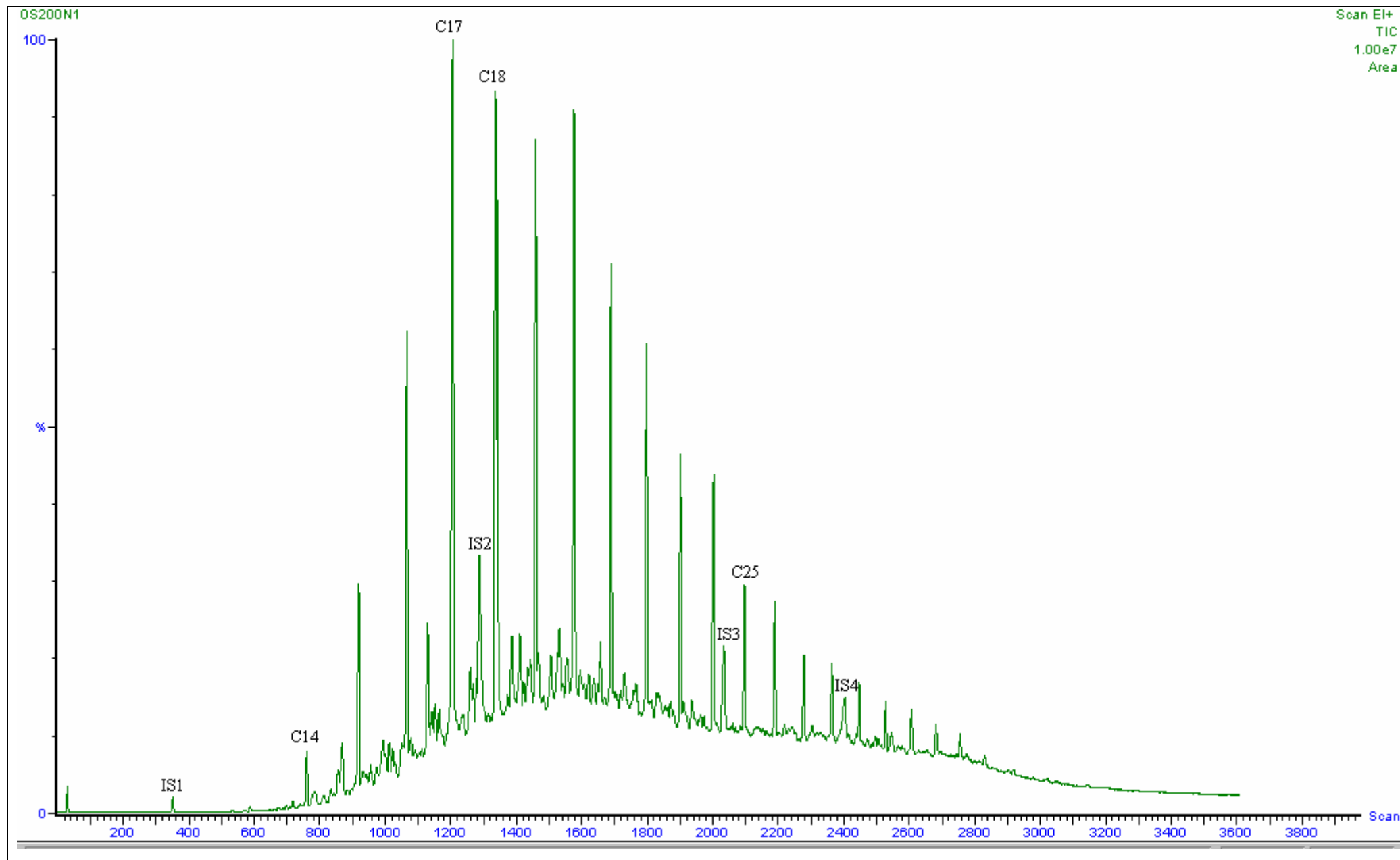
Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε ένας εμπορικός παράγοντας βιοαποικοδόμησης, S200 σαν αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στο ατύχημα του Prestige στις ακτές της Ισπανίας και δεν προστέθηκε κανένα άλλο θρεπτικό παρά μόνο πετρέλαιο.

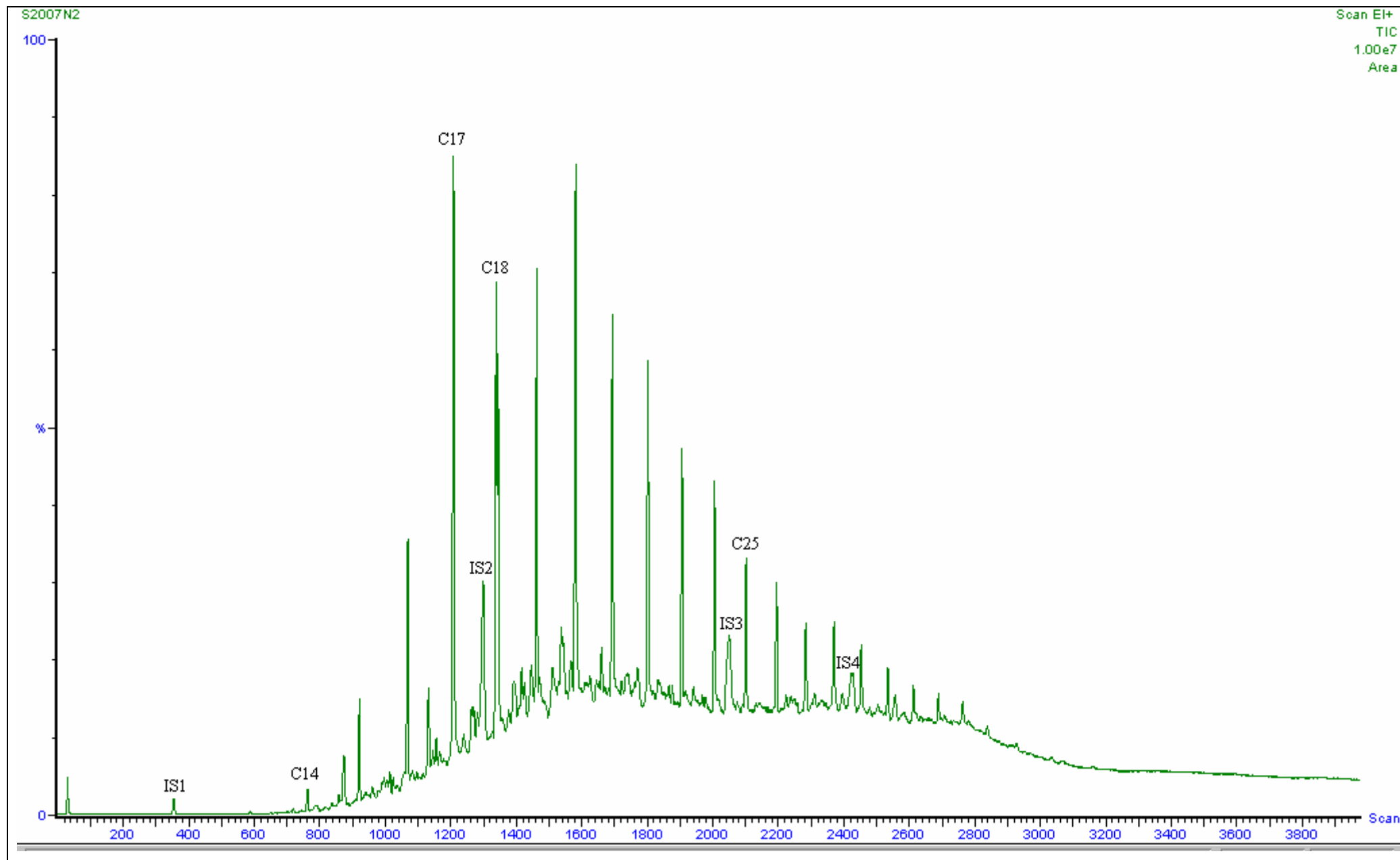
5.2.1 Φυσικές Παρατηρήσεις

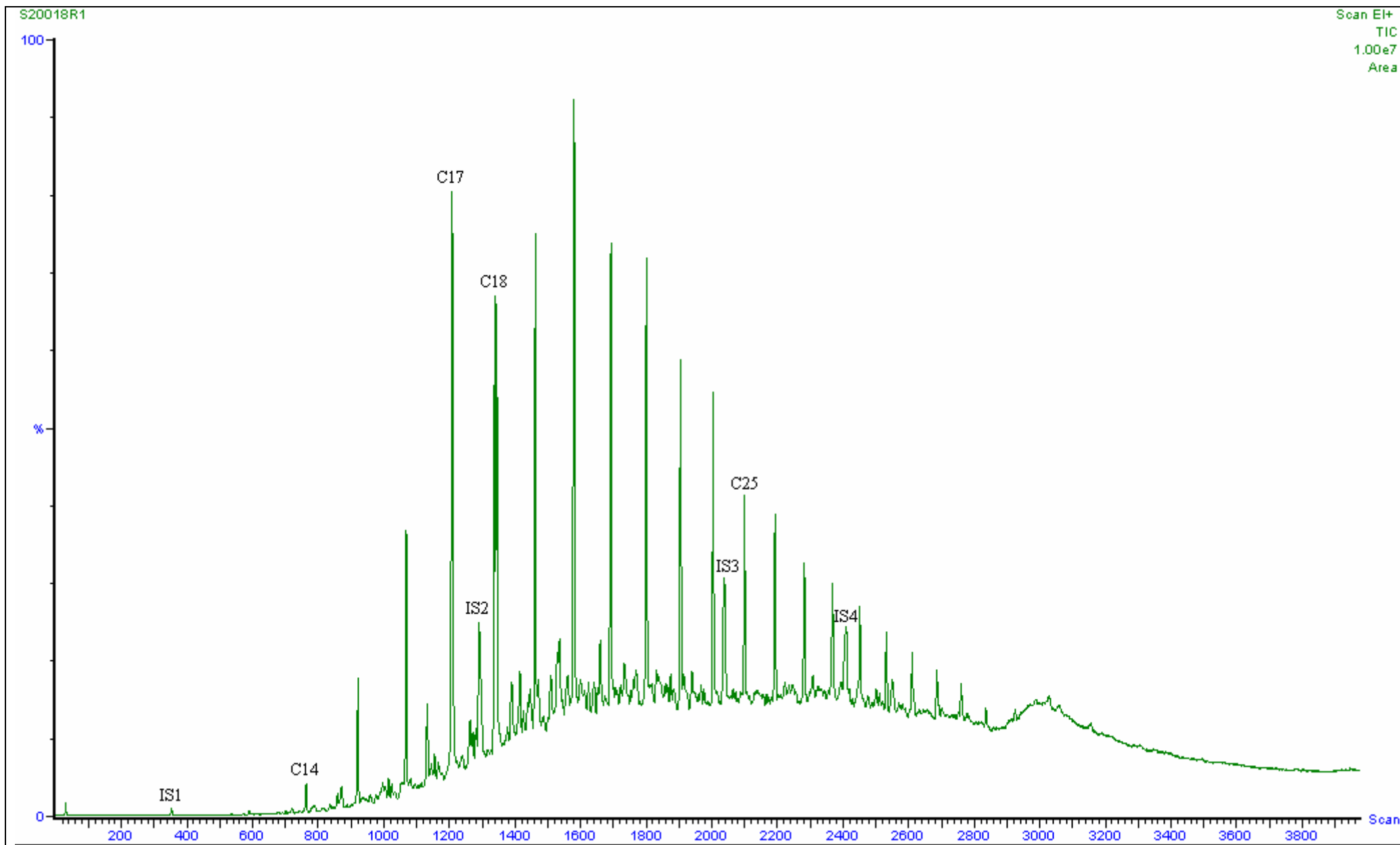
		
		
S200-0	S2007	S20018
Διασπορά πετρελαίου στην υδάτινη στήλη και δημιουργία μικρών σταγονιδίων πετρελαίου		

5.2.2 GC-MS Ανάλυση

Ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων







Εικόνα 5.2: Χρωματογραφήματα διαλυμάτων S200 κατά την 0, 7 και 18 ημέρα δειγματοληψίας

Αυτό που αξίζει να σημειωθεί στην περίπτωση αυτού του εμπορικού παράγοντα βιοαποικοδόμησης (S200) είναι ότι ουσιαστικά δεν ενίσχυσε στην αποικοδόμηση του πετρελαίου, παρόλο που παρατηρήθηκε διάλυση του πετρελαίου κατά την εφαρμογή του, όπως φαίνεται και από την τάση που ακολουθούν τα χρωματογραφήματα στο διάστημα από 0 μέρες έως 18 μέρες. Η ποιοτική αυτή σύγκριση όπως φαίνεται και παρακάτω επαληθεύεται και από την χημική ανάλυση των συστατικών

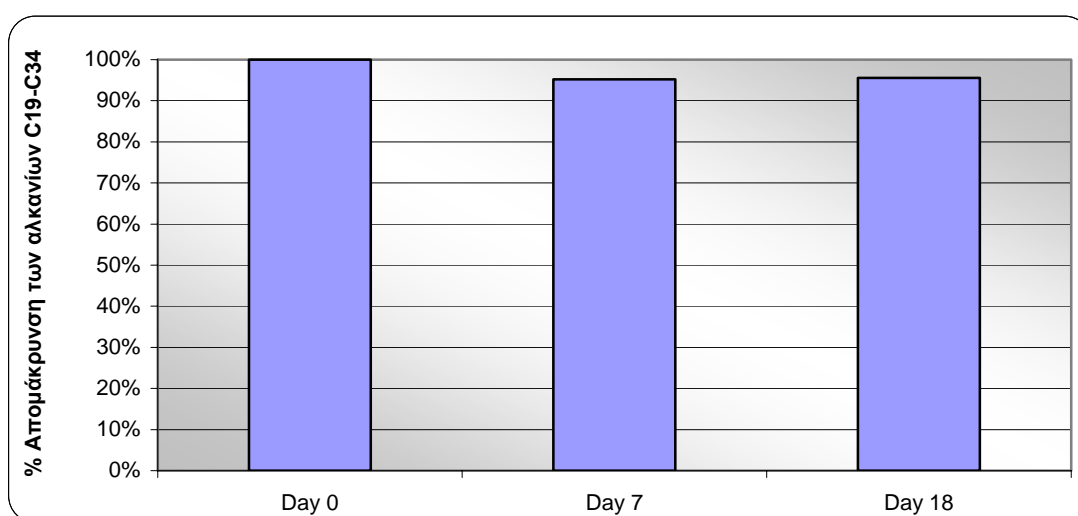
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το GC-MS έδωσε τα εξής:

	Abundance						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	S200-0#1	S200-0#2	S2007#1	S2007#2	S20018#1	S20018#2	S20018#3
C10							
C11							
C12							
C13			321103				85246
C14	246889		1579056	61330	47499	53726	740304
C15	1521854	54614	3590989	478976	496661	707104	3079756
C16	3938622	577580	6219612	1706047	1524991	2748217	6216415
C17	8594977	3382824	10976308	5027728	4585573	8386428	12088566
C18	6643537	3345716	7597413	4436653	3758511	7702433	8942465
C19	5110969	3443595	5776660	3845747	3806225	4550689	6799696
C20	4777126	3652130	5432573	3991030	4324222	4460606	6223312
C21	3224914	2738414	3880587	2844913	3487820	2721135	4376677
C22	2536234	2359930	3109678	2331734	3279324	2081523	3549315
C23	1522859	1627976	1938140	1598733	2373747	1234983	2539583
C24	1307260	1378807	1618076	1325381	2139343	1002169	1926564
C25	597956	852554	887589	764881	1357837	493824	1017835
C26	454427	689737	646601	580508	1095914	390700	790407
C27	225902	402862	351072	329950	657192	207115	428791
C28	172257	344655	256140	252018	490871	180633	322047
C29	116384	249122	166602	169448	331833	58274	214052
C30	84951	187795	122435	143100	234917	90687	159669
C31	72281	129175	93400	88623	176555	82433	104745
C32	54557	90406	69830	63024	113676	1175	66037
C33	39319	65794	58412	44804	86268	63174	60984
C34	27662	52898	47020	27273	58420	44587	30995
C35	16222	28052	38386		49481	25456	22408
IS							
Chrysene-d12	5229695	6811368	7571125	7533626	7241103	6964795	8194642
Perylene-d12	3631698	5030216	5230287	4940356	5671819	4473952	5563883

Η συγκέντρωση των παραπάνω αλκανίων σε ppm εκφρασμένα σε ng/mg αργού πετρελαίου είναι αυτή που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

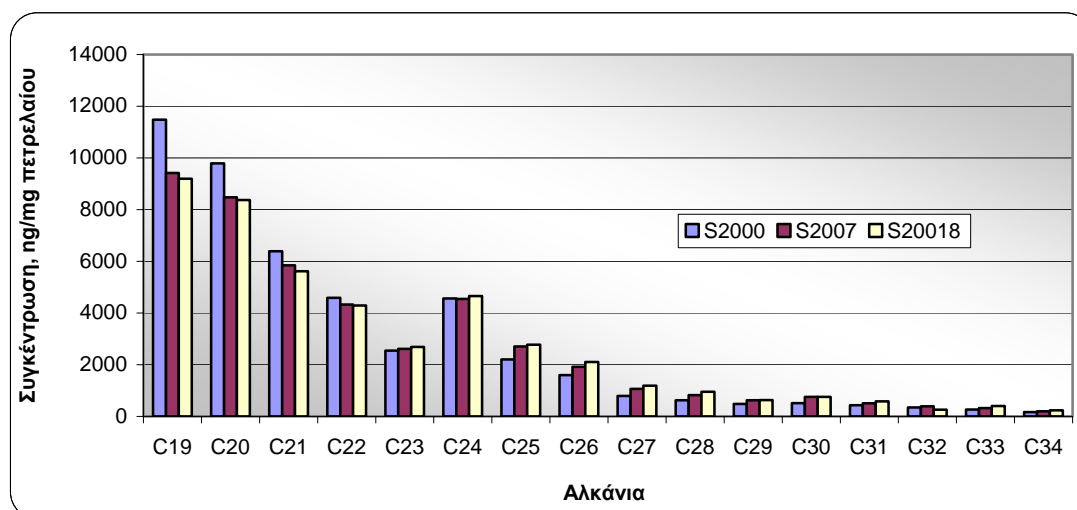
	Συγκέντρωση (ppm, ng/mg αργού πετρελαίου)						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	S200-0#1	S200-0#2	S2007#1	S2007#2	S20018#1	S20018#2	S20018#3
C10							
C11							
C12							
C13			1587				327
C14	1372		6742	350	212	339	2451
C15	7551	232	13694	2440	1980	3985	9108
C16	11223	1406	13622	4990	3492	8895	10558
C17	23435	7880	23003	14072	10048	25974	19646
C18	16674	7174	14656	11431	7581	21958	13377
C19	11481	6609	9974	8868	6871	11611	9104
C20	9792	6396	8559	8398	7123	10386	7603
C21	6388	4634	5908	5785	5552	6123	5167
C22	4590	3649	4326	4332	4770	4279	3829
C23	2543	2322	2487	2740	3185	2342	2527
C24	4561	4110	4339	4747	5998	3971	4006
C25	2204	2684	2514	2894	4022	2067	2236
C26	1598	2073	1748	2096	3098	1561	1657
C27	790	1203	944	1184	1847	823	894
C28	622	1064	711	935	1425	741	694
C29	480	878	529	718	1101	273	527
C30	513	910	571	939	1010	672	587
C31	434	623	433	579	756	608	384
C32	347	462	343	436	515	9	256
C33	268	360	307	332	419	528	253
C34	168	258	221	180	253	333	115
C35	116	162	213	0	253	224	98

	Διάλυμα	Συνολική συγκέντρωση C19-C34 (ppm)	Μέση Τιμή	% Απομάκρυνση
Day 0	S200-0#1	46778.37	46778.37	
	S200-0#2	38236.00		
Day 7	S2007#1	43913.53	44537.61	5%
	S2007#2	45161.69		
Day 18	S20018#1	47943.44	44703.59	4%
	S20018#2	46328.83		
	S20018#3	39838.51		



Σχήμα 5. 6: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα S-200

όπως φαίνεται και στο γράφημα η απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα (Day 0) είναι πολύ μικρή σχεδόν ασήμαντη και στάσιμη. Τις πρώτες 7 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 5% ενώ στις 18 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 4%. Παρατηρείται δηλαδή μια στασιμότητα στην απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα με τον εμπορικό παράγοντα βιοαποικοδόμησης, S200. Έτσι λοιπόν εξάγεται το συμπέρασμα ότι αυτός ο εμπορικός παράγοντας δεν είναι αποτελεσματικός στην απομάκρυνση του πετρελαίου παρόλο που χρησιμοποιήθηκε και στο ατύχημα με το Prestige.



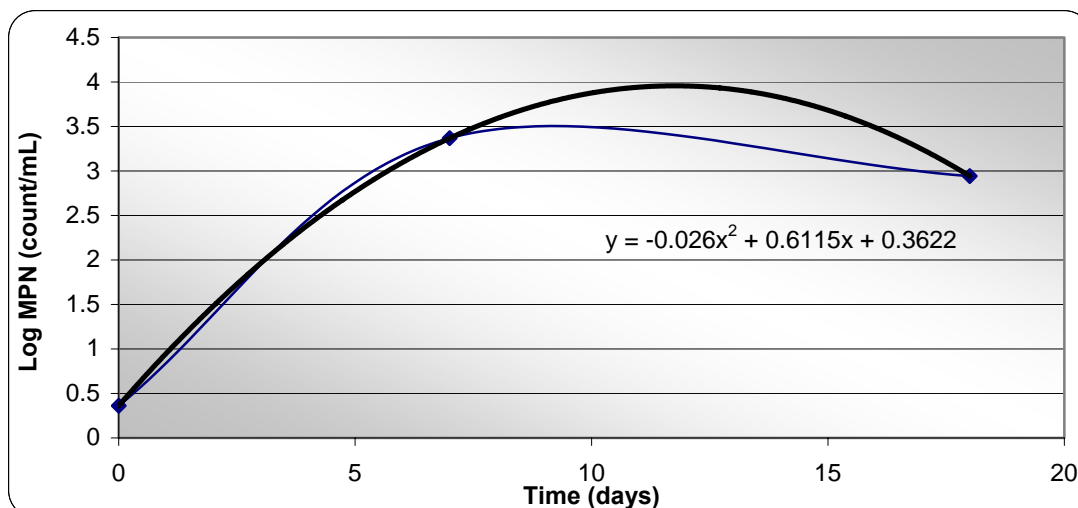
Σχήμα 5. 7: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα S200 τις ημέρες 0, 7 και 18

Ειδικότερα σύμφωνα με το γράφημα των συγκεντρώσεων των αλκανίων στο διάλυμα παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των αλκανίων μικρού μοριακού βάρους από C19-C23 μειώνεται σταδιακά όχι όμως σημαντικά τόσο στις 7 ημέρες όσο και στις 18 μέρες. Ωστόσο δεν παρατηρείται το ίδιο και για τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλκάνια από C24-C32, όπου υπάρχει μια στασιμότητα σε ότι αφορά την αποικοδόμησή τους.

5.2.3 MPN Ανάλυση

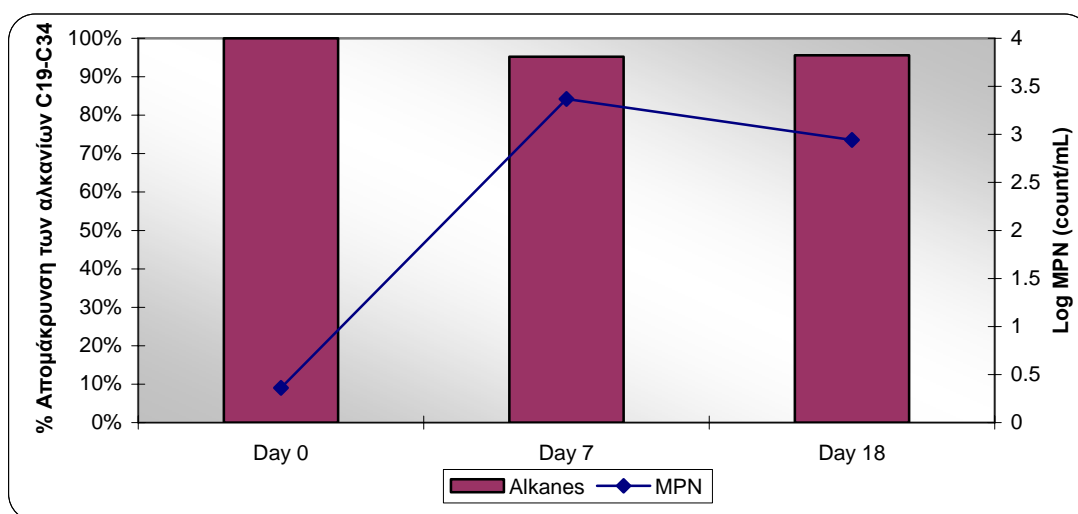
Από την ανάλυση των πινάκων στο excel καταλήγουμε στον συγκεντρωτικό πίνακα:

	Διάλυμα	MPN/mL	Μέση Τιμή
Day 0	S200-0#1	2.3026	2.3026
	S200-0#2	2.3026	
Day 7	S2007#1	4247.7989	2.3364E+03
	S2007#2	424.9048	
Day 18	S20018#1	2306.2812	8.7677E+02
	S20018#2	92.7577	
	S20018#3	231.2653	



Σχήμα 5. 8: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200

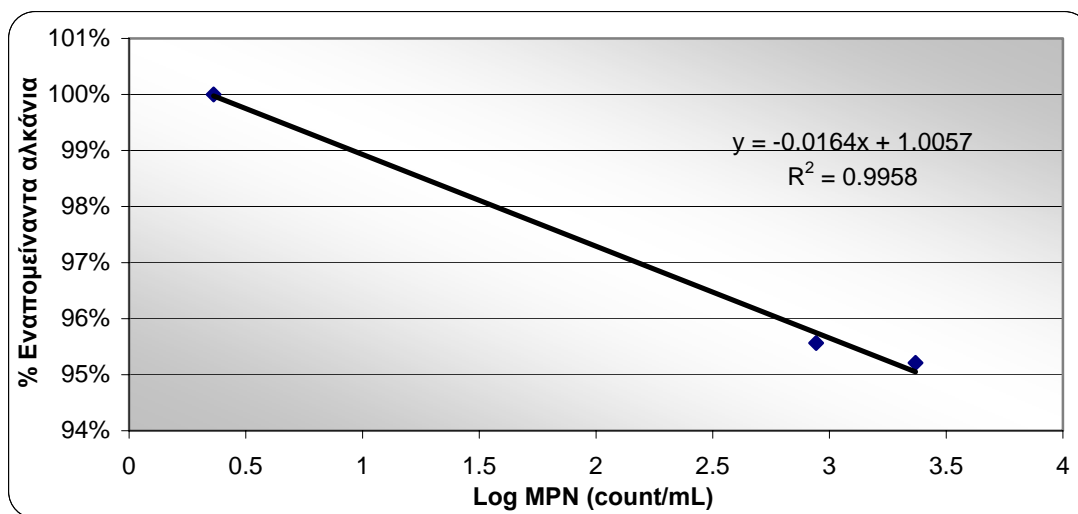
Η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200 είναι μεγάλη. Έτσι από τις πρώτες 7 ημέρες παρατηρείται αύξηση 99.9% στην μικροβιακή μάζα ενώ στις 18 ημέρες η μικροβιακή μάζα φαίνεται ότι σημειώνει μια μικρή πτώση.



Σχήμα 5. 9: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200

Από το γράφημα τις απομάκρυνσης των αλκανίων και της μικροβιακής ανάπτυξης στο διάλυμα S200 παρατηρείται ότι η μεγάλη μικροβιακή ανάπτυξη συνδέεται με τη μικρή παρόλα αυτά απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα τις πρώτες 7 ημέρες 5% ενώ για τις 18 ημέρες παρατηρείται απομάκρυνση 4%. Η τάση που παρουσιάζει η μικροβιακή ανάπτυξη συμφωνεί με την τάση απομάκρυνσης των αλκανίων από το

διάλυμα. Αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ μικροβιακής ανάπτυξης και απομάκρυνσης των αλκανίων στο διάλυμα S200 φαίνεται και στο ακόλουθο γράφημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλη την αύξηση στην μικροβιακή ανάπτυξη δεν παρατηρείται και αυξημένη απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα, πράγμα το οποίο δείχνει ότι ο εμπορικός παράγοντας βιοεξυγίανσης δεν είναι αποτελεσματικός όπως ελέγχθη και προηγούμενα. Ακόμα πρέπει να λεχθεί ότι αυτή η αύξηση της μικροβιακής μάζας ίσως να οφείλεται ουσιαστικά στην κατανάλωση των συστατικών του ίδιου του παράγοντα βιοεξυγίανσης σε σχέση με αυτών του πετρελαίου.


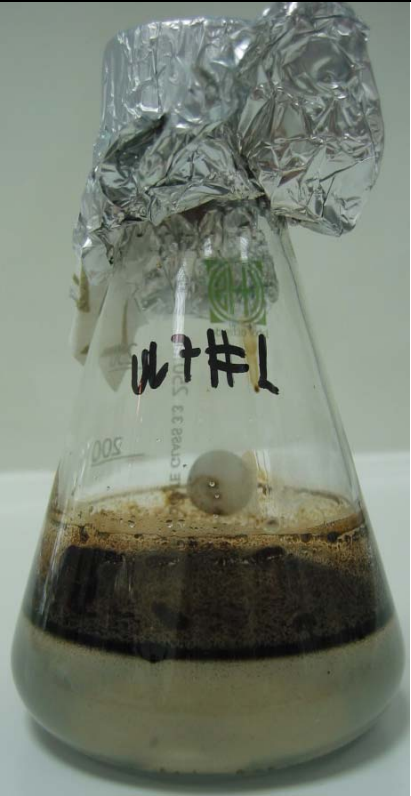





Σχήμα 5. 10: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα S200

5.3 Διάλυμα UL

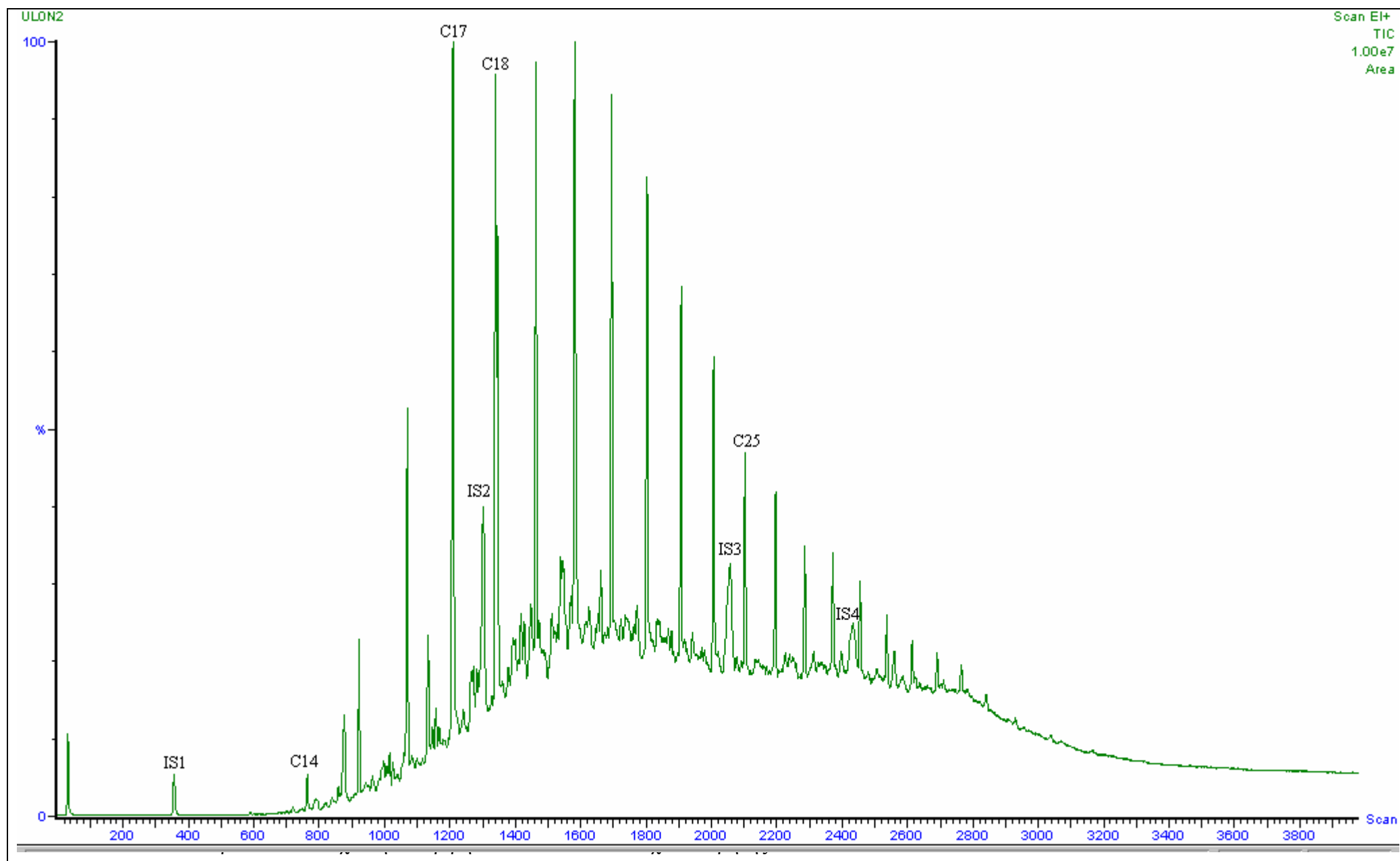
Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε ουρικό οξύ και λεκιθίνη.

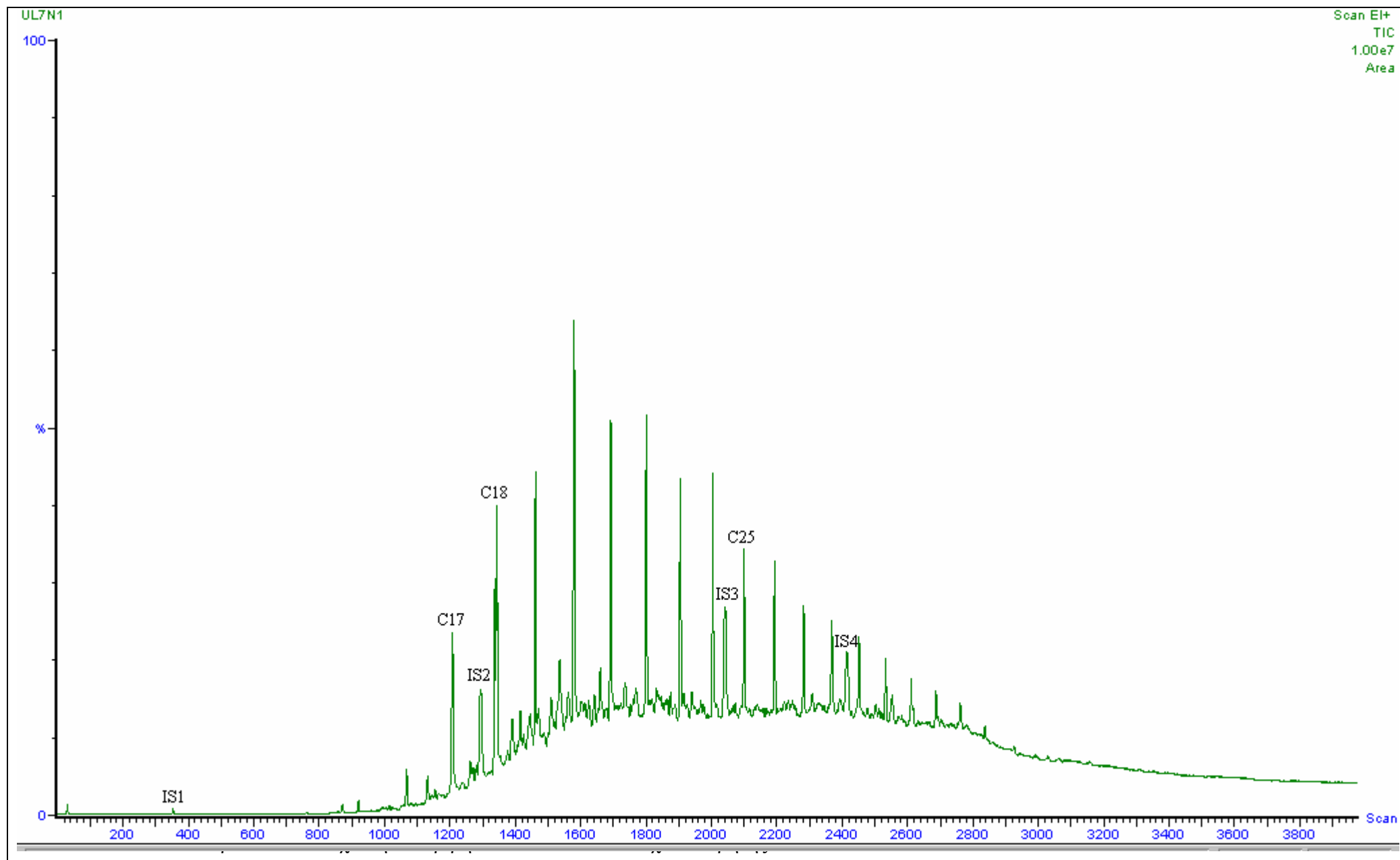
5.3.1 Φυσικές Παρατηρήσεις

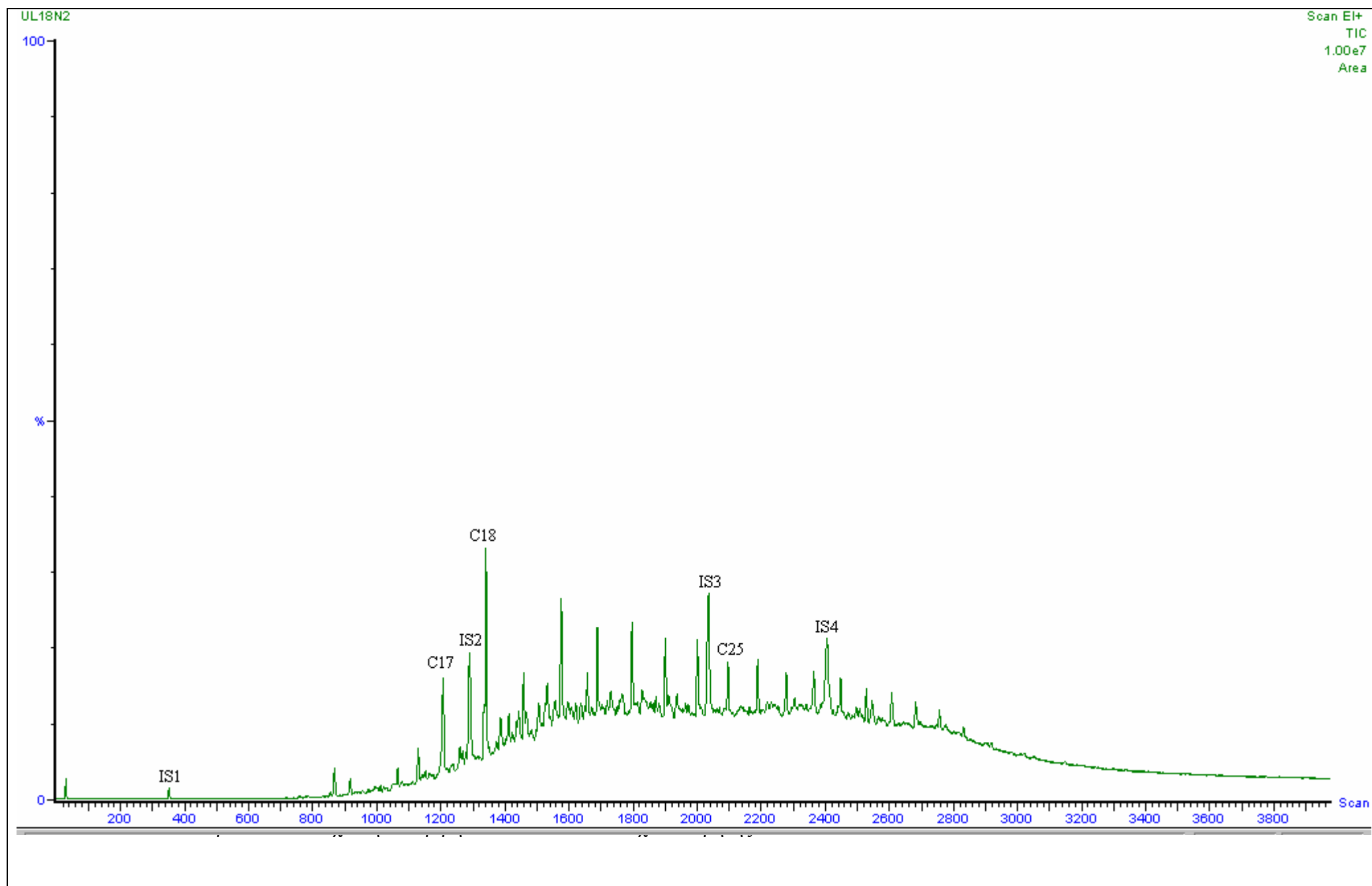
		
		
UL0	UL7	UL18
Κατάμαυρο χρώμα, μοιάζει με λάσπη, το πετρέλαιο φαίνεται ότι έχει διασπαρεί σε όλη την υδατική φάση.		

5.3.2 GC-MS Ανάλυση

Ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων







Εικόνα 5.3: Χρωματογραφήματα διαλυμάτων UL κατά την 0, 7 και 18 ημέρα δειγματοληψίας

Η ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων δείχνει ότι στα διαλύματα που προστέθηκε ο συνδυασμός ουρικού οξέως-λεκιθίνης παρατηρήθηκε αυξημένο το ποσοστό αποικοδόμησης καθώς περνούσαν οι μέρες αντίδρασης. Παρατηρείται επίσης ότι τα συστατικά του πετρελαίου έχουν σχεδόν απομακρυνθεί. Εδώ πρέπει να τονιστεί και η σημασία της διάλυσης της πετρελαιοκηλίδας που παρατηρείται κατά την εφαρμογή της λεκιθίνης στο διάλυμα. Αξίζει λοιπόν να τονιστεί η ευεργετική επίδραση της συνδυασμένης εφαρμογής ουρικού οξέως και λεκιθίνης στην βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων πράγμα το οποίο συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της χημικής και μικροβιολογικής ανάλυσης που παρατίθενται ακολούθως.

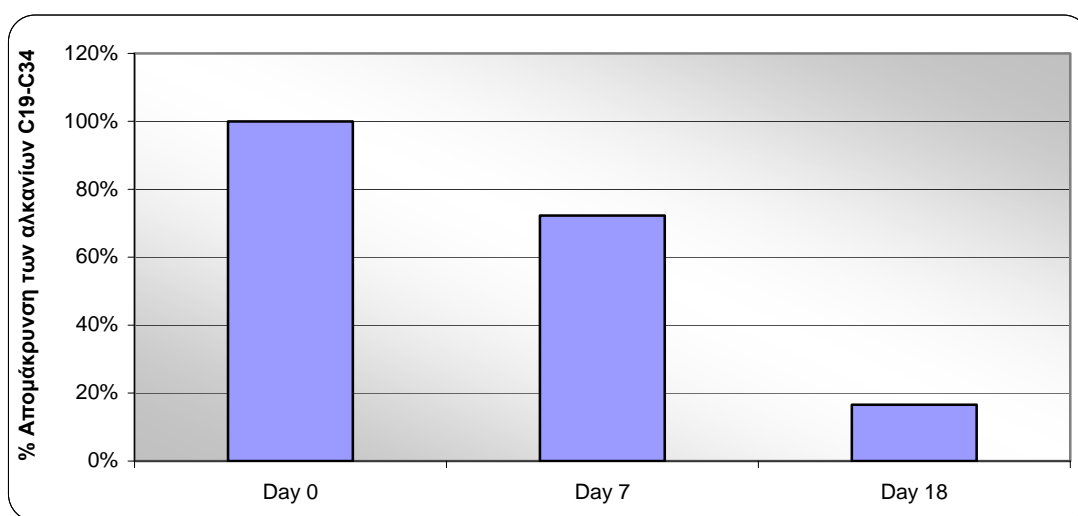
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το GC-MS έδωσε τα εξής:

	Abudance						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	UL0#1	UL0#2	UL7#1	UL7#2	UL18#1	UL18#2	UL18#3
C10							
C11							
C12							
C13	266653	16896			124206		
C14	1866840	211532		111384	622586		
C15	4919213	1048553	8931	618255	797241	29148	
C16	8416055	2897241	97024	1757962	1173092	87487	22545
C17	15109585	7398473	1165969	5241410	5426412	680758	285429
C18	11889571	7067383	1461545	3964228	662412	369748	58324
C19	9482713	6571099	2049791	2918229	731761	502447	169861
C20	8916669	6736141	2705266	2895668	824899	719796	114724
C21	6658572	5195494	2040726	2003940	412547	644245	99968
C22	5498785	4821264	2151742	1667624	490948	681267	122754
C23	3604547	3437013	1665670	1061024	310219	561619	116945
C24	2950429	3013333	1582911	866300	272676	551732	90913
C25	1726907	2001711	1117510	500059	151053	404015	83186
C26	1276351	1662332	937727	373048	126456	416780	88786
C27	715798	1036390	580358	215584	80863	270168	46733
C28	537392	782407	461497	190138	64319	225772	69971
C29	348946	548013	327617	135152	48815	183524	47651
C30	248425	403099	222586	139987	37068	141986	26401
C31	150187	267219	152766	83414	38823	109836	25003
C32	111336	173476	102097	60391	28790	94128	20999
C33	68771	106716	73109	45243	24361	64516	18082
C34	43225	64459	40806	28377	18493	41415	
C35	33583	32329	24756			27332	
IS							
Chrysene-d12	10807515	11925146	6958708	7448778	6744884	8326810	10907569
Perylene-d12	7354322	8906516	4802007	4924700	4355592	7247379	8632500

Η συγκέντρωση των παραπάνω αλκανίων σε ppm εκφρασμένα σε ng/mg αργού πετρελαίου είναι αυτή που φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

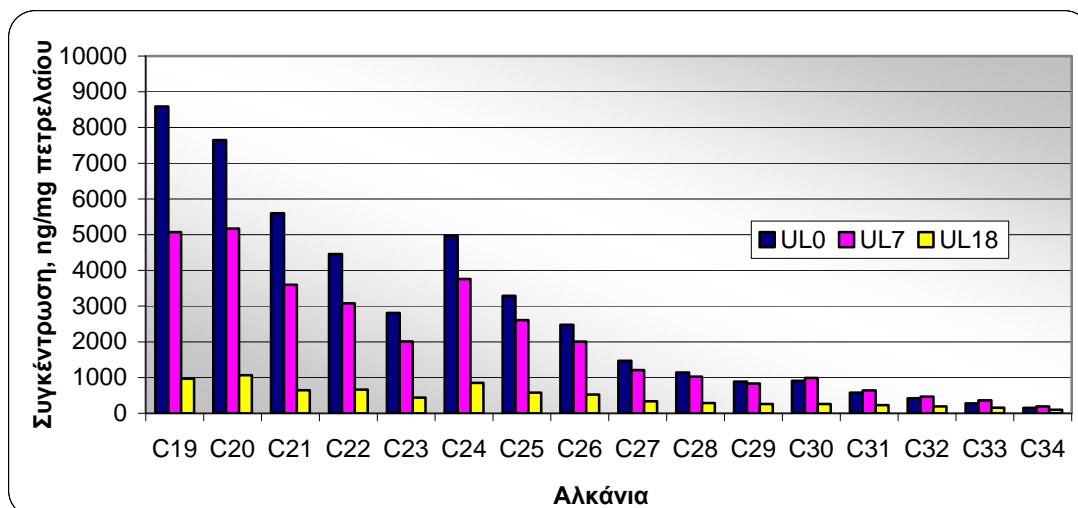
	Συγκέντρωση (ppm, ng/mg αργού πετρελαίου)						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	UL0#1	UL0#2	UL7#1	UL7#2	UL18#1	UL18#2	UL18#3
C10							
C11							
C12							
C13	803	53			689		
C14	4856	573		594	2984		
C15	11429	2539	37	2947	3413	66	
C16	11229	4029	231	4812	2884	114	110
C17	19291	9844	2659	13729	12765	846	1331
C18	13973	8655	3067	9558	1434	423	250
C19	9974	7203	3850	6297	1418	515	653
C20	8558	6738	4637	5702	1459	673	402
C21	6176	5022	3380	3813	705	582	339
C22	4660	4258	3257	2899	767	562	380
C23	2818	2800	2326	1702	447	428	334
C24	4820	5130	4618	2903	821	878	543
C25	2980	3600	3444	1770	480	679	524
C26	2102	2853	2758	1260	384	668	534
C27	1172	1768	1697	724	244	431	280
C28	909	1380	1395	660	201	372	433
C29	674	1104	1131	536	174	345	336
C30	716	1104	1130	852	208	312	239
C31	431	728	772	506	216	240	225
C32	338	500	546	387	170	218	200
C33	224	330	419	311	154	160	185
C34	126	178	209	174	104	92	
C35	115	105	150			71	

	Διάλυμα	Συνολική συγκέντρωση C19-C34 (ppm)	Μέση Τιμή	% Απομάκρυνση
Day 0	UL0#1	46795.19	45798.10	
	UL0#2	44801.00		
Day 7	UL7#1	35719.14	33108.83	28%
	UL7#2	30498.52		
Day 18	UL18#1	7950.48	7587.17	83%
	UL18#2	7223.86		
	UL18#3	5607.94		



Σχήμα 5. 1: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα UL

Όπως φαίνεται και στο γράφημα η απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα (Day 0) είναι σημαντική. Τις πρώτες 7 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 28% ενώ στις 18 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 83%. Η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται μέσα στις 18 ημέρες είναι καταπληκτική, ενώ μέσα στις πρώτες 7 ημέρες η απομάκρυνση αγγίζει το 1/3 των αλκανίων.



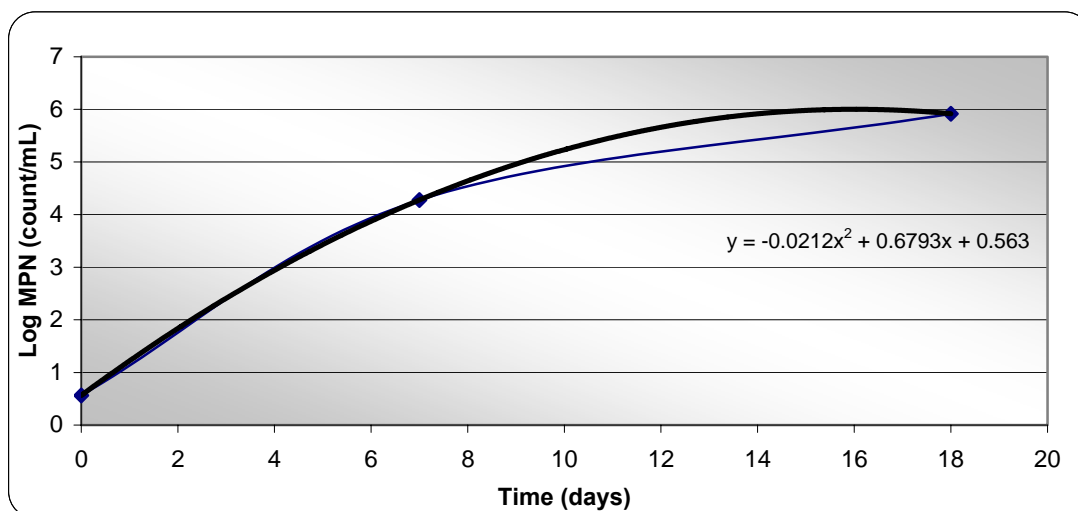
Σχήμα 5. 2: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα UL τις ημέρες 0, 7 και 18

Παρατηρούμε από το παραπάνω γράφημα ότι η συγκέντρωση των αλκανίων μικρού μοριακού βάρους από C19-C23 στο διάλυμα ουρικού οξέος-λεκιθίνης μειώνεται δραστικά από τις πρώτες κιόλας 7 ημέρες αλλά κυρίως στο ενδιάμεσο διάστημα μεταξύ 7 και 18 ημερών. Φαίνεται ότι ακόμα και τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλκάνια από C24-C32 βιοαποικοδομούνται.

5.3.1 MPN Ανάλυση

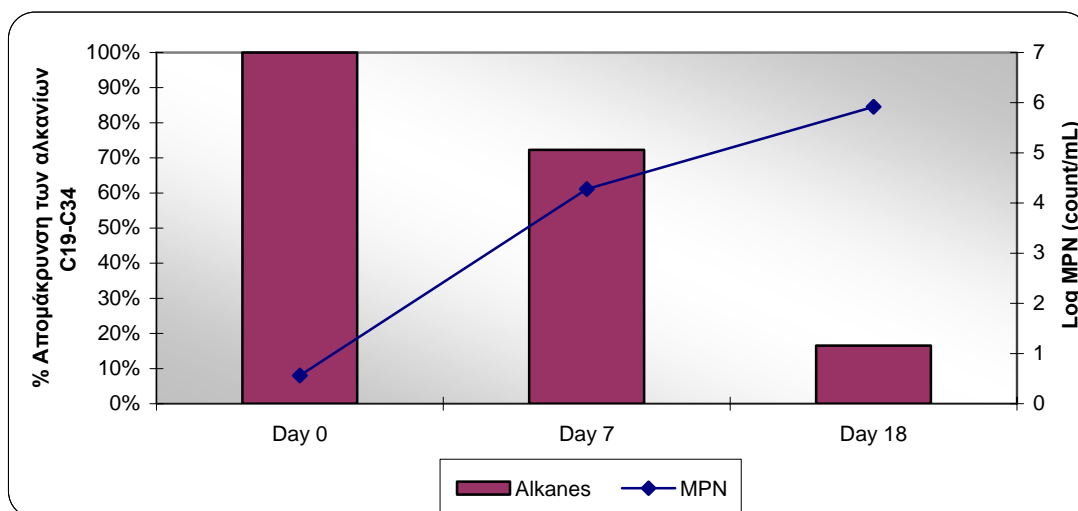
Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την MPN ανάλυση των δειγμάτων δίνονται στον κάτωθι πίνακα:

	Διάλυμα	MPN/mL	Μέση Τιμή
Day 0	UL0#1	2.3026	3.6556
	UL0#2	5.0087	
Day 7	UL7#1	23301.2200	18993.4894
	UL7#2	14685.7588	
Day 18	UL18#1	1.8014E+14	8.2732E+05
	UL18#2	1.5100E+06	
	UL18#3	1.4469E+05	



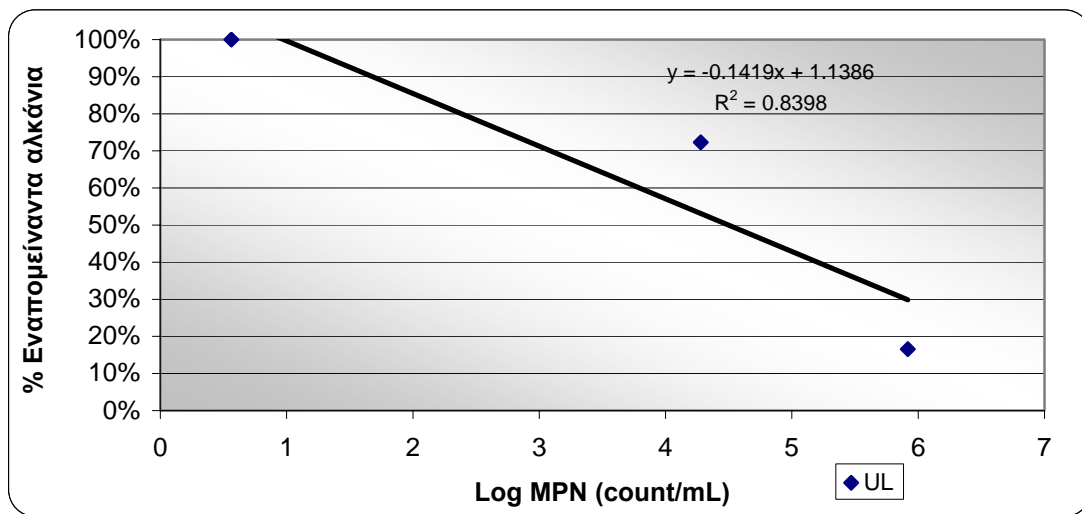
Σχήμα 5. 3: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL

Η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ουρικού οξέος-λεκιθίνης είναι αλματώδης. Έτσι από τις πρώτες 7 ημέρες παρατηρείται αύξηση 99.98% στην μικροβιακή μάζα και στις 18 ημέρες η μικροβιακή μάζα αυξάνεται κατά 99.99%.



Σχήμα 5. 4: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL

Από το γράφημα της απομάκρυνσης των αλκανίων και της μικροβιακής ανάπτυξης στο διάλυμα ουρικού οξέος-λεκιθίνης παρατηρείται ότι η αλματώδης μικροβιακή ανάπτυξη συνδέεται με τη μεγάλη απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα. Αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ μικροβιακής ανάπτυξης και απομάκρυνσης των αλκανίων στο διάλυμα ουρικού οξέος-λεκιθίνης φαίνεται και στο ακόλουθο γράφημα.



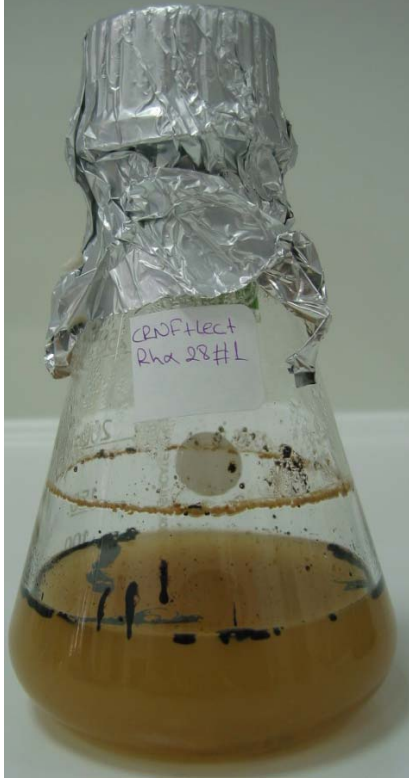



Σχήμα 5. 5: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα UL

5.2 Διάλυμα ULR

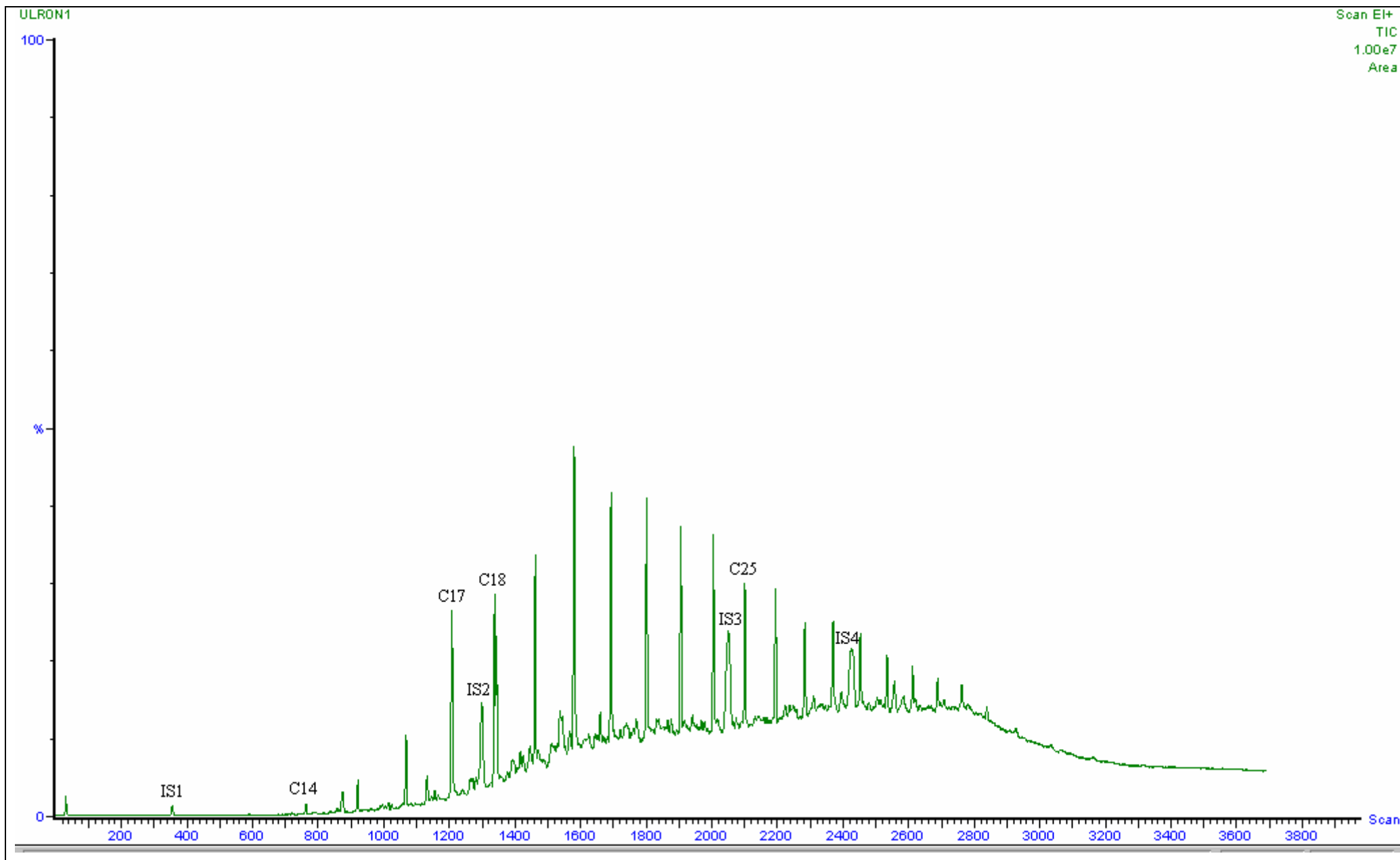
Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε ουρικό οξύ, λεκιθίνη και επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης (Rhamnolipids).

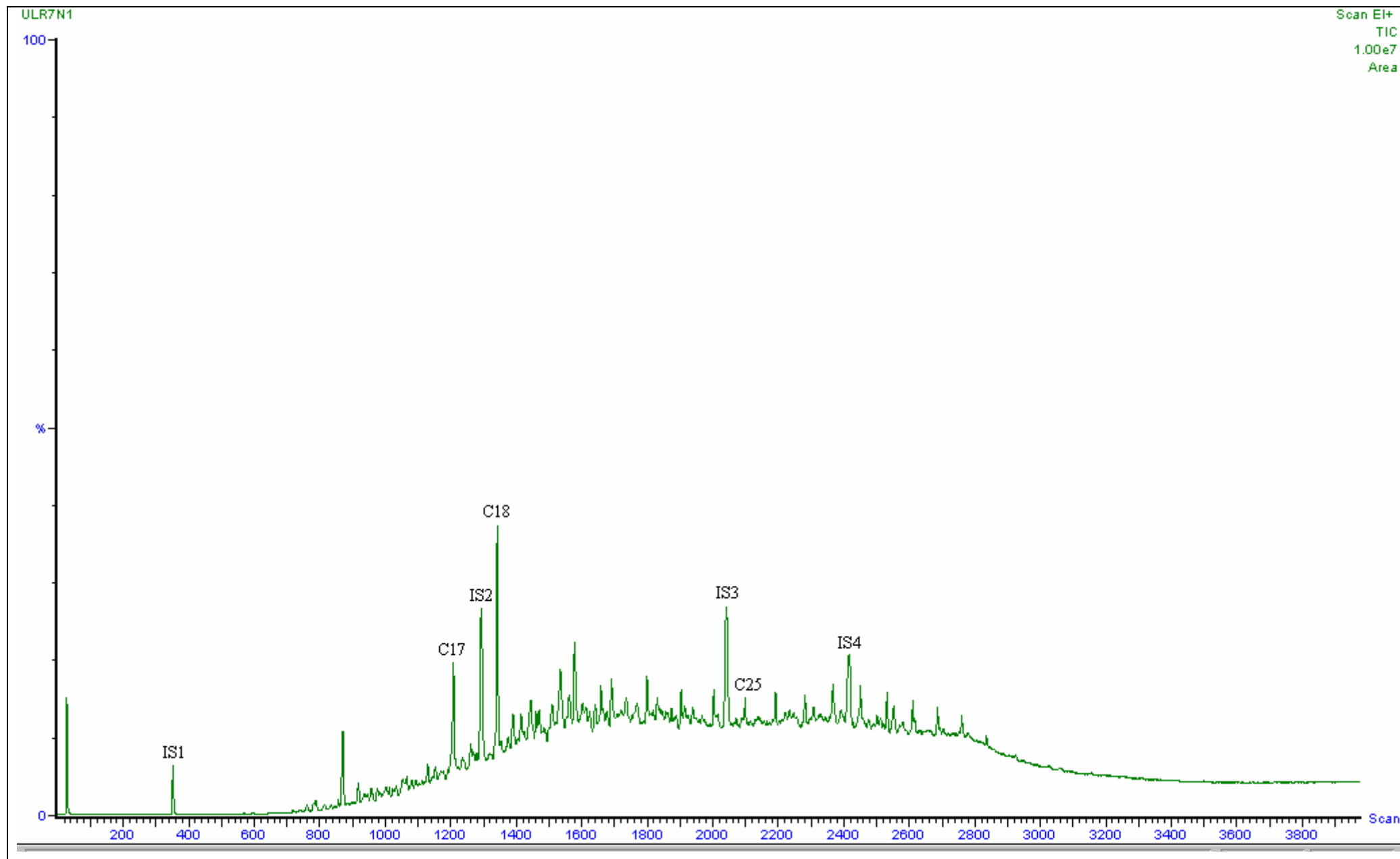
5.4.1 Φυσικές Παρατηρήσεις

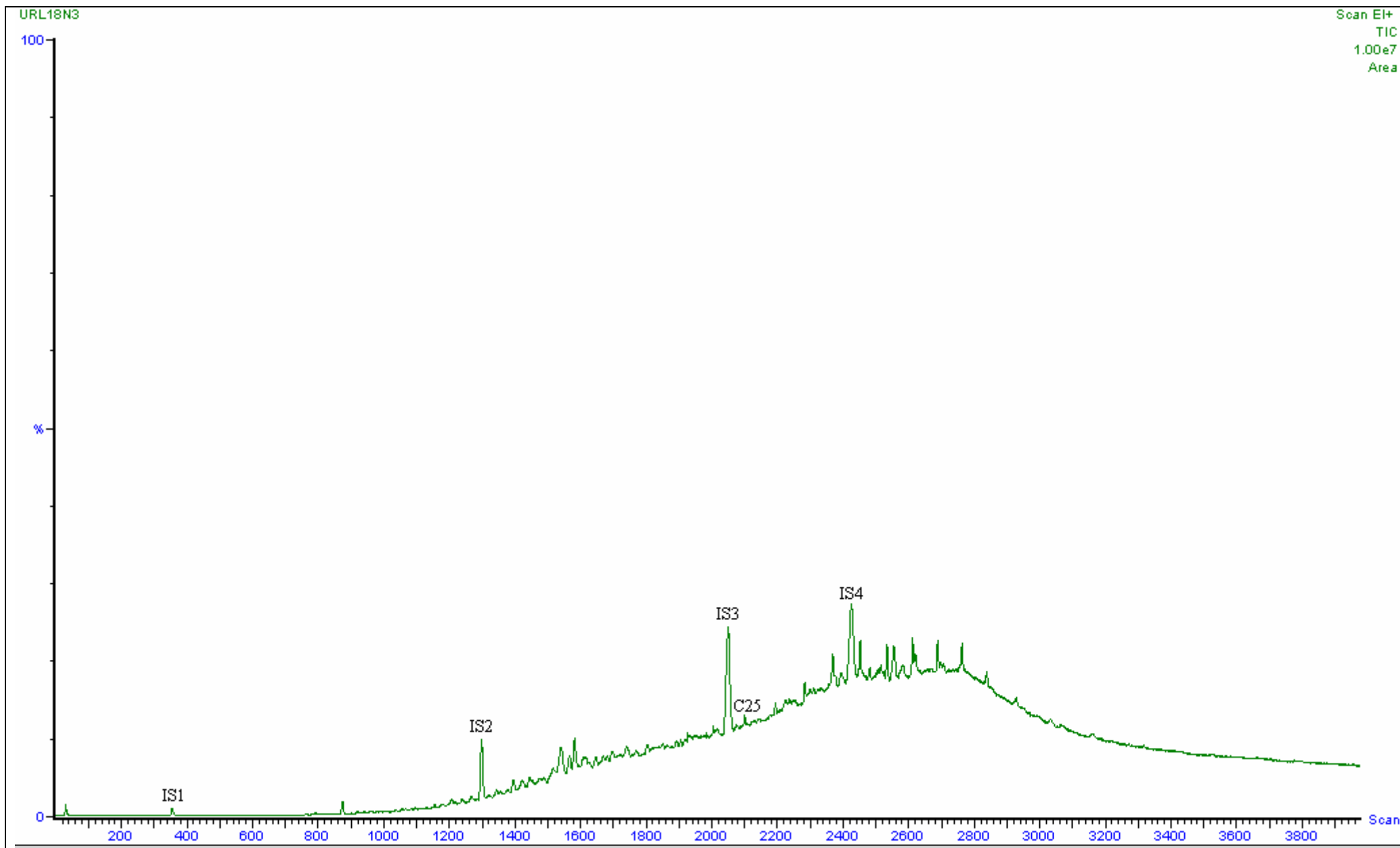
		
		
ULR0	ULR7	ULR18
Κιτρινόχρωμο, η κηλίδα φαίνεται ότι έχει διασπαρεί κανονικά στην υδατική φάση τόσο ώστε να έχει διαλυθεί, μόνο επιφανειακά παρατηρούνται κάποια συσσωματώματα.		

5.4.2 GC-MS Ανάλυση

Ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων







Εικόνα 5.1: Χρωματογραφήματα διαλυμάτων ULR κατά την 0, 7 και 18 ημέρα δειγματοληψίας

Η αποικοδόμηση του πετρελαίου που παρατηρείται από την τάση των παραπάνω χρωματογραφημάτων είναι συντριπτική και δηλώνει την πολύτιμη και καθοριστικής σημασίας δράση της επιφανειοδραστικής ένωσης βιολογικής προέλευσης στην συνδυασμένη εφαρμογή ουρικού οξέως και λεκιθίνης. Πράγματι η θετική επίδραση των rhamnolipids στην βιοδιέγερση των αυτόχθονων μικροοργανισμών και στην μετέπειτα βιοποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων καταδεικνύεται και κατωτέρω με βάση τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σχεδόν όλα τα συστατικά του πετρελαίου έχουν απομακρυνθεί επιτυχώς και σε μόλις διάστημα 7 ημερών όπου επιτυγχάνεται και το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης.

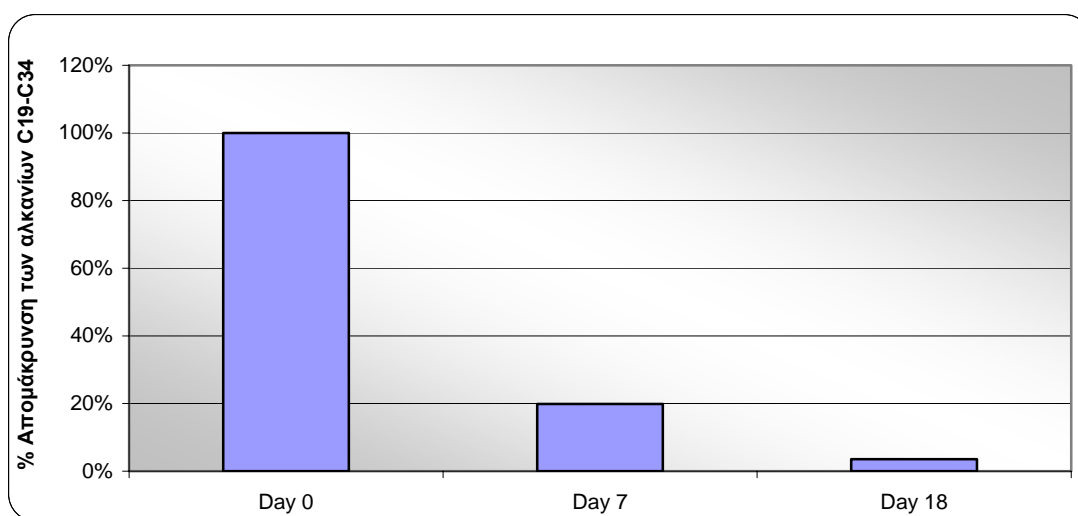
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το GC-MS έδωσε τα εξής:

	Abundance						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	ULR0#1	ULR0#2	ULR7#1	ULR7#2	ULR18#1	ULR18#2	ULR18#3
C10							
C11							
C12							
C13		57353					
C14		343499		26832		29129	
C15	50991	1103173	34713	92559		55650	
C16	208077	2302182	68423	219062		102912	
C17	995053	4775921	664012	1360253	19013	300299	
C18	1192489	3828607	117925	401728	14005	260256	12383
C19	1440485	3397393	209286	589543	17898	357605	
C20	1967003	3254822	301110	637215	23452	592538	16465
C21	1619598	2546906	233356	455955	26302	460832	19328
C22	1612581	2319442	300096	465673	26659	470954	27336
C23	1289399	1827985	208280	362850	23300	352231	27707
C24	1248498	1570486	219486	355481	27472	452167	42614
C25	880531	1048750	184729	234082	24774	298128	49815
C26	729550	902752	189769	206988	29979	265217	75063
C27	503518	568431	160941	164337	31019	207727	107678
C28	398348	430843	160650	128446	40711	203068	148886
C29	299640	284189	144109	116691	40172	191829	186114
C30	231483	224645	126903	86487	42269	166287	182492
C31	150354	153470	108921	68480	41277	136087	180486
C32	103055	104878	71871	56125	38625	105115	142860
C33	74497	69769	46330	34608	29379	64897	106620
C34	43829	44262	28214	24361	20409	38977	62852
C35	38109	17229	18989			19634	34812
IS							
Chrysene-d12	9834469	11649573	8258366	9531197	6040285	10730313	10192983
Perylene-d12	8598818	9250251	6376735	6663035	4952629	8193789	10380437

Η συγκέντρωση των παραπάνω αλκανίων σε ppm εκφρασμένα σε ng/mg αργού πετρελαίου δίνεται στον παρακάτω πίνακα.

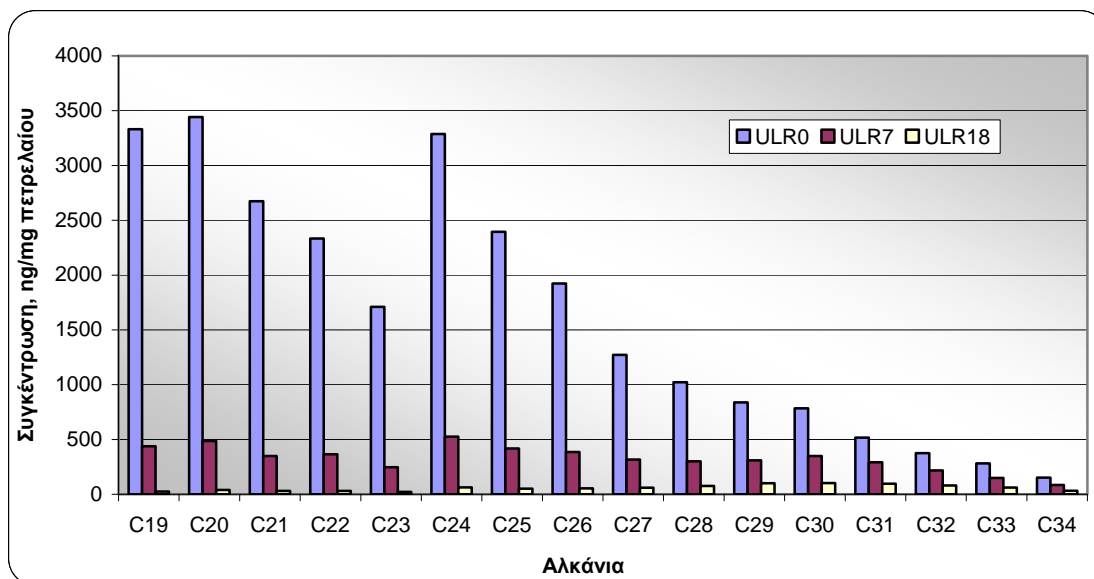
	Συγκέντρωση (ppm, ng/mg αργού πετρελαίου)						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	ULR0#1	ULR0#2	ULR7#1	ULR7#2	ULR18#1	ULR18#2	ULR18#3
C10							
C11							
C12							
C13		184					
C14		953		61		10	
C15	223	2734	121	189		17	
C16	522	3277	137	257		18	
C17	2390	6505	1276	1530	50	49	
C18	2637	4800	209	416	34	39	6
C19	2851	3812	331	546	39	48	
C20	3552	3333	435	539	46	73	7
C21	2826	2520	326	373	50	55	8
C22	2571	2097	383	348	46	51	10
C23	1897	1525	245	250	37	35	9
C24	3837	2737	540	512	92	95	30
C25	2859	1931	480	356	88	66	37
C26	2261	1586	470	300	102	56	53
C27	1551	993	397	237	104	44	76
C28	1268	778	409	191	142	44	108
C29	1090	586	419	199	160	48	154
C30	977	592	485	214	208	55	151
C31	632	403	415	169	202	45	148
C32	458	291	290	146	200	37	124
C33	355	208	200	97	163	24	99
C34	186	118	109	61	101	13	52
C35	191	54	86			8	34

	Διάλυμα	Συνολική συγκέντρωση C19-C34 (ppm)	Μέση Τιμή	% Απομάκρυνση
Day 0	ULR0#1	29172.72	26340.28	
	ULR0#2	23507.84		
Day 7	ULR7#1	5932.11	5234.13	80%
	ULR7#2	4536.15		
Day 18	ULR18#1	1782.31	927.03	96%
	ULR18#2	788.28		
	ULR18#3	1065.79		



Σχήμα 5. 6: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ULR

Όπως φαίνεται και στο γράφημα η απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα (Day 0) είναι αξιοσημείωτη. Τις πρώτες 7 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση μέχρι και 80% ενώ στις 18 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 96%. Η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται ακόμα και μέσα στις πρώτες 7 ημέρες είναι εκπληκτική. Σχεδόν το μεγαλύτερο μέρος των αλκανίων απομακρύνεται στις πρώτες 7 ημέρες οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός ουρικού οξέος-λεκιθίνης-rhamnolipids είναι αρκετά αποτελεσματικός και δουλεύει άμεσα και γρήγορα.



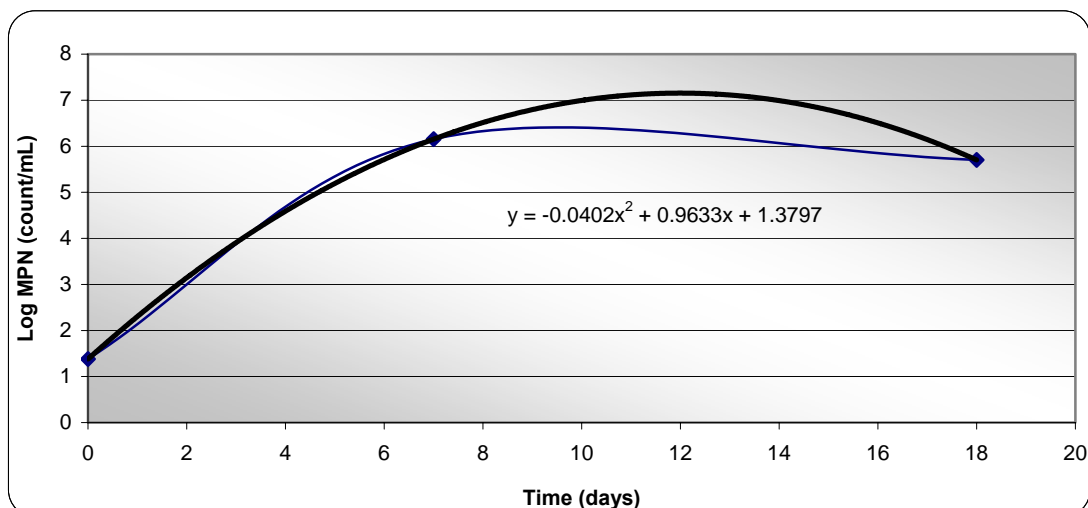
Σχήμα 5. 7: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα ULR τις ημέρες 0, 7 και 18

Η απομάκρυνση των αλκανίων είναι καθολική ακόμα και τα πιο ανθεκτικά στην αποικοδόμηση μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια δεν αντιστέκονται.

5.4.3 MPN Ανάλυση

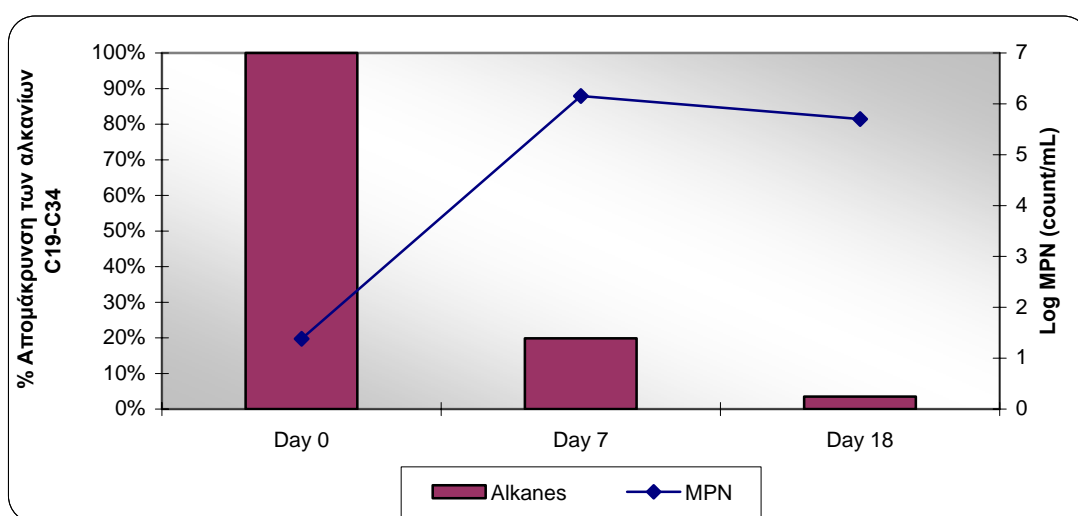
Η ανάλυση MPN των δειγμάτων δίνει τον παρακάτω πίνακα:

	Διάλυμα	MPN/mL	Μέση Τιμή
Day 0	ULR0#1	23.9701	23.9701
	ULR0#2	23.9701	
Day 7	ULR7#1	2.3488E+06	1.4261E+06
	ULR7#2	5.0332E+05	
Day 18	ULR18#1	5.0332E+05	5.0332E+05
	ULR18#2	1.8014E+14	
	ULR18#3	5.0332E+05	



Σχήμα 5. 8: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR

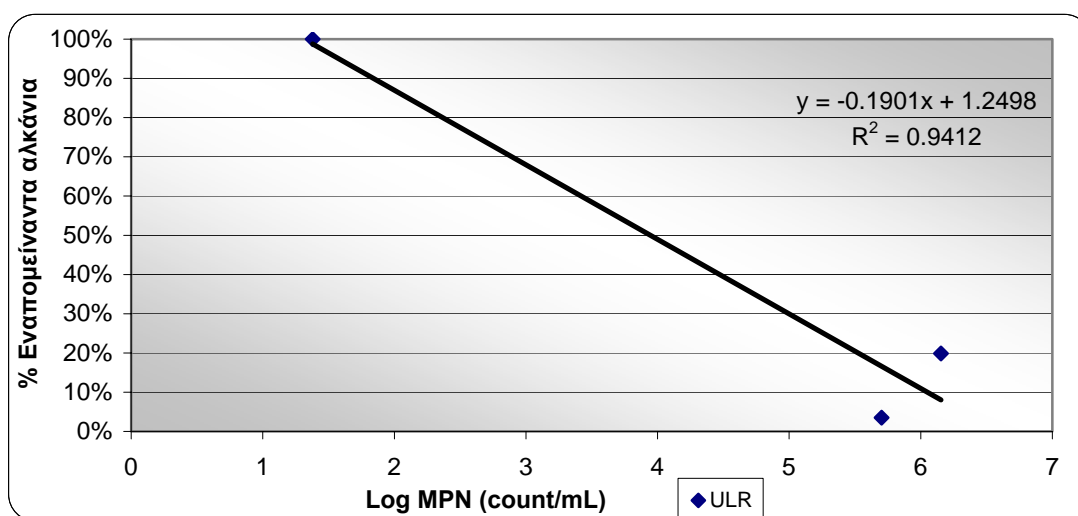
Η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ουρίας-λεκιθίνης-rhamnolipids είναι αλματώδης. Έτσι από τις πρώτες 7 ημέρες παρατηρείται αύξηση 99.99% στην μικροβιακή μάζα με μια μικρή κάμψη στην ανάπτυξη μετά από 11 ημέρες.



Σχήμα 5. 9: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR

Από το γράφημα της απομάκρυνσης των αλκανίων και της μικροβιακής ανάπτυξης στο διάλυμα ουρίας-λεκιθίνης-rhamnolipids παρατηρείται ότι η αλματώδης μικροβιακή ανάπτυξη συνδέεται με τη μεγάλη απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα. Αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ μικροβιακής ανάπτυξης και απομάκρυνσης των αλκανίων στο διάλυμα ουρίας-λεκιθίνης-rhamnolipids φαίνεται

και στο ακόλουθο γράφημα. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί η επιτάχυνση που επιτυγχάνεται στην μικροβιακή ανάπτυξη αλλά και στην απομάκρυνση των αλκανίων με την εφαρμογή στο διάλυμα των rhamnolipids. Η διαδικασία επιταχύνεται σε διάστημα μόλις 7 ημερών όπου με την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος η μικροβιακή ανάπτυξη αναστέλλεται, δηλαδή παρατηρείται μια κορύφωση τόσο στην μικροβιακή ανάπτυξη όσο και στην βιοαποικοδόμηση των αλκανίων μέσα στο διάστημα αυτό.



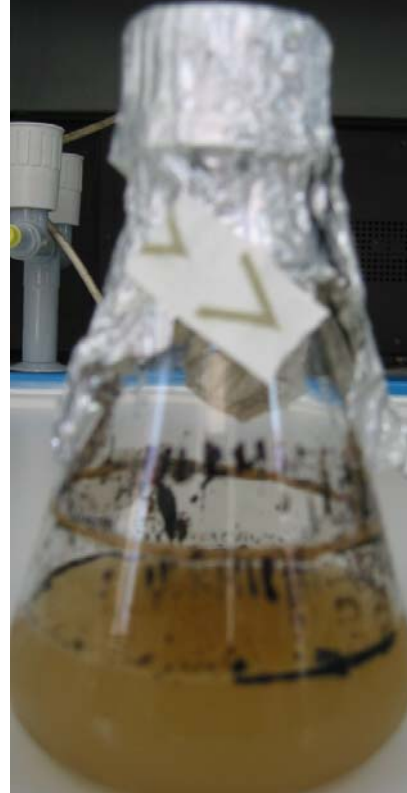



Σχήμα 5. 10: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULR

5.3 Διάλυμα ULRM

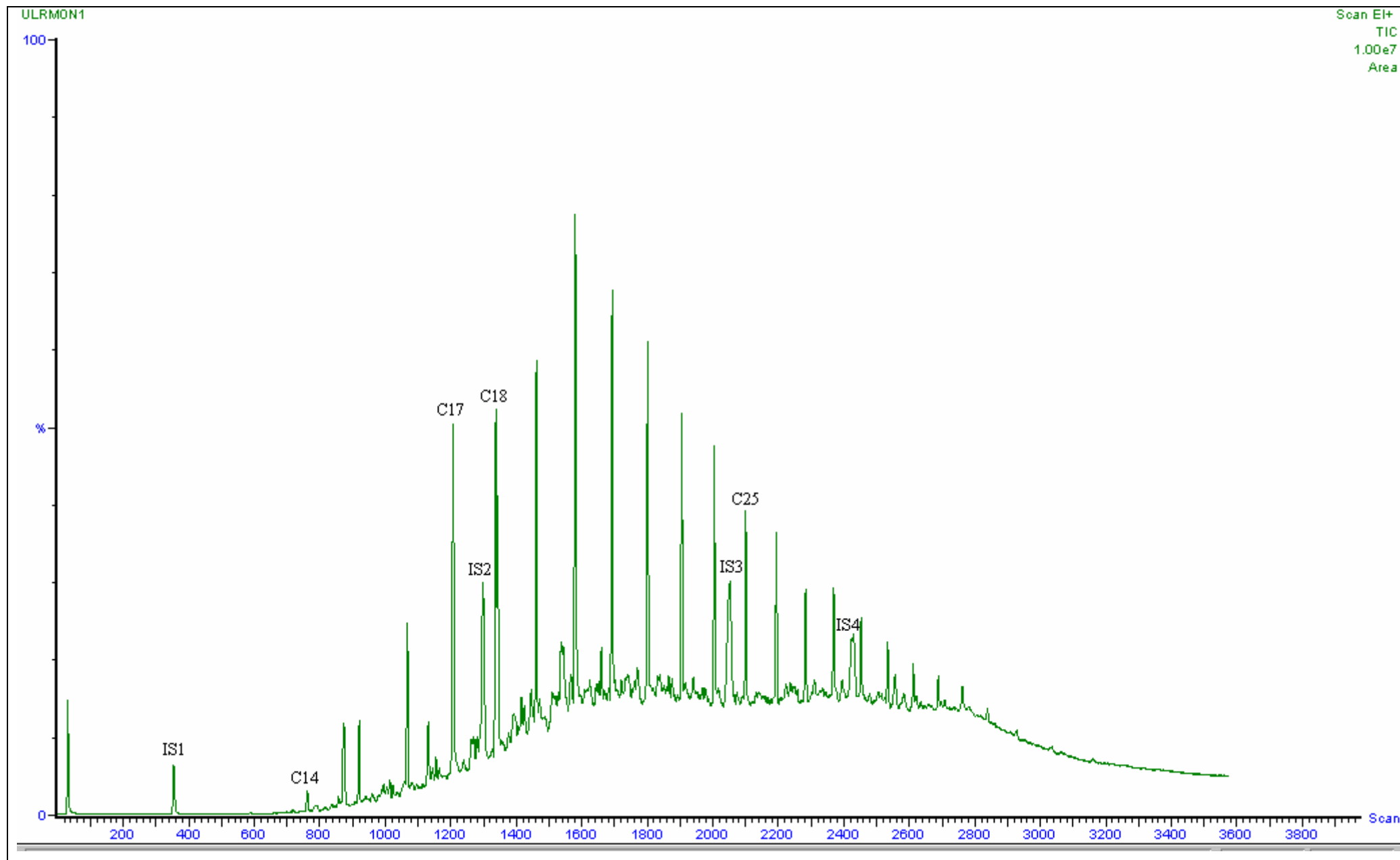
Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε ουρικό οξύ, λεκιθίνη, μελάσα και rhamnolipids.

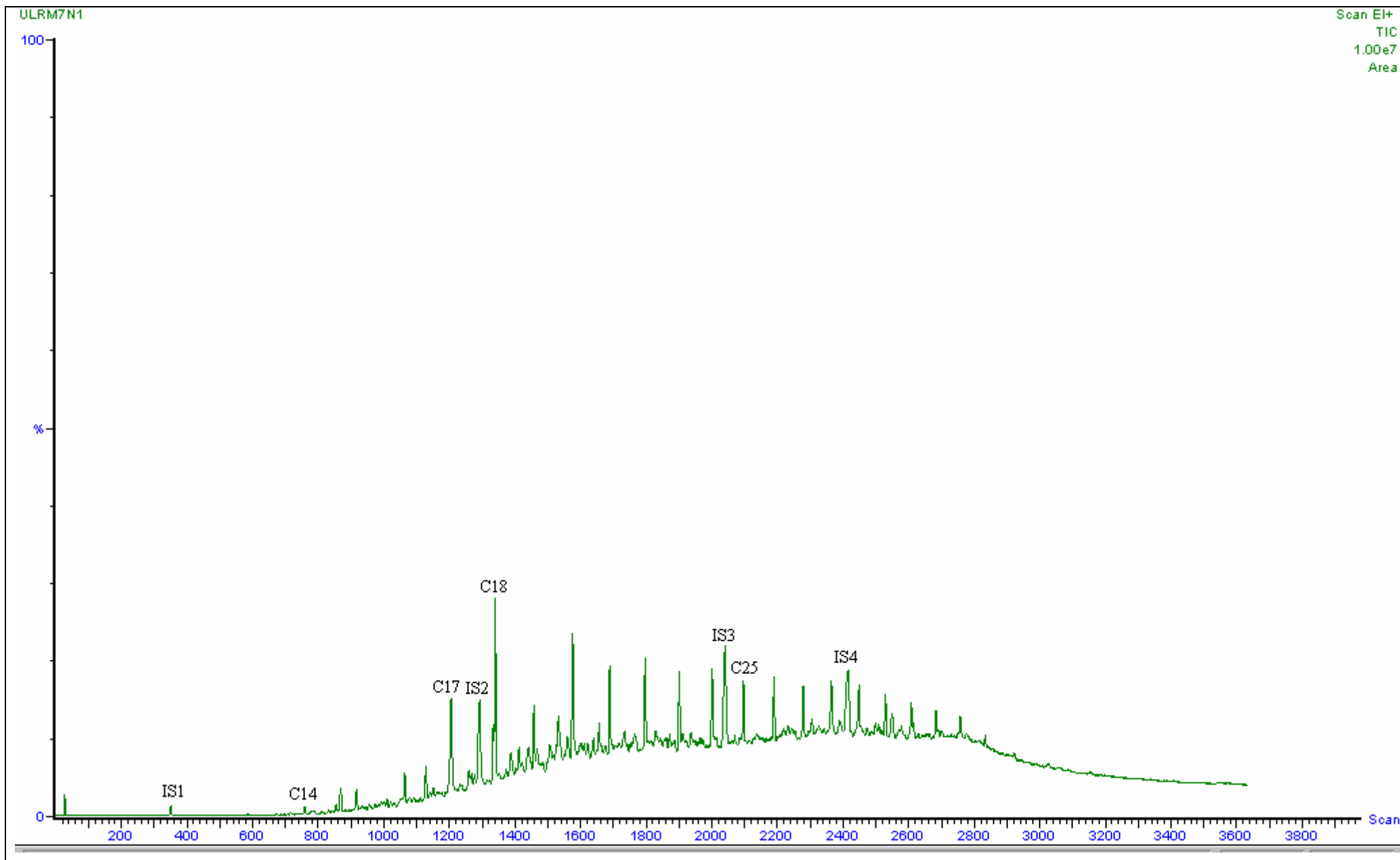
5.5.1 Φυσικές Παρατηρήσεις

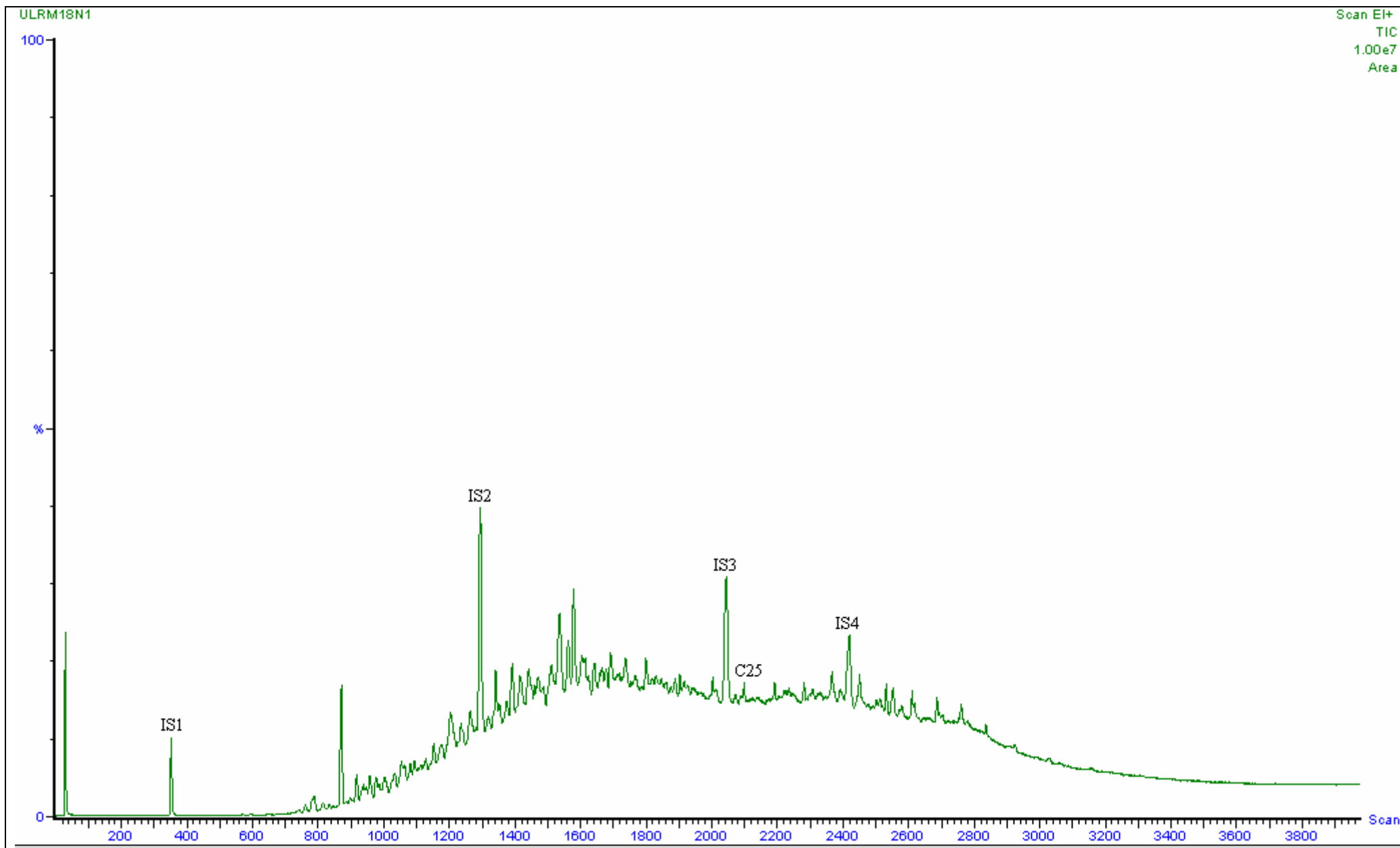
		
		
ULRM0	ULRM7	ULRM18
Υποκίτρινο χρώμα και σε αυτή τη σειρά πειραμάτων παρατηρείται διάσπαση της κηλίδας και διασποράς της στην υδατική φάση και δημιουργία πολύ μικρών συσσωματωμάτων στην επιφάνεια.		

5.5.2 GC-MS Ανάλυση

Ποιοτική σύγκριση των χρωματογραφημάτων







Εικόνα 5.2: Χρωματογραφήματα διαλυμάτων ULRM κατά την 0, 7 και 18 ημέρα δειγματοληψίας

Η προσθήκη μελάσσας στο διάλυμα όπου έγινε συνδυασμένη εφαρμογή ουρικού οξέως, λεκιθίνης και rhamnolipids αποδεικνύει την ευεργετική δράση των συστατικών της μελάσσας όπως είναι τα ιχνοστοιχεία και οι βιταμίνες στην μικροβιακή ανάπτυξη και κατά συνέπεια στην βιοδιάσπαση του πετρελαίου, όπως φαίνεται και από την τάση των παραπάνω χρωματογραφημάτων. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι με την προσθήκη τέτοιας πηγής άνθρακα δεν εμφανίζεται ανταγωνιστική τάση αποικοδόμησης σε σχέση με τους πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες.

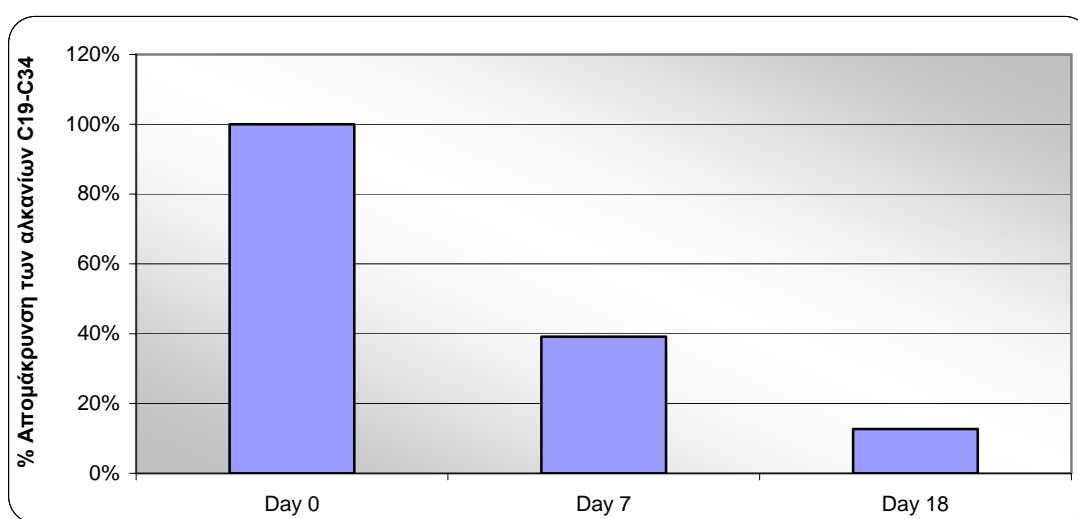
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το GC-MS έδωσε τα εξής:

	Abudance						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	ULRM0#1	ULRM0#2	ULRM7#1	ULRM7#2	ULRM18#1	ULRM18#2	ULRM18#3
C10							
C11							
C12							
C13		33003					
C14	95608	274939		14105			
C15	427507	984419	30898	57719	20122	16545	
C16	1163311	2182311	82474	149732	43046	31013	
C17	3019643	4931421	508016	1252552	186215	181177	
C18	2945564	4232991	284849	186653	105058	88075	
C19	3236897	3744569	339602	403897	120307	136020	
C20	3769184	3568725	486940	469508	183621	276075	
C21	3219170	2788632	401596	373169	141515	219759	19723
C22	2835358	2416050	466039	298172	131291	231166	
C23	2075070	1716830	393250	210312	109574	178000	
C24	1938481	1485985	396323	208464	118185	194611	
C25	1252183	919443	300283	145685	125785	154299	
C26	1111579	757402	301312	123843	95190	145503	
C27	681753	450506	236222	101041	85653	120937	
C28	543236	351430	211743	101563	131746	128032	20624
C29	384351	243596	189597	90779	103482	119841	
C30	249534	188389	141602	77049	92560	110484	15249
C31	167248	107566	113710	70260	78672	110115	19301
C32	118611	69813	80066	55418	62969	90953	30780
C33	72030	55408	57549	43026	47792	73938	29134
C34	46981	30969	33656	27539	29019	76390	13917
C35	25461	22710	20635		15359	53583	
IS							
Chrysene-d12	11661984	11052361	6766513	8379969	10871220	10410778	9564279
Perylene-d12	8904172	7769907	5620884	5302534	7692387	7485628	6823655

Η συγκέντρωση των παραπάνω αλκανίων σε ppm εκφρασμένα σε ng/mg αργού πετρελαίου είναι η ακόλουθη.

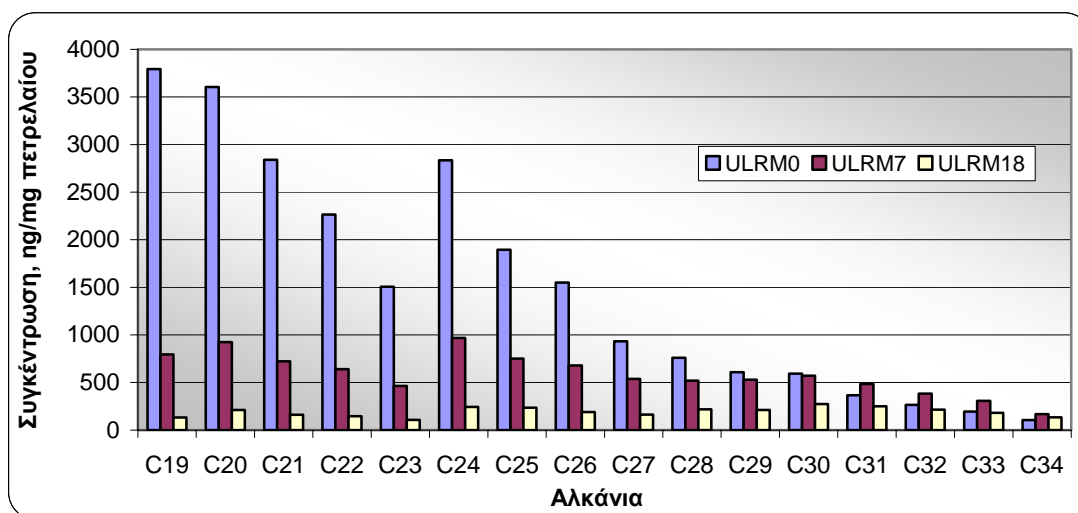
	Συγκέντρωση (ppm, ng/mg αργού πετρελαίου)						
	Day 0		Day 7		Day 18		
	Ετικέτα δείγματος						
Αλκάνια	ULRM0#1	ULRM0#2	ULRM7#1	ULRM7#2	ULRM18#1	ULRM18#2	ULRM18#3
C10							
C11							
C12							
C13		112					
C14	231	804		81			
C15	922	2572	132	295	53	32	
C16	1440	3274	202	439	66	35	
C17	3577	7079	1191	3515	272	193	
C18	3212	5594	615	482	141	87	
C19	3159	4429	656	934	145	120	
C20	3357	3852	858	991	201	222	
C21	2770	2908	684	761	150	170	265
C22	2229	2302	725	555	127	164	
C23	1505	1509	565	361	98	116	
C24	2938	2730	1189	749	221	266	
C25	2005	1784	952	553	248	223	
C26	1699	1403	911	448	179	200	
C27	1036	829	710	364	160	166	
C28	853	669	658	378	255	181	505
C29	689	529	673	386	229	194	
C30	595	591	614	525	293	252	607
C31	397	336	491	477	248	250	765
C32	298	231	366	398	210	219	1291
C33	194	196	282	331	171	190	1310
C34	113	98	147	189	93	176	558
C35	72	85	107		58	145	

	Διάλυμα	Συνολική συγκέντρωση C19-C34 (ppm)	Μέση Τιμή	% Απομάκρυνση
Day 0	ULRM0#1	23837.07	24116.59	
	ULRM0#2	24396.12		
Day 7	ULRM7#1	10482.43	9440.27	61%
	ULRM7#2	8398.10		
Day 18	ULRM18#1	3028.79	3068.32	87%
	ULRM18#2	3107.85		
	ULRM18#3	5301.64		



Σχήμα 5. 11: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 στο διάλυμα ULRM

Όπως φαίνεται και στο γράφημα η απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα (Day 0) είναι σημαντική. Τις πρώτες 7 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση μέχρι και 61% ενώ στις 18 ημέρες επιτυγχάνεται απομάκρυνση 87%. Η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται ακόμα και μέσα στις πρώτες 7 ημέρες είναι εκπληκτική. Σχεδόν το μισό μέρος των αλκανίων απομακρύνεται στις πρώτες 7 ημέρες ενώ το μεγαλύτερο μέρος αυτών απομακρύνεται επιτυχώς στις 18 ημέρες.



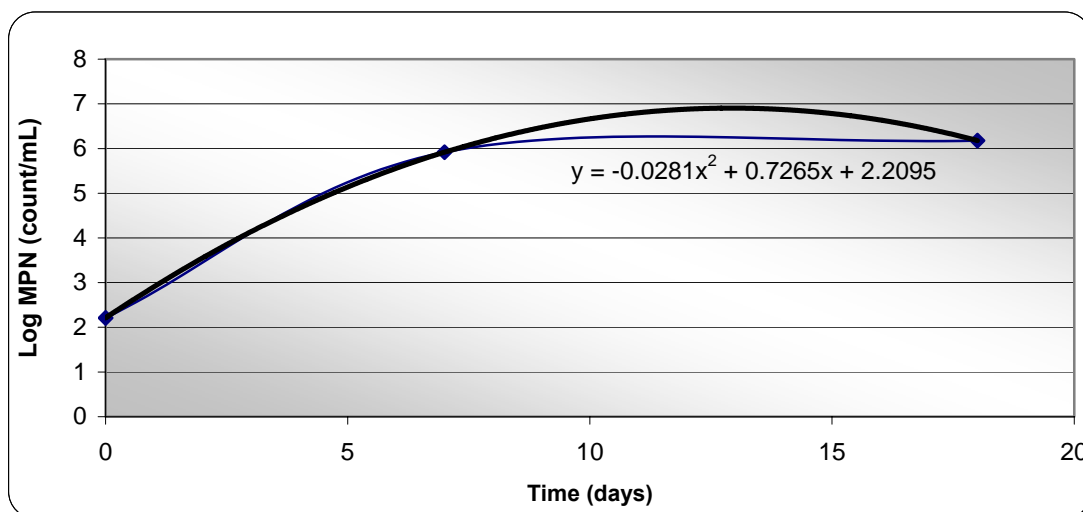
Σχήμα 5. 12: Συγκέντρωση των αλκανίων στο διάλυμα ULRM τις ημέρες 0, 7 και 18

Παρατηρείται από το παραπάνω γράφημα ότι η συγκέντρωση των αλκανίων μικρού μοριακού βάρους από C19-C23 στο διάλυμα ULRM μειώνεται δραστικά από τις πρώτες 7 ημέρες αλλά κυρίως στο ενδιαμέσο διάστημα μεταξύ 7 και 18 ημερών. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ακόμα και τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλκάνια από C24-C32 δεν ανθίστανται στην βιοαποικοδόμηση.

5.5.3 MPN Ανάλυση

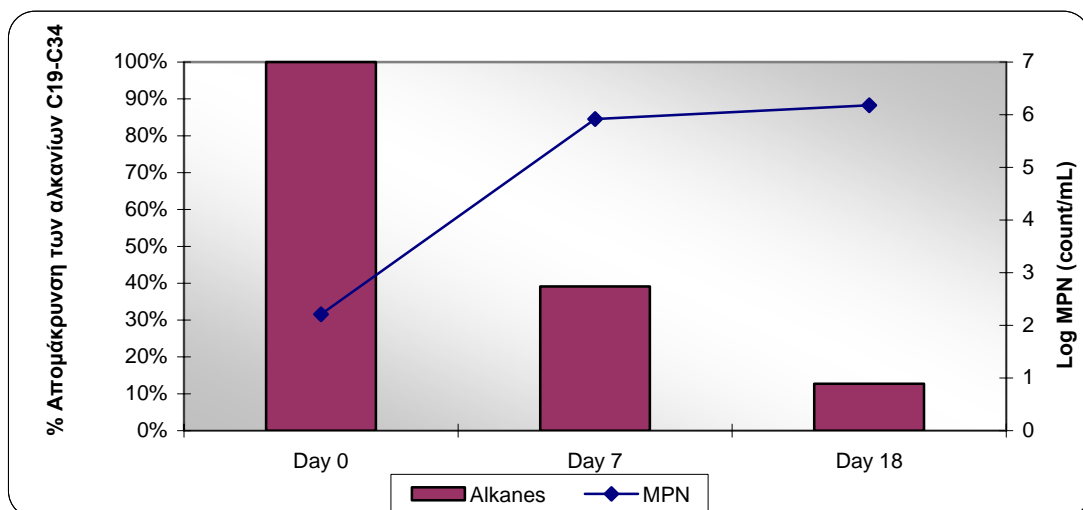
Από την ανάλυση των δειγμάτων στο φύλλο του excel προκύπτει ο συγκεντρωτικός πίνακας:

	Διάλυμα	MPN/mL	Μέση Τιμή
Day 0	ULRM0#1	231.2653	162.0115
	ULRM0#2	9.2758E+01	
Day 7	ULRM7#1	1.4469E+05	8.2732E+05
	ULRM7#2	1.5100E+06	
Day 18	ULRM18#1	1.6777E+06	1.5100E+06
	ULRM18#2	5.0332E+05	
	ULRM18#3	2.3488E+06	



Σχήμα 5. 13: Μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM

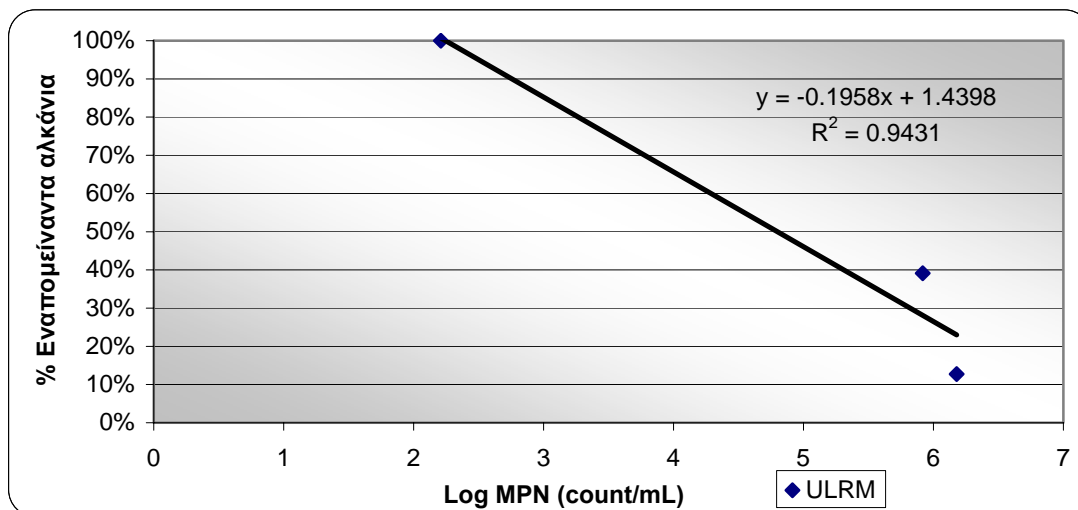
Η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM είναι αλματώδης τις πρώτες 7 ημέρες ενώ τις επόμενες 11 ημέρες παρατηρείται στασιμότητα. Έτσι από τις πρώτες 7 ημέρες παρατηρείται αύξηση 99.98% η οποία παραμένει σταθερή για τις επόμενες 11 ημέρες.



Σχήμα 5. 14: % Απομάκρυνση των αλκανίων C19-C34 και μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM






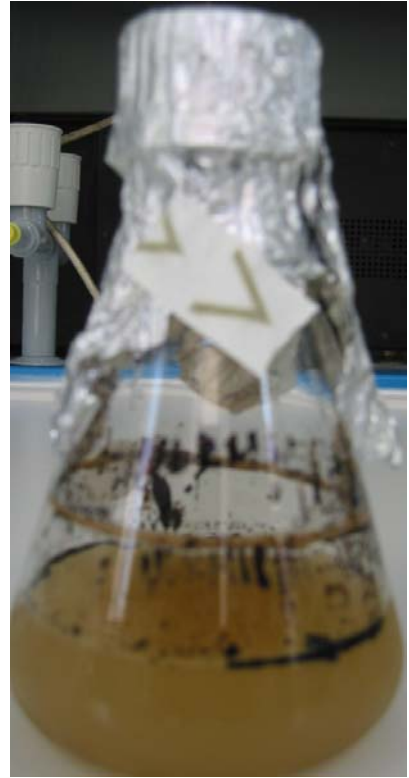
Από το γράφημα τις απομάκρυνσης των αλκανίων και της μικροβιακής ανάπτυξης στο διάλυμα ULRM παρατηρείται ότι η αλματώδης μικροβιακή ανάπτυξη που συμβαίνει τις πρώτες 7 ημέρες δεν συνδέεται με τη μεγάλη απομάκρυνση των αλκανίων από το διάλυμα στις επόμενες 11 ημέρες. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο

γεγονός ότι η παρουσία διαθέσιμου οργανικού άνθρακα στη μελάσα οδηγεί στην κατά προτίμηση χρήση αυτού του άνθρακα ως πηγή τροφής για την μικροβιακή ανάπτυξη αντί του άνθρακα που βρίσκεται στο πετρέλαιο. Ωστόσο υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της μικροβιακής ανάπτυξης και της απομάκρυνσης των αλκανίων στο διάλυμα ULRM όπως φαίνεται και στο ακόλουθο γράφημα.



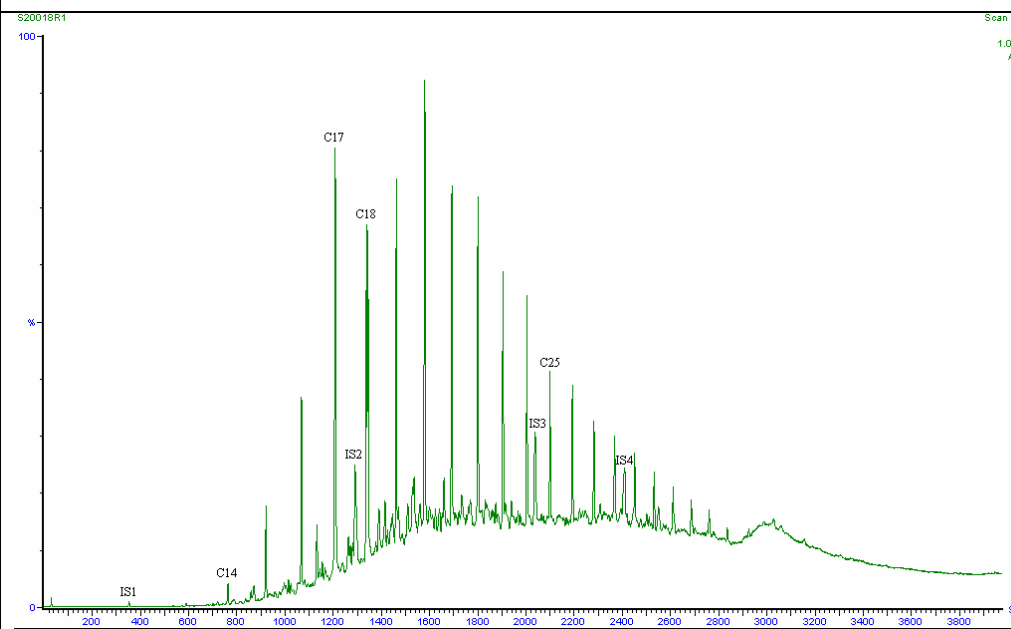
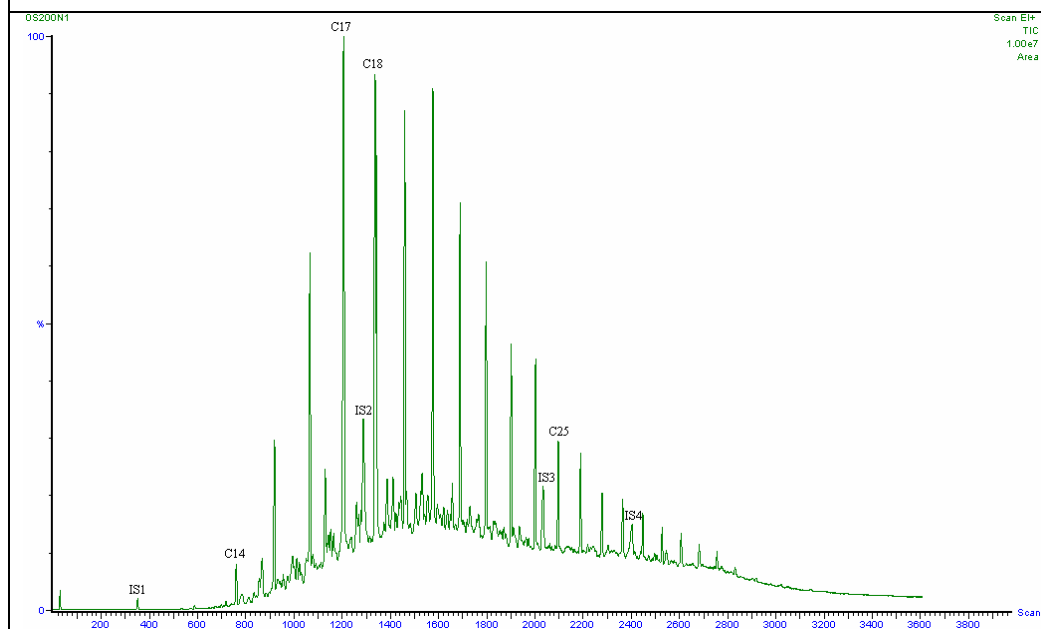
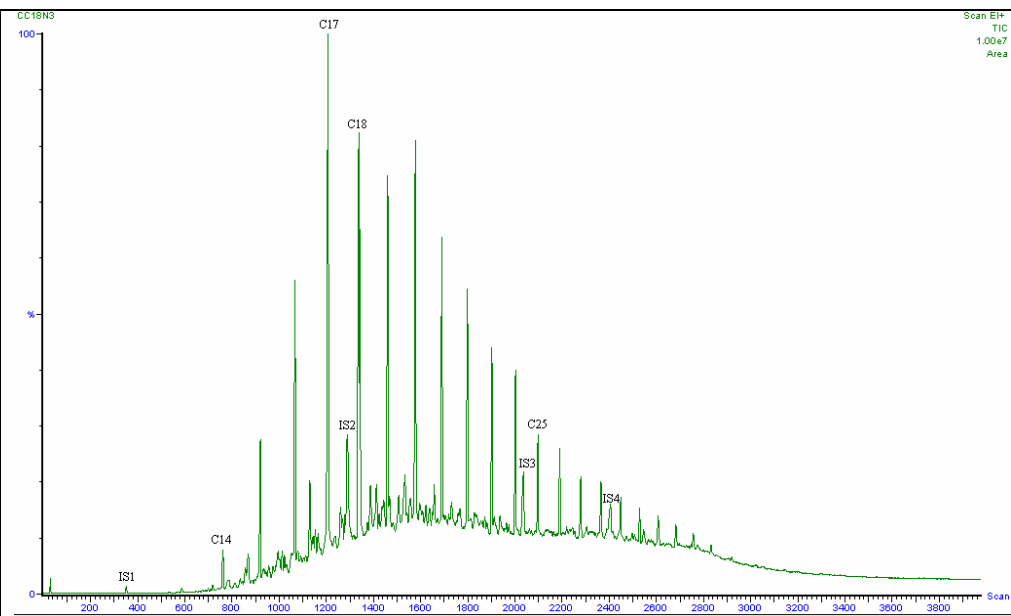
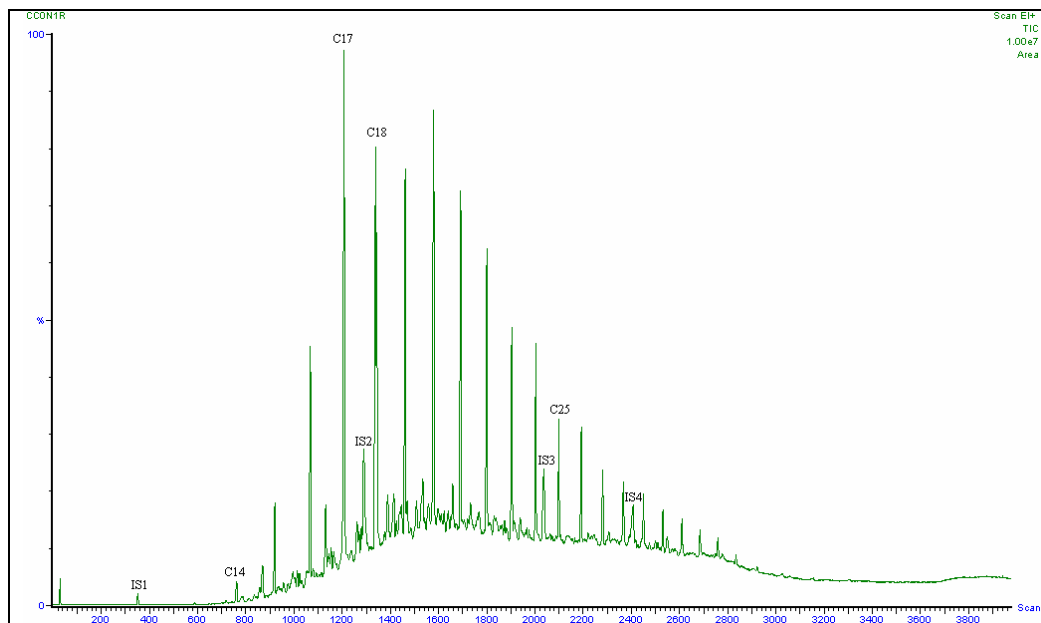
Σχήμα 5. 15: Συσχέτιση βαθμού αποικοδόμησης αλκανίων με την μικροβιακή ανάπτυξη στο διάλυμα ULRM

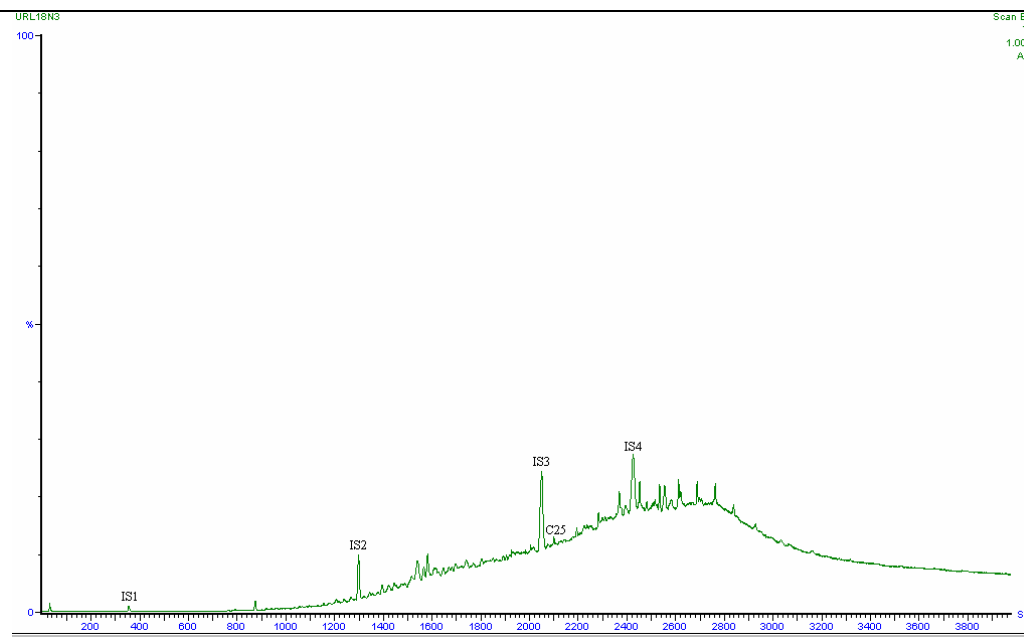
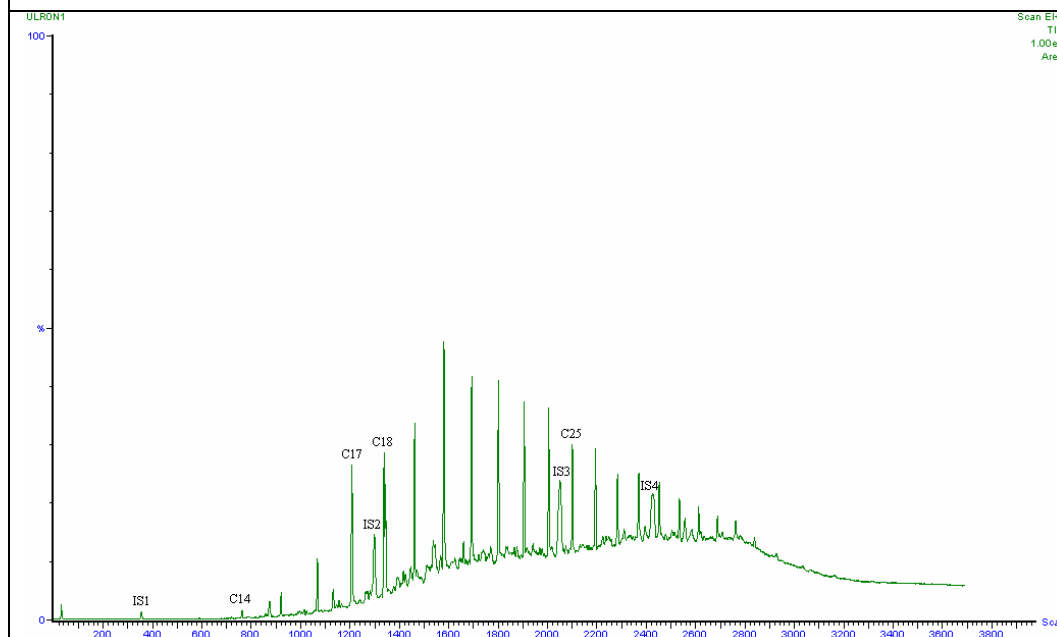
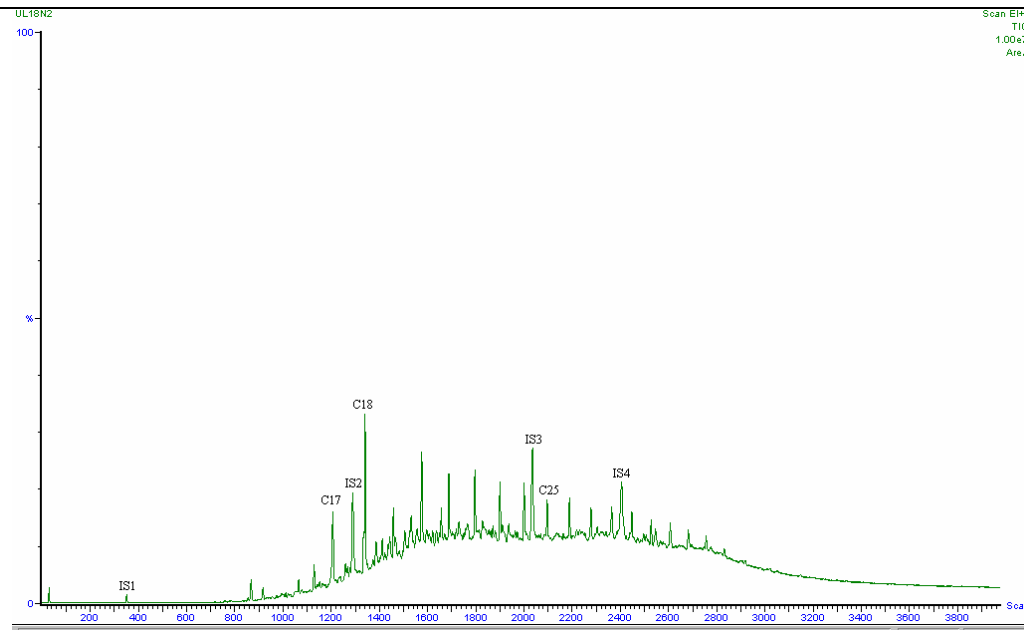
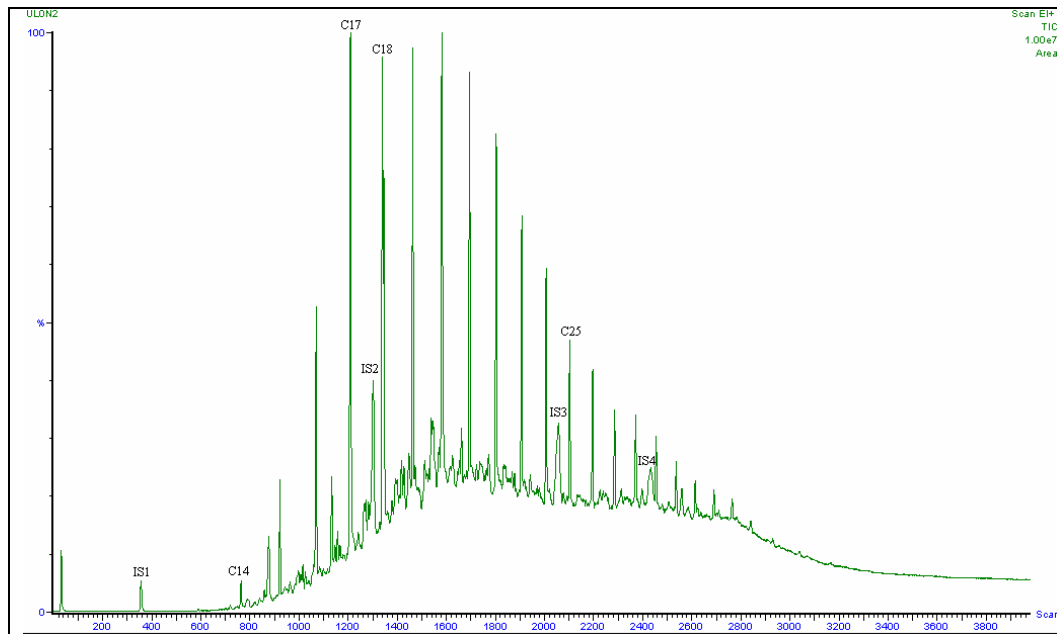
6 Συγκριτικά Αποτελέσματα-Συνολικά Συμπεράσματα

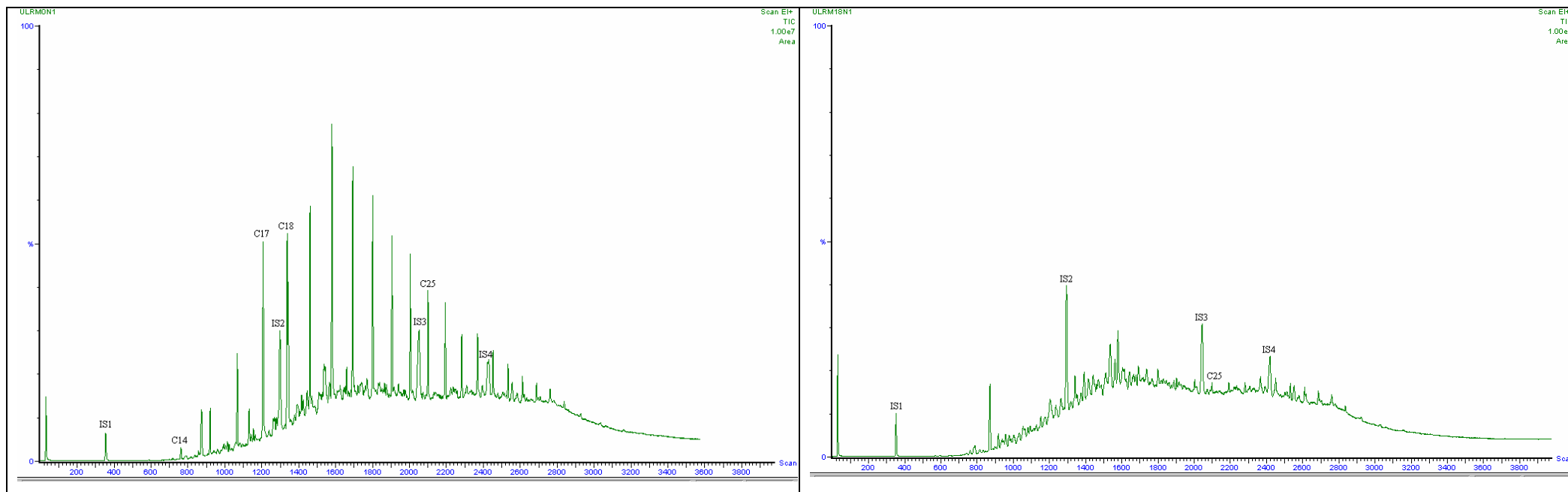
		
CC0	CC18	S20018
		
UL18	ULR18	ULRM18

Σε ότι αφορά τις φυσικές μεταβολές που παρατηρούνται στα εξεταζόμενα διαλύματα πρέπει να σημειωθεί ότι σε όποιο διάλυμα εφαρμόστηκε λεκιθίνη η πετρελαιοκηλίδα διαλύθηκε αμέσως εν αντιθέσει με τον παράγοντα βιοεξυγίανσης S200 όπου προκάλεσε την διασπορά της πετρελαιοκηλίδας σε πολύ μικρά σταγονίδια (μικκύλια) χωρίς ωστόσο αυτή η διασπορά να επιφέρει κάποια ορατή μεταβολή στη σύσταση του πετρελαίου. Επίσης είναι χαρακτηριστική η διάλυση αλλά και η αποικοδόμηση του πετρελαίου που λαμβάνει χώρα στα διαλύματα όπου προστέθηκε η επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης (rhamnolipids). Ύστερα από διάστημα 18 ημερών η μείωση στην ποσότητα του πετρελαίου ήταν ευδιάκριτη, το εναπομείναν πετρέλαιο ήταν σε μορφή διεσπαρμένων σταγονιδίων και το διάλυμα είχε αποκτήσει υποκίτρινο χρώμα χαρακτηριστικό της παρουσίας των rhamnolipids.

Επίσης εν αντιθέσει με τα διαλύματα όπου προστέθηκε κάποια θρεπτική ουσία ή παράγοντας βιοεξυγίανσης, στα διαλύματα ελέγχου (μάρτυρα) παρατηρείται η δημιουργία μπάλας πίσσας ακόμα και σε αυτά της 0 ημέρας. Έτσι λοιπόν αναγνωρίζεται η επιφανειοδραστική δράση τόσο της λεκιθίνης όσο και των rhamnolipids.







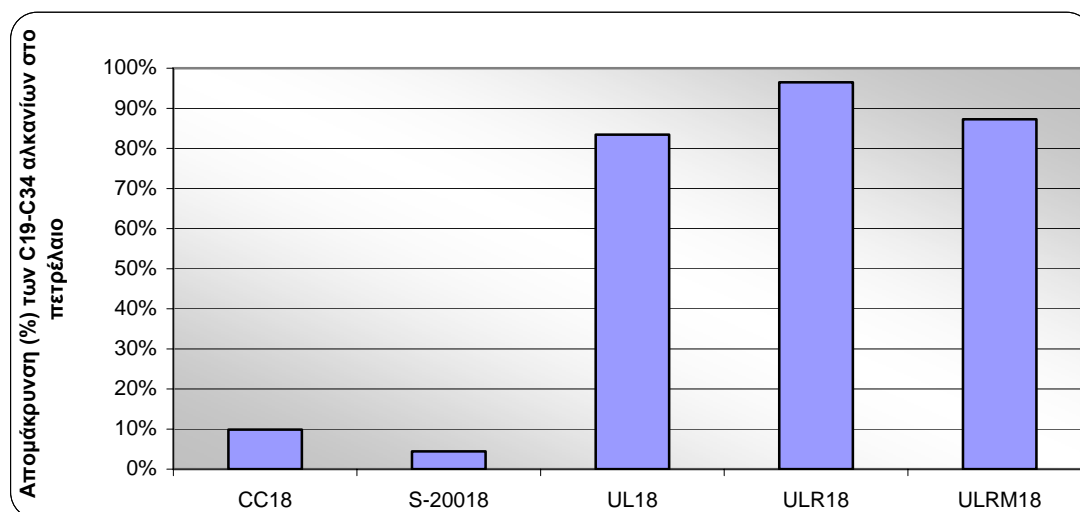
Εικόνα 6.1: Συγκεντρωτικά χρωματογραφήματα των 0 και 18 ημερών για όλα τα εξεταζόμενα διαλύματα (Control, S200, UL, ULR και ULRM)

Αυτό που παρατηρεί κανείς βλέποντας την τάση των χρωματογραφημάτων για τα εξεταζόμενα διαλύματα είναι ότι τελικά τα λιπόφιλα θρεπτικά συστατικά ενισχύουν την βιοδιέγερση καθώς επίσης και ότι η εφαρμογή επιφανειδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης επιταχύνει την διαδικασία βιοαποικοδόμησης άμεσα. Επίσης διακρίνεται και η ευεργετική και ενισχυτική δράση της προσθήκης μελάσας στο διάλυμα. Είναι αξιοσημείωτη και εμφανής η μείωση που επιτυγχάνεται με τους τρεις τελευταίους συνδυασμούς (UL, ULR και ULRM) στους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου σε διάστημα μόλις 18 ημερών.

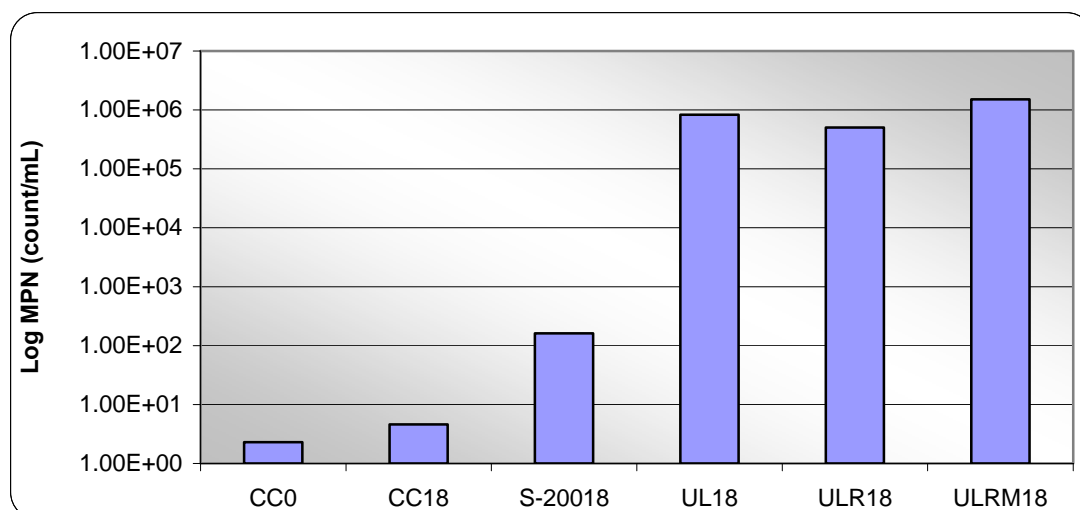
Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα παραπάνω διαλύματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Διάλυμα	MPN/mL		% Απομάκρυνση	
	Day 7	Day 18	Day 7	Day 18
CC	3.6557	4.6235	7%	10%
S200	2.3364E+03	8.7677E+02	5%	4%
UL	1.8993E+04	8.2732E+05	28%	83%
ULR	1.4261E+06	5.0332E+05	80%	96%
ULRM	8.2732E+05	1.5100E+06	61%	87%

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα πιο πάνω αποτελέσματα.



Σχήμα 6. 1: Απομάκρυνση (%) των C19-C34 αλκανίων μετά από 18 μέρες σε όλα τα διαλύματα



Σχήμα 6. 2: Μικροβιακή ανάπτυξη μετά από 18 μέρες σε όλα τα διαλύματα

Παρατηρώντας λοιπόν τα γραφήματα τόσο της απομάκρυνσης των αλκανίων όσο και της μικροβιακής ανάπτυξης σε όλα τα διαλύματα που εξετάστηκαν, μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι ο συνδυασμός που δούλεψε και άμεσα και αποτελεσματικά είναι ο **ULR**. Δηλαδή ο συνδυασμός ουρικού οξέος, λεκιθίνης και rhamnolipids (biosurfactants). Οι συνδυασμοί που ξεχώρισαν με τις μεγαλύτερες απομακρύνσεις αλκανίων ήταν οι **UL**, **ULR**, και **ULRM**, με αντίστοιχες τελικές απομακρύνσεις αλκανίων 83%, 96% και 87%, με την μεγαλύτερη απομάκρυνση (96%) να επιτυγχάνεται όπως ήδη αναφέρθηκε με τον συνδυασμό **ULR**.

Ο εμπορικός παράγοντας βιοεξυγίανσης S200 τελικά δεν έδειξε ότι μπορεί να αποικοδομήσει αποτελεσματικά το πετρέλαιο ούτε μπορεί να ενισχύσει ουσιαστικά την ανάπτυξη μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομήσουν τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου στην συγκεκριμένη μελέτη. Εν αντιπαράθεση με τα όσα υποστηρίζουν οι κατασκευαστές του προϊόντος αυτού ύστερα μάλιστα από την επιτυχή εφαρμογή του στο ατύχημα με το Prestige στις ακτές της Ισπανίας.

Αξίζει να επισημανθεί η σχεδόν μηδενική απομάκρυνση αλκανίων από το διάλυμα έλεγχου (μάρτυρα), πράγμα το οποίο δείχνει το μικρό επίπεδο σε θρεπτικά και τον αργό ρυθμό διάσπασης του πετρελαίου από τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς.

Η μορφή των χρωματογραφημάτων μετά από 7 και 18 ημέρες δείχνει ότι η βιοαποικοδόμηση τόσο στους χαρακτηρισμένους (resolved) όσο και στους μη χαρακτηρισμένους (unresolved) υδρογονάνθρακες των διαλυμάτων που περιείχαν θρεπτικά είναι πιο εκτενής σε σχέση με αυτήν του διαλύματος ελέγχου (μάρτυρα).

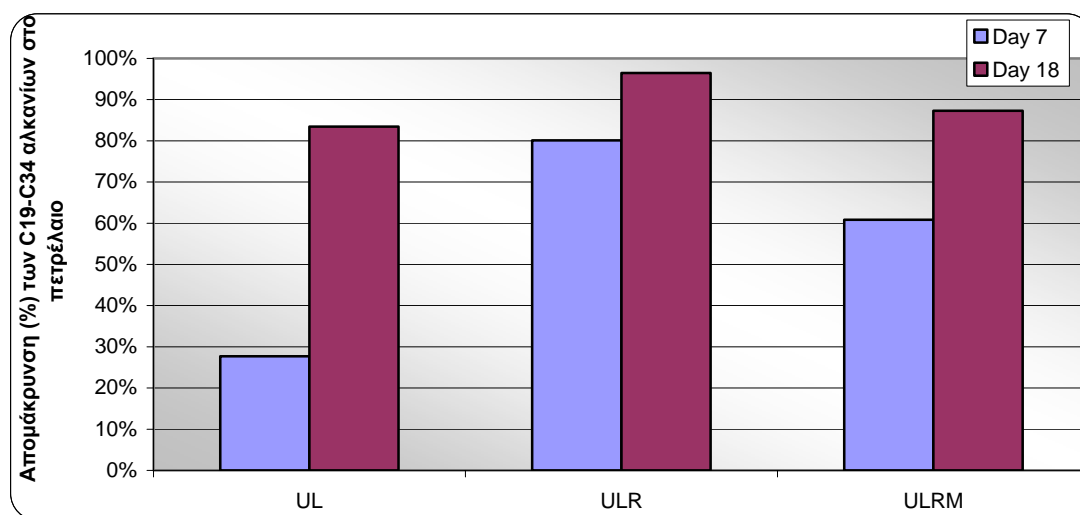
Ωστόσο το μεγαλύτερο μέρος του αργού πετρελαίου χρησιμοποιήθηκε πλήρως μετά από επεξεργασία 18 ημερών.

Η χρήση του αργού πετρελαίου αποδεικνύεται από την αύξηση των ζωντανών κυττάρων καθώς επίσης και από την αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης στα διαλύματα με θρεπτικά.

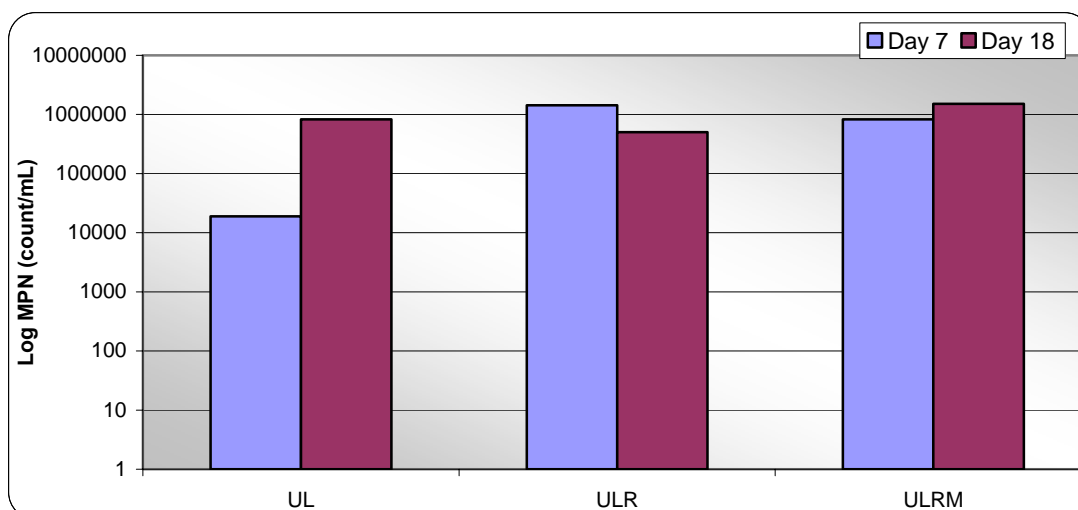
Η εφαρμογή επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) είχε ως αποτέλεσμα τόσο τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών όσο και την απομάκρυνση των υδρογονανθράκων. Αυτό ίσως συμβαίνει επειδή οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης έχουν την ικανότητα να διασπείρουν το πετρέλαιο δημιουργώντας ταυτόχρονα ένα προστατευτικό φιλμ για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κάνοντας το έτσι πιο διαθέσιμο προς αυτούς για αποικοδόμηση.

Η εφαρμογή θρεπτικών υλικών ενίσχυσε τους μικροβιακούς αποδομητές υδρογονανθράκων όπως εκτιμήθηκε βάσει της MPN τεχνικής κατά 10^5 σε σχέση με τον αρχικό αριθμό που υπήρχε στο φυσικό θαλασσινό νερό καθώς επίσης αύξησε την αποικοδόμηση των αλκανίων κατά 8-10 φορές σε σχέση με το διάλυμα ελέγχου (μάρτυρα).

Η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να συσχετιστεί με την απομάκρυνση συστατικών του πετρελαίου από το διάλυμα.



Σχήμα 6. 3: Απομάκρυνση (%) των C19-C34 αλκανίων κατα στην 7η και 18η ημέρα δειγματοληψίας στα UL, ULR και ULRM διαλύματα



Σχήμα 6. 4: Μικροβιακή ανάπτυξη την 7η και 18η μέρα για τα UL, ULR και ULRM διαλύματα

Ειδικότερα για τους συνδυασμούς που δούλεψαν καλύτερα έχουμε ότι:

Η επιλογή της χρήσης των Rhamnolipids (biosurfactants) επιτάχυνε την βιοαποικοδόμηση των συστατικών του πετρελαίου από τις 7 κιόλας πρώτες μέρες (80%) έναντι των υπολοίπων συνδυασμών UL (28%) και ULRM (61%).

Σε ότι αφορά την εφαρμογή μελάσας, διαπιστώνετε ότι η απομάκρυνση των αλκανίων ήταν υψηλότερη από αυτή του συνδυασμού ουρικού οξέος-λεκιθίνης (UL), δείχνοντας έτσι ότι η προσθήκη οργανικού άνθρακα μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να ενισχύσει την αποικοδόμηση πετρελαιοκηλίδων.

Οι μελάσες κατέχουν μια πιο πολύπλοκη πηγή άνθρακα σε σχέση με τα rhamnolipids και στην παρούσα μελέτη αυτό είχε ως αποτέλεσμα μια καθυστέρηση στην αποικοδόμηση του πετρελαίου. Ωστόσο με βάση άλλες μελέτες έχει διαπιστωθεί η επιλεκτική αποικοδόμηση οργανικών συστατικών που περιέχονται σε οργανικά θρεπτικά υλικά (Inipol EAP22) έναντι των υδρογονανθράκων του πετρελαίου και ίσως αυτό να συμβαίνει και στην περίπτωση της μελάσας.

Συνοψίζοντας η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η εφαρμογή επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (Rhamnolipids, Λεκιθίνη) και μελάσας, οι οποίοι αποτελούν μια άμεσα διαθέσιμη πηγή άνθρακα, ενίσχυσε σημαντικά το μέγεθος του πληθυσμού των μικροβιακών βιοαποδομητών υδρογονανθράκων υπό εργαστηριακές συνθήκες. Έτσι λοιπόν οδήγησε και σε αυξημένη απομάκρυνση των υδρογονανθράκων του πετρελαίου.

Πράγματι ο συνδυασμός λιπόφιλων θρεπτικών όπως είναι το ουρικό οξύ και η λεκιθίνη μαζί με επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (Rhamnolipids) αναγνωρίζεται ως πρόοδος στην αποικοδόμηση πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.

Επιπλέον θα πρέπει να αναγνωριστεί η πιθανή χρησιμοποίηση των αποβλήτων (όπως είναι το ουρικό οξύ και η λεκιθίνη) από ορνιθοτροφεία για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων αφού αποτελούν φθηνά, φυσικά και εύκολα βιοδιασπάσιμα θρεπτικά υλικά.

Περαιτέρω λοιπόν έρευνα απαιτείται όχι μόνο σε επίπεδο ποσότητας, τρόπου και μορφής των εφαρμοζόμενων θρεπτικών αλλά και σε επίπεδο εφαρμοζόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών (είδος ακτής, δράση κυμάτων). Ιδιαίτερη δε βάση θα πρέπει να δοθεί στην εφαρμογή πραγματικών «δειγμάτων», δηλαδή χρήση των αποβλήτων που περιέχουν αυτές τις πηγές θρεπτικών (ουρικό οξύ και λεκιθίνη) όπως ανεφέρθη προηγουμένως στην αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων στο πεδίο (Μελέτες μεσόκοσμου αρχικά και ύστερα μελέτες στο πεδίο) και σε συνθήκες ανοιχτής θαλάσσης όπου λίγα μέχρι τώρα έχουν γίνει και είναι γνωστά.

Τελειώνοντας θα θέλα να επιστήσω την προσοχή σας σε αυτήν την νέα σχετικά και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία βιοεξυγίανσης, η οποία μελετήθηκε και αναπτύχθηκε παραπέρα στην παρούσα εργασία, λέγοντας ότι η πρόοδος των τελευταίων χρόνων την καθιστά μια πρωτοποριακή μέθοδο αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων που μπορεί να ανταγωνιστεί με τις ενίοτε συμβατικές μεθόδους. Έτσι από δευτερεύουσα τεχνολογία αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων υπόσχεται να πάρει τα σκήπτρα και να εξελιχθεί σε μια πρώτης επιλογής μέθοδο αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] National Academy of Sciences (1985). *Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects*, National Academy Press, Washington DC.
- [2] International Petroleum Industry Environmental Conservation Association (2000). *A guide to contingency planning for oil spills on water*, IPIECA REPORT SERIES, vol 2, 2nd edition.
- [3] Santas R., Korda A., Tenente A., Buchholzi K. and Santas Ph. (1999). Mesocosm Assays of Oil Spill Bioremediation with Oleophilic Fertilizers: Inipol, F1 or Both? *Marine Pollution Bulletin*, 38 (1), 44-48
- [4] The International Tanker Owners Pollution Federation Ltd (2005). Oil tanker spill statistics:2004, Last reviewed: <http://www.itopf.com/stats.html>
- [5] Spies R.B., Rice S.D., Wolfe D.A. and Wright B.A. (1996). The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment, *Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium*, American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp1-16.
- [6] NOAA (1992). *Shoreline Countermeasure Manual*, National Oceanic & Atmospheric Administration, Seattle, Washington.
- [7] NOAA and API (1994). *Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response*, National Oceanic & Atmospheric Administration and American Petroleum Institute.
- [8] U.S. EPA (1999a). *Understanding oil spills and oil spill response*, EPA 540-K-99-007, Office of Emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency.
- [9] Doerffer, J.W. (1992). *Oil Spill Response in the Marine Environment*, Pergamon Press, Oxford, U.K.
- [10] Lessar R.R. and Demarco G. (2000). The significance of oil spill dispersants. *Spill Science & Technology Bulletin*, 6(1), 59-68.
- [11] Office of Technology Assessment (1990). *Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies*, OTA-BP-O-63, Washington, DC.
- [12] Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J. and Atlas R.M. (1994). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, **368**, 413-418.

- [13] Prince, R. C., Clark, J.R., Lindstrom, J.E., Butler, E.L., Brown, E.J., Winter, G., Grossman, M.J., Parrish, P.R., Bare, R.E., Braddock, J.F., Steinhauer, W.G., Douglas, G.S., Kennedy, J.M., Barter, P.J., Bragg, J.R., Harner, E.J., and Atlas, R. M. (1994). Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy. In: R.E. Hinchey *et al.*(Eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp107-124.
- [14] Office of Technology Assessment (1991). *Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies*, OTA-BP-O-70, Washington, DC.
- [15] Atlas, R. M. (1984). *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York.
- [16] Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180-209.
- [17] Prince, R.C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.* 19, 217-242.
- [18] Swannell, R.P.J., Lee, K., and Mcdonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342-365.
- [19] Lee, K., Lunel, T., Wood, P., Swannell, R., and Stoffyn-Egli, P. (1997a). Shoreline cleanup by acceleration of clay-oil flocculation processes. *Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 235-240.
- [20] Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L, King, D.W., and Holder, E. (1996). Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology*, 30, 1764-1775.
- [21] Atlas, R. M., and Cerniglia, C. E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants. *Bioscience*, 45, 332-338.
- [22] Mearns, A. J. (1997). Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. *Spill Science & Technology Bulletin*, 4(4), 209-217.
- [23] Venosa, A.D. (1998). Oil spill bioremediation on coastal shorelines: a critique. In: S.K. Sikdar & R.I. Irvine(Eds.), *Bioremediation: Principles and Practice*. Vol. III. *Bioremediation Technologies*. Technomic, Lancaster, PA, 259-301.

- [24] Clark, R. C. and Brown, D. W. (1977). Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems. In Malins (Ed) *Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum*. Academic Press, Inc., New York, 1-89.
- [25] Jokuty, P., Whiticar, S.P., Wang, Z., Fingas, M., Lambert, P., Fieldhouse, B., and Mullin, J. (2000). *A Catalogue of Crude Oil and Oil Product Properties*. Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, ON. http://www.etcentre.org/spills/oil_intr.html.
- [26] Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3), 305-315.
- [27] Jordan, R.E. and Payne, J.R. (1980). *Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment*. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, MI.
- [28] <http://www.sintef.no>
- [29] Nicodem, D.E., Fernandes, M.C., Guedes, C.L.B., Correa, R.J. (1997). Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. *Biogeochemistry*, 39, 121-138.
- [30] Bragg, J.R. and Owens, E.H. (1995). Shoreline cleansing by interactions between oil and fine mineral particles. *Proceedings of 1995 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 216-227.
- [31] Lee, K., Tremblay, G.H., and Gauthier, J., Cobanli, S.E., Griffin, M. (1997b). Bioaugmentation and biostimulation: a paradox between laboratory and field results. *Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 697-705.
- [32] Lee, K., Weise, A.M., St. Pierre, S. (1997c). Enhanced oil biodegradation with mineral fine interaction. *Spill Science & Technology Bulletin*, 3(4), 263-267
- [33] Hayes, M.O., Michel, J., Dahlin, J.A., Barton, L.K. (1995). Identifying and mapping sensitive resources for inland area planning. *Proceedings of 1995 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 365-371.
- [34] Hayes, M.O., Michel, J., Montello, T.M. (1997). The reach sensitivity index(RSI) for mapping rivers and streams. *Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 343-350.

- [35] Zobell, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.
- [36] Zobell, C.E. (1973). Microbial degradation of oil: Present statue, problems, and perspectives. In Ahearn and Meyers (Eds.), *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*, Publication No. LSU-SG-73-01, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, 3-16.
- [37] Foght, J.M. and Westlake, D.W.S. (1987). Biodegradation of hydrocarbons in freshwater. In: Vandermeulen and Hruday (Ed), *Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology*. Pergamon Press, New York, 217-230.
- [38] Floodgate, G (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 355-398.
- [39] Cooney, J.J. (1984). The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 355-398
- [40] Karrick, N.L. (1977). Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. In Malins (Ed) *Effects of Petroleum on Arctic and Subartic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum*. Academic Press, Inc., New York, 225-299.
- [41] Cerniglia, C.E., (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- [42] Watkinson, R.J., and Morgon, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms, *Biodegradation*, 1, 79-92.
- [43] Haines J. R. and M. Alexander (1974). Microbial degradation of high molecular weight alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 28, 1084-1085.
- [44] Atlas, R.M. (1995b). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 178-182.
- [45] Atlas, R.M. and Bartha R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In K.C. Marshall (ed.), *Advances in Microbial Ecology, Vol. 12*, Plenum Press, NY, 287-338.
- [46] Singer M.E. and Finnerty, W.R. (1984). Microbial metabolism of strat-chain and branched alkanes. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 1-60.

- [47] Bossert, I. And Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 435-476.
- [48] Head, I.M. and Swannell, R.P.J. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 234-239.
- [49] Krumholz, L.R., Caldwell, M.E., Suflita, J.M. (1996). Biodegradation of 'BTEX' hydrocarbons under anaerobic conditions. In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), *Bioremediation: principles and Applications*, Cambridge University Press, UK, 61-99.
- [50] Caldwell, M.E., Garrett, R.M., Prince, R.C., Suflita, J.M. (1998) Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2191-2195.
- [51] Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philip, P., Lovley, D.R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbour sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3589-3593.
- [52] Rosenberg, E. and Ron, E.Z (1996). Bioremediation of petroleum contamination, In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), *Bioremediation: principles and Applications*, Cambridge University Press, UK, 100-124.
- [53] Dibble, J.T., and Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 729-739.
- [54] Ward, D.M., and Brock, T.D. (1978). Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 353-359.
- [55] Kingsley Urum, Turgay Pekdemir. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing *Chemosphere* 57, 1139–1150
- [56] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495–508.
- [57] Moran, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., Sineriz, F. (2000). Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation* 11, 65–71.

- [58] Parra, J., Guinea, J., Manresa, M., Robert, M., Mercade, Comellas, F., Bosch, M., 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *JOACS* 66, 141–145.
- [59] Desai, J., Desai, A., (1993). Production of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactants*, first ed., Production Properties Applications, vol. 48. Marcel Dekker, New York, NY, 65–97.
- [60] Nabholz, J.V., Miller, P., Zeeman, M., (1993). Environmental risk assessment of new chemicals under the Toxic Substances Control Act (TSCA). In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds.), *Section Five: Environmental Toxicology and Risk Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 40–55. ASTM STP 1179.
- [61] Harvey S, Elashvilli I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty AM (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology* 8: 228-230
- [62] Tumeo M, Bradock J, Venator T, Rog S, Owens D (1994). Effectiveness of a biosurfactant in removing weathered crude oil from subsurface beach material. *Spill Sci Technol Bull* 1: 53-59
- [63] Shafeeq M, Kokub D, Khalid ZM, Khan AM, Malik KA (1989). Degradation of different hydrocarbon and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. *J Appl Microbiol Biotechnol* 5: 505-510
- [64] Van Dyke MI, Couture P, Brauer M, Lee H, Trevors JT (1993a). *P. aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants. Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol* 39: 1071-1080
- [65] Gutnick DL, Rosenberg E (1977). Oil tankers and pollution. A microbiological approach. *Annu Rev Microbiol* 31: 379-396
- [66] Atlas RM (1991). Microbial hydrocarbon degradation. *Bioremediation of oil spills*. *J. Chem Tech Biotechnol* 52: 149-156
- [67] Douglas, G.S., Prince, R.C., Butler, E.L., and Steinhauer, W.G. (1994). The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extent of biodegradation. In R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppel, and R.N. Miller (eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 219-236.

- [68] Peters, J. and Moldowan, J.M. (1993). *The Biomarker Guide. Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- [69] Prince, R. C., Elmendorf, D. L., Lute, J. R., Hsu, C. S., Haith, C. E., Senius, J. D., Dechert, G.J., Douglas, G. S, and Butler, E. L. (1994). 17 α (H), 21 β (H)-Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental Science and Technology*, 28, 142-145.
- [70] Elmendorf, D.L., Haith, C.E., Douglas, G.S., and Prince, R.C. (1994). Relative rates of biodegradation of substituted polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R.E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, S.K. Ong, (eds.), *Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*, Lewis Publishers, Ann Arbor, MI, 188-202.
- [71] Smith, V.H., Graham D.W., Cleland, D.D. (1998). Application of resource ratio theory to hydrocarbon degradation, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 3386-3395.
- [72] Lee, K., Tremblay, G.H. and Cobanli, S.E. (1995a). Bioremediation of oiled beach sediments: Assessment of inorganic and organic fertilizers., *Proceedings of 1995 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, DC, 107-113.
- [73] Wrenn, B.A., Suidan, M.T., Strohmeier, K.L., Eberhart, B.L., Wilson, G.J., and Venosa, A.D. (1997a). Nutrient transport during bioremediation of contaminated beaches: Evaluation with lithium as a conservative tracer. *Wat. Res.* 31, 515-524.
- [74] Wrenn, B.A., Boufadel, M.C., Suidan, M.T., and Venosa, A.D. (1997b). Nutrient transport during bioremediation of crude oil contaminated beaches. In: *In-Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4*, Battelle Press, Columbus, OH, 267-272.
- [75] Olivieri, R., Bacchin, P., Robertiello, A., Odde, N., Degen., L., Tonolo, A. (1976). Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow release fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 629-634.
- [76] Atlas, R.M. (1995a). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 317-327.

- [77] Pritchard, P.H, Mueller, J.G, Rogers, J.C., Kremer, F.V. and Glaser, J.A (1992). Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill Alaska. *Biodegradation* 3, 109-132.
- [78] Croft, B.C., Swannell, R.P.J., Grant, A.L., Lee, K. (1995). Effect of bioremediation agents on oil biodegradation in medium-fine sand. In Hinchee, R.E. *et al.* (eds) *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Battelle Press, Columbus, OH, 423-434.
- [79] Sveum, P., and Ramstad, S. (1995). Bioremediation of oil-contaminated shorelines with organic and inorganic nutrients. In Hinchee, R.E. *et al.* (eds) *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Battelle Press, Columbus, OH, 201-217.
- [80] Atlas, R.M. and Bartha, R. (1973). Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environmental Science and Technology*, 7, 538-541.
- [81] Ladousse, A. and Tramier, B. (1991). Results of 12 years of research in spilled oil bioremediation: Inipol EAP 22, *Proceedings of 1991 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, DC, 577-581.
- [82] Rosenberg, E., Lagmann, R., Kushmaro, A., Taube., R., Adler, R., and Ron, E.Z. (1992). Petroleum bioremediation-a multiphase problem. *Biodegradation*, 3, 337-350.
- [83] Sveum, P., Faksness, L.G., and Ramstad (1994). Bioremediation and of oil-contaminated shorelines: the role of carbon in fertilizers. In R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppe, and R.N. Miller (eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 163-174.
- [84] Sveum, P. and Ladousse, A. (1989). Biodegradation of oil in the Arctic: Enhancement by oil-soluble fertilizer application. *Proceedings of 1989 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 436-446.
- [85] Santas, R. and Santas, P. (2000). Effects of wave action on the bioremediation of crude oil saturated hydrocarbons. *Marine Pollution Bullrtin*, 40(5) 434-439.
- [86] Swannell, R.P.J., Croft, B.C., Grant, A.L., and Lee, K. (1995). Evaluation of bioremediation agent in beach microcosms, *Spill Science & Technology Bulletin*, 2(2/3) 151-159.

- [87] Lee, K., and Levy, E.M. (1987). Enhanced biodegradation of a light crude oil in sandy beaches. *Proceedings of 1987 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, DC, 411-416.
- [88] Safferman, S.I. (1991). Selection of nutrients to enhance biodegradation for the remediation of oil spilled on beaches. *Proceedings of 1991 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 571-576.
- [89] Swannell, R.P.J., Lee, K., and McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342-365.
- [90] Lee, K., Siron, R., Tremblay, G.H. (1995b). Effectiveness of bioremediation in reducing toxicity in oiled intertidal sediments. In Hinchee *et al.*(Eds): *Microbial Processes for Bioremediation*, Battelle Press, Columbus, OH, 117-127.
- [91] U.S. EPA (2000) *NCP Product Schedule*, <http://www.epa.gov/oilspill>
- [92] Forsyth, J.V., Tsao, Y.M., Blem, R.D. (1995). Bioremediation: when is augmentation needed? In Hinchee, R.E. *et al.* (eds) *Bioaugmentation for Site Remediation*. Battelle Press, Columbus, OH, 1-14.
- [93] Atlas, R.M. (1977). Stimulated petroleum biodegradation. *Crit. Rev. Microbiol.*, **5**, 371-386.
- [94] Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M. (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**, 977-983.
- [95] National Environmental Technology Application Center (1993). *Evaluation Methods Manual: Oil Spill Response Bioremediation Agents*. University of Pittsburgh Applied Research Center, Pittsburgh, PA.
- [96] Jobson, A.M., Cook, F.D., and Westlake, D.W.S. (1974). Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. *Appl. Microbiol.* **27**, 166-171.
- [97] Tagger, S., Bianchi, A., Julliard, M., Le Petit, J., Roux, B., (1983). Effect of microbial seeding of crude oil in seawater. *Marine Biology*, **78**(1), 13-21.
- [98] Venosa, A.D., Haines, J.R., and Allen, D.M. (1992). Efficacy of commercial inocula in enhancing biodegradation of crude oil contaminating a Prince William Sound beach. *J. Ind. Microbiol.*, **10**, 1-11.
- [99] Pritchard, P.H. and Costa, C.F. (1991). EPA's Alaska oil spill bioremediation project. *Environmental Science and Technology*, **25**, 372-379.

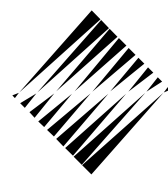
- [100] Garcia-Blanco, S., Motelab, M., Venosa, A.D., Suidan, M.T., Lee, K., King, D.W. (2001b). Restoration of the oil-contaminated Saint Lawrence River Shoreline: Bioremediation and Phytoremediation. *Proceedings of 2001 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington DC, 303-308.
- [101] Lee, K., and Levy, E. M. (1991). Bioremediation: Waxy crude oils stranded on low-energy shorelines. *Proceedings of the 1991 Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute, Washington, D. C., 541-547.
- [102] Atlas, R.M. (1991). Microbial hydrocarbon degradation---bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 52, 149-156.
- [103] Brown, R.A. and Crosbie, J.R. (1994). Oxygen sources for in situ bioremediation, In Flathman et al. (eds): *Bioremediation – Field Experience*, Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 311-332.
- [104] Riser-Roberts, E (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes*, Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton, FL.
- [105] Owens, E.H. (1998). Sediment relocation and tilling – Underused and misunderstood techniques for the treatment of oiled beaches. *Proceedings of the 21st Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar*, Environment Canada, Ottawa, 857-871.
- [106] Jerger, D.E., Woodhull, P.M., Flathman, P.E., and Exner, J.H. (1994). Solid-pase bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil: laboratory treatability study through site closure. In Flathman et al. (eds): *Bioremediation – Field Experience*, Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 177-193.
- [107] Gundlach, E.R. (1987). Oil-holding capacities and removal coefficients for different shoreline types to computer simulate spills in coastal waters. *Proceedings of 1987 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, DC, 451-457.
- [108] Brown, R.A. and Norris, R.D. (1994). The evaluation of a technology: hydrocarbon peroxide in in situ bioremediation. In R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppe, and R.N. Miller (eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, FL. 148-162.

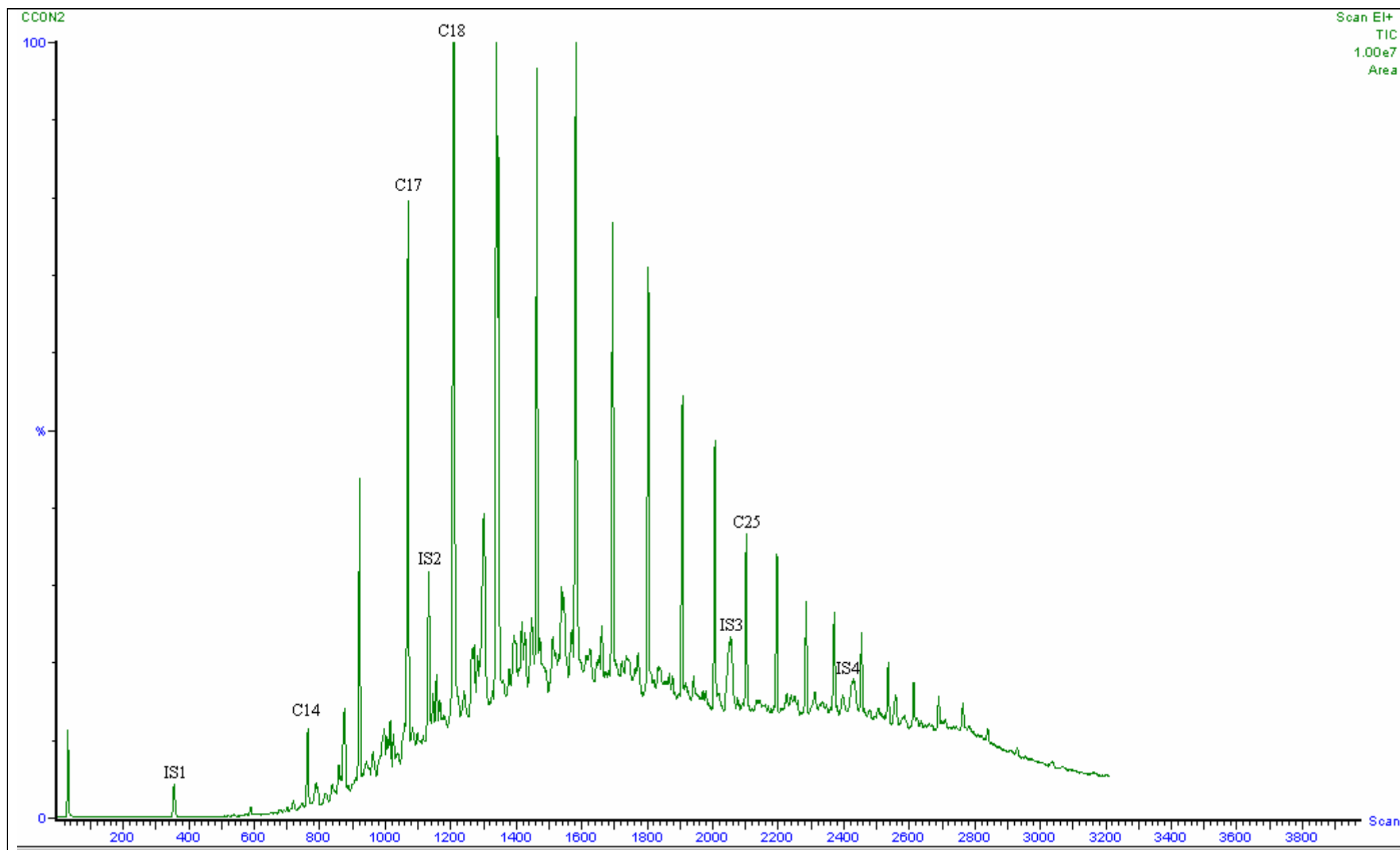
- [109] Brown, R.A., Mahaffey, W, and Norris, R.D. (1993). In National Research Council: *In Situ Bioremediation. When Does It Work?* National Academy Press, Washington DC, 121-135.
- [110] Hess, A., Höhener, P., Hunkeler, D., Zeyer, J. (1996). Bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer: simulation studies in laboratory aquifer columns. *Journal of Contaminant Hydrology*, 23(4), 329-345
- [111] Mitsch, W. J. and Gosselink, J. G. (2000). *Wetlands*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.
- [112] Basseres A., Eyraud P., Ladousse A. and Tramier B. (1993). "Enhancement of spilled oil biodegradation by nutrients of natural origin". *Proceedings, 1993 International Oil Spill Conference*, pp. 495-501.
- [113] Koren O, Knezevic V., Ron E. Z. and Rosenberg E. (2003). "Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 10. 6337-6339.
- [114] M. N. AL-Hadhrami, H. M. Lappin-Scott and P. J. Fisher (1996). "Effects of the Addition of Organic Carbon Sources on Bacterial Respiration and n-Alkane Biodegradation of Omani Crude Oil". *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 32, No. 4, 351-357.
- [115] Lacotte D.J., Mille G., Acquaviva M. and Bertrand J-C. (1995). "In vitro biodegradation of arabian light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as nitrogen and phosphorous sources". *Chemosphere*, Vol. 31, Nos. 11/12, 4351-4358.
- [116] Olivieri R., Robertiello A., Degen L. (1978). "Enhancement of microbial degradation of oil pollutants using lipophilic fertilizers" *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 9, No. 8, 217-220.
- [117] Santas R., Korda A., Tenente A., Buchholz K. and Santas Ph. (1999). "Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inipol, F1 or both?" *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 38, No. 1, 44-48.
- [118] Draft International Standard ISO/DIS 8708 "Crude Petroleum Oil -- Determination of Distillation Characteristics Using 15 Theoretical Plates Columns" by the International Organization for Standardization

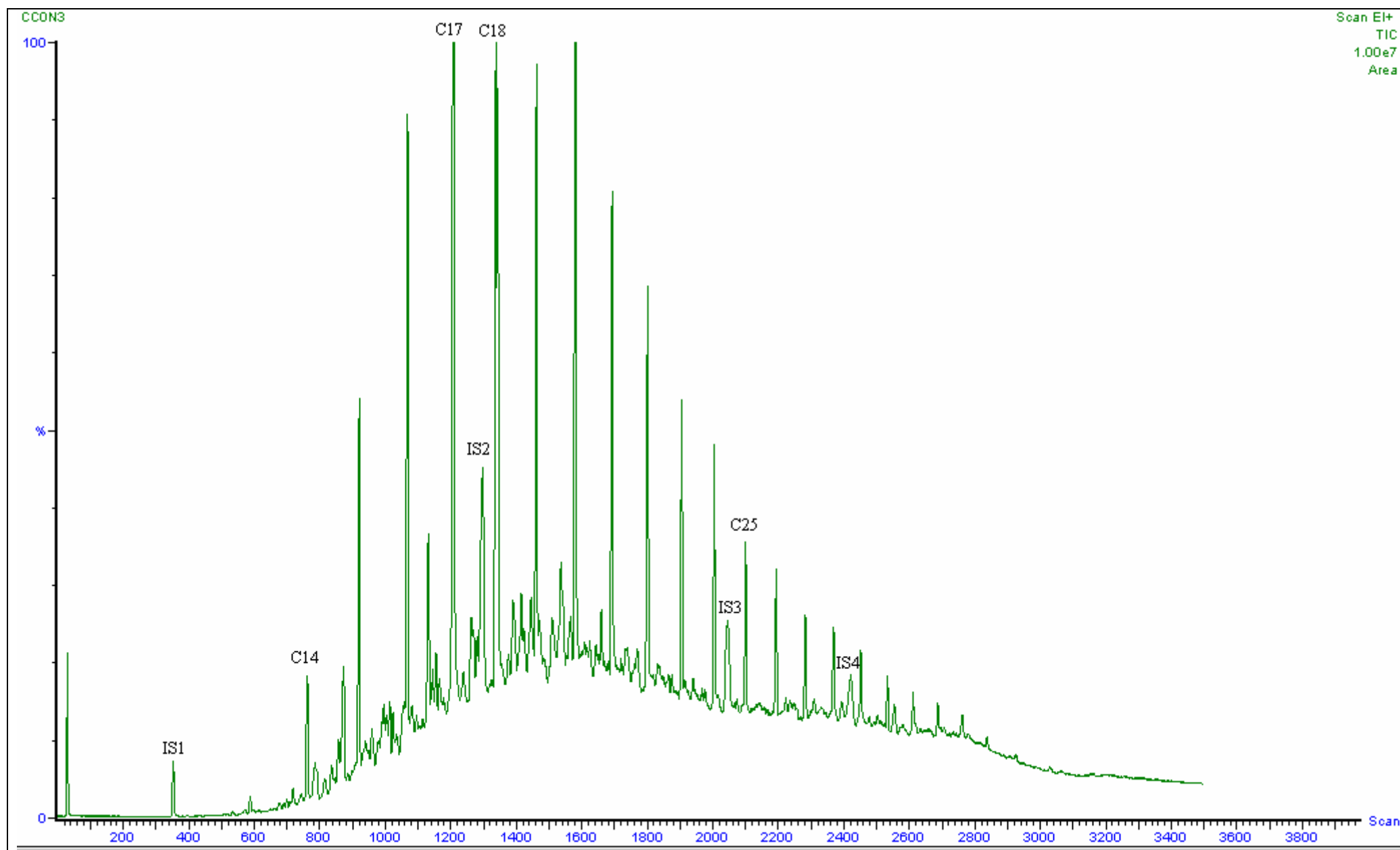
- [119] Wrenn A, Venosa AD. (1996). “Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure” *Can. J. Microbiol.* 42, 252-258.
- [120] Briones AM, Reichardt Jr W. (1999). “Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft excel” *Journal of Microbiological Methods.* 35, 157-161.
- [121] EPA (2003 edition). “Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test” 40 CFR Part 300 Appendix C.

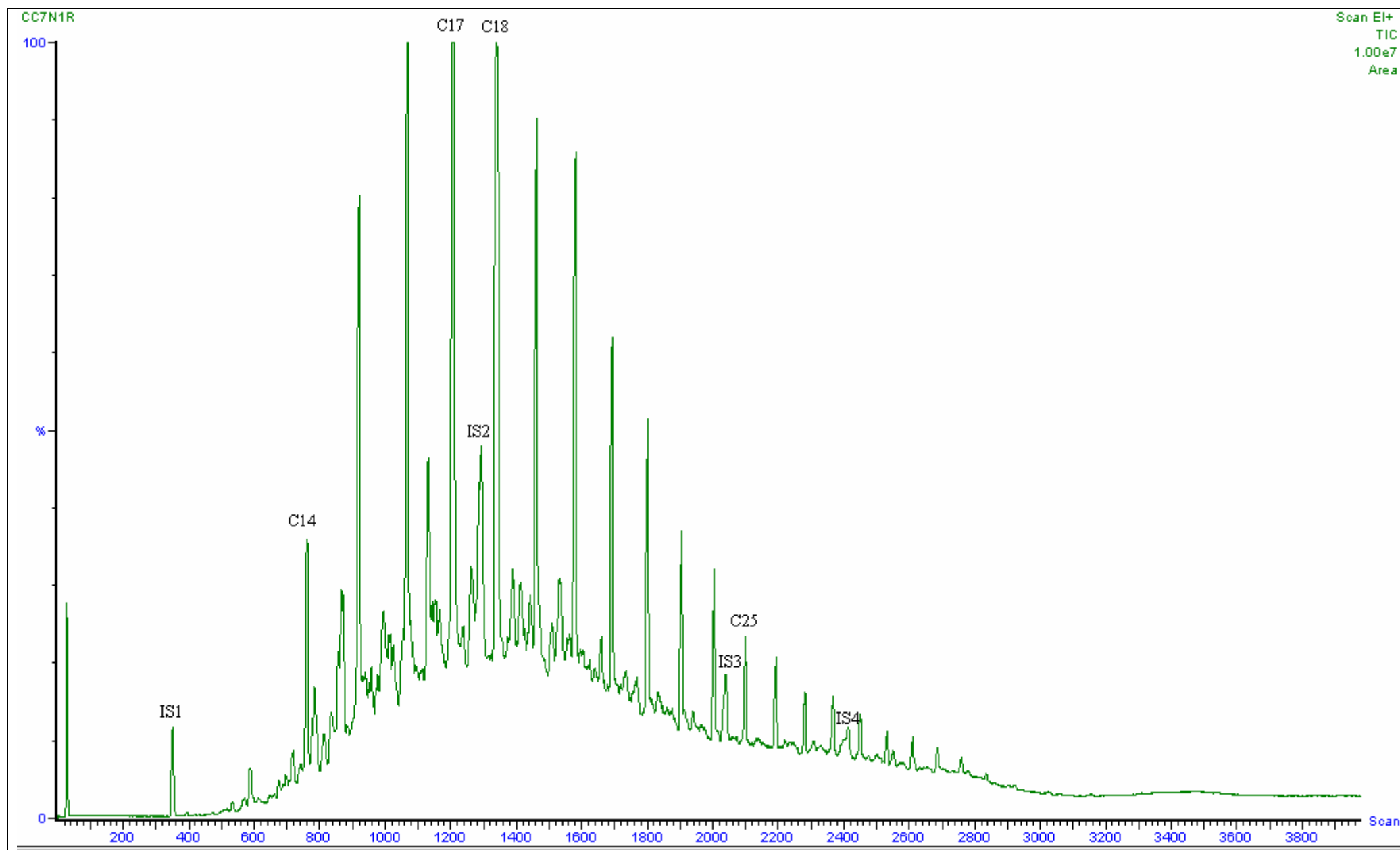
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

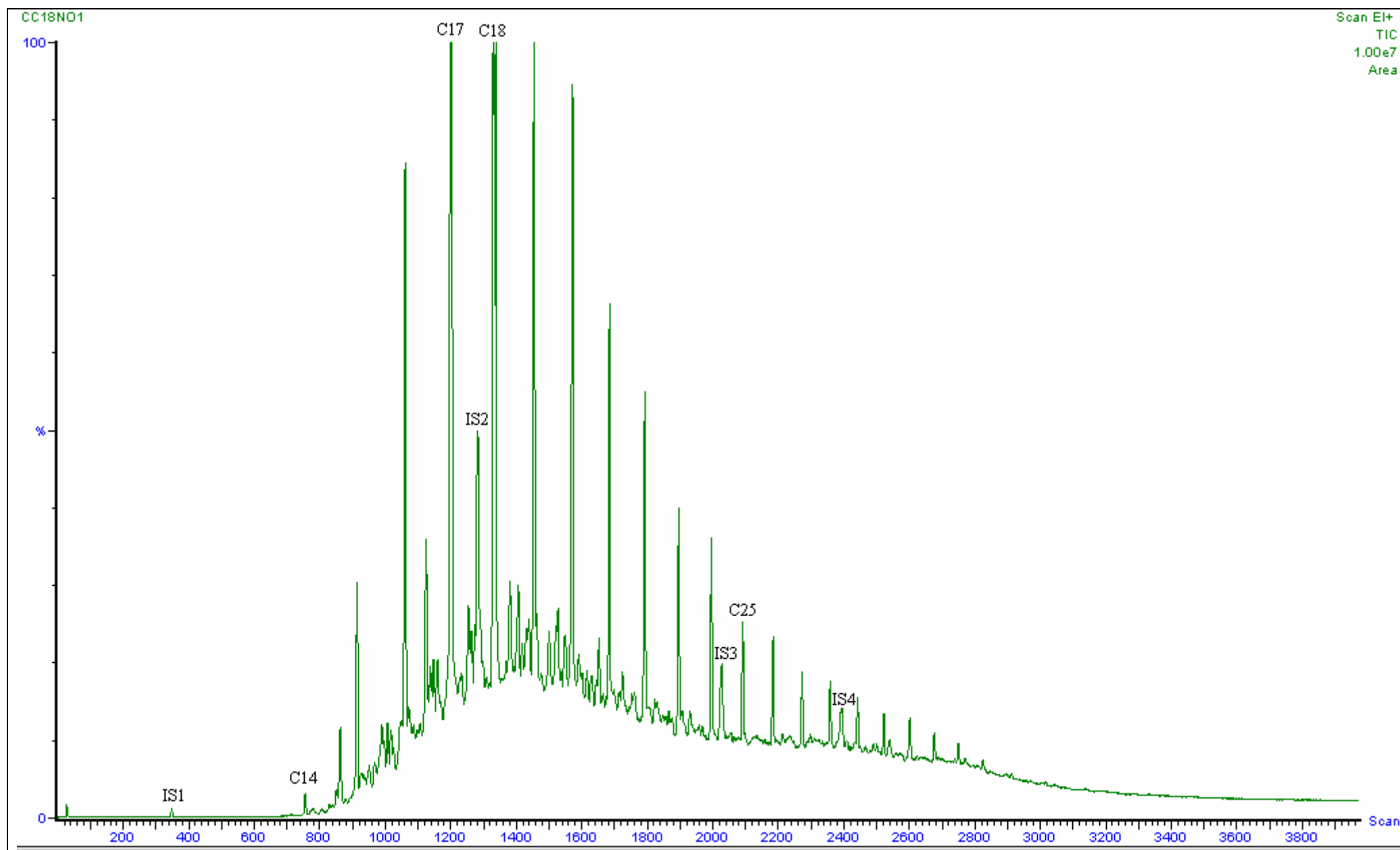
Χρωματογραφήματα Αναλύσεων

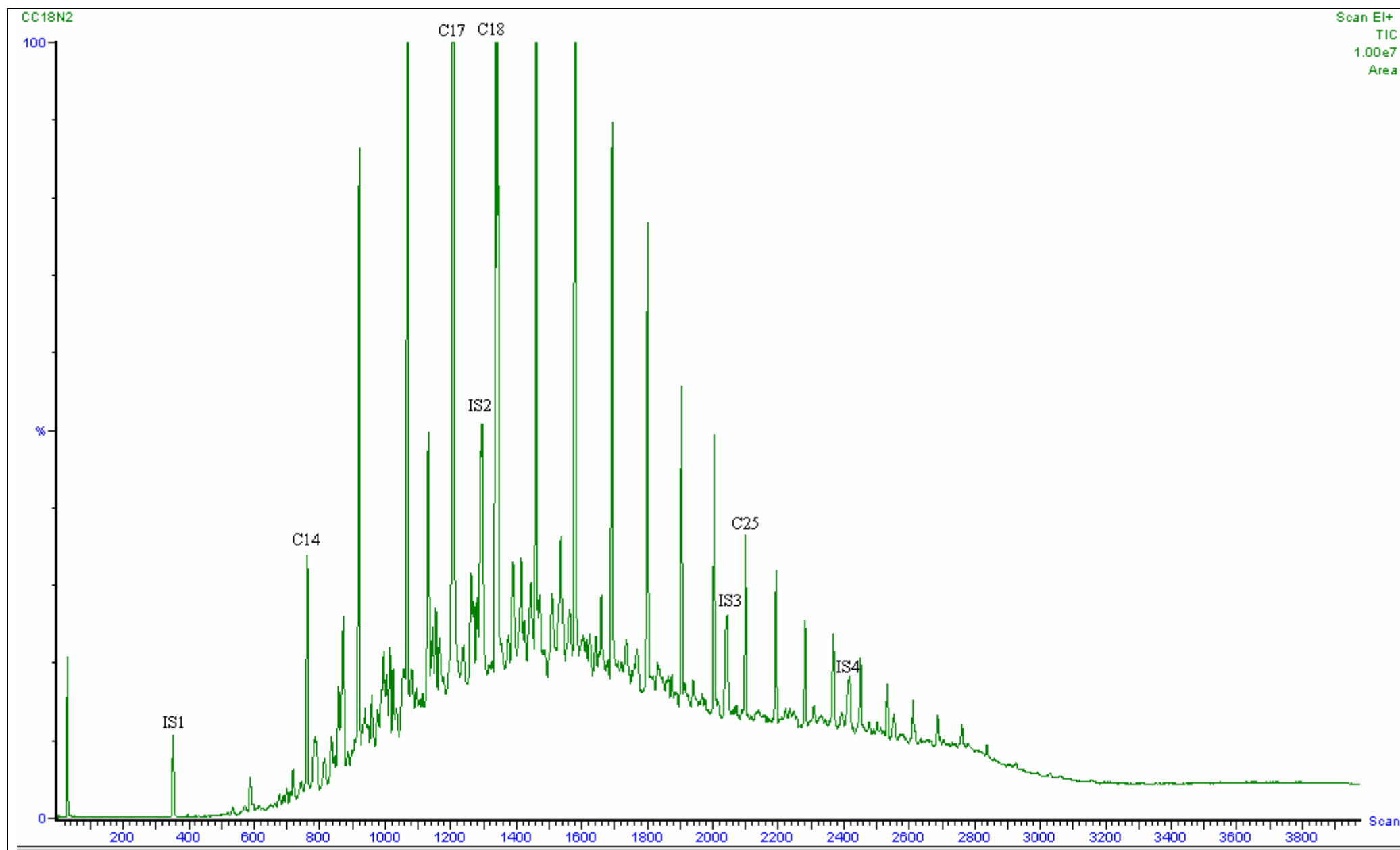


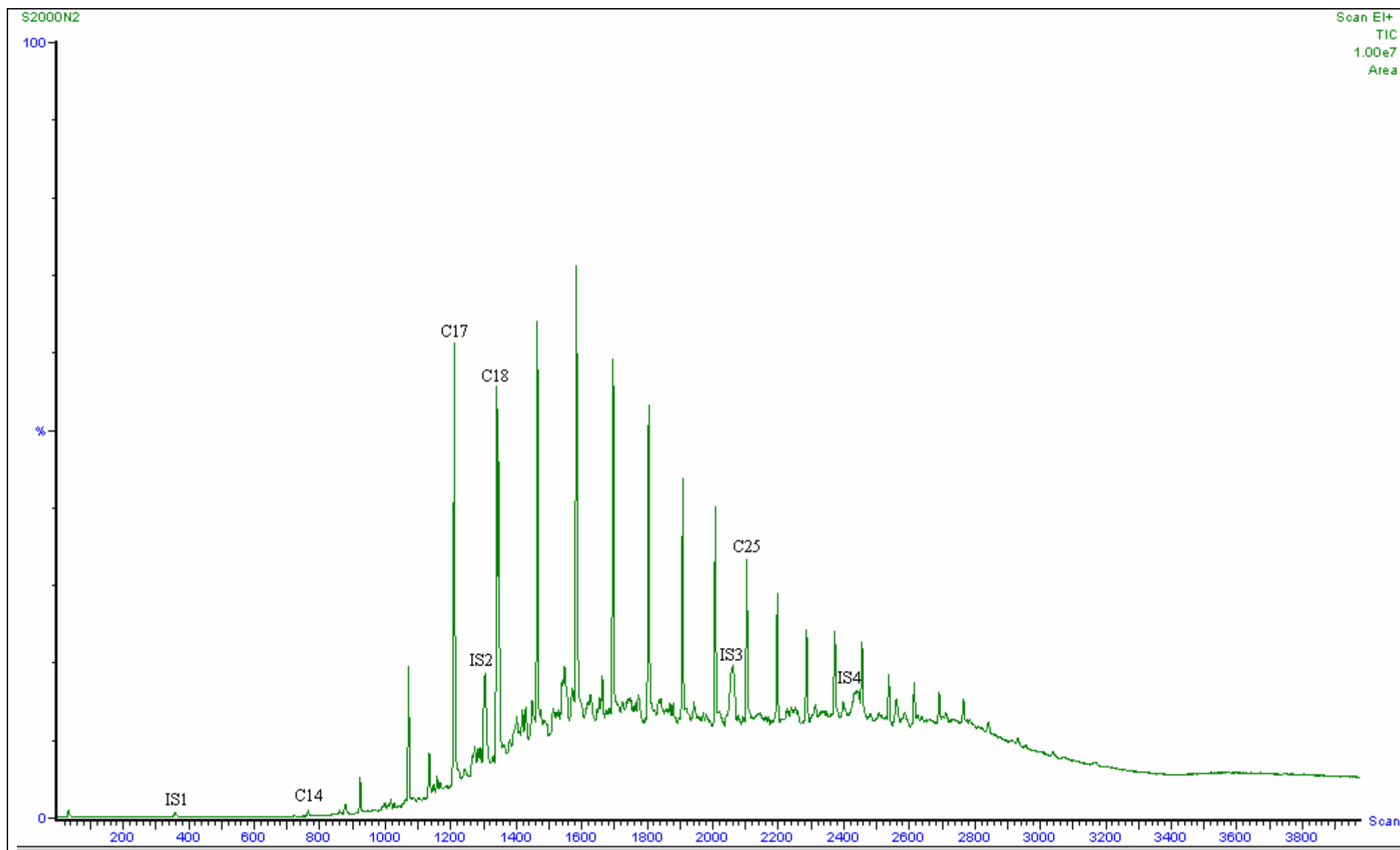


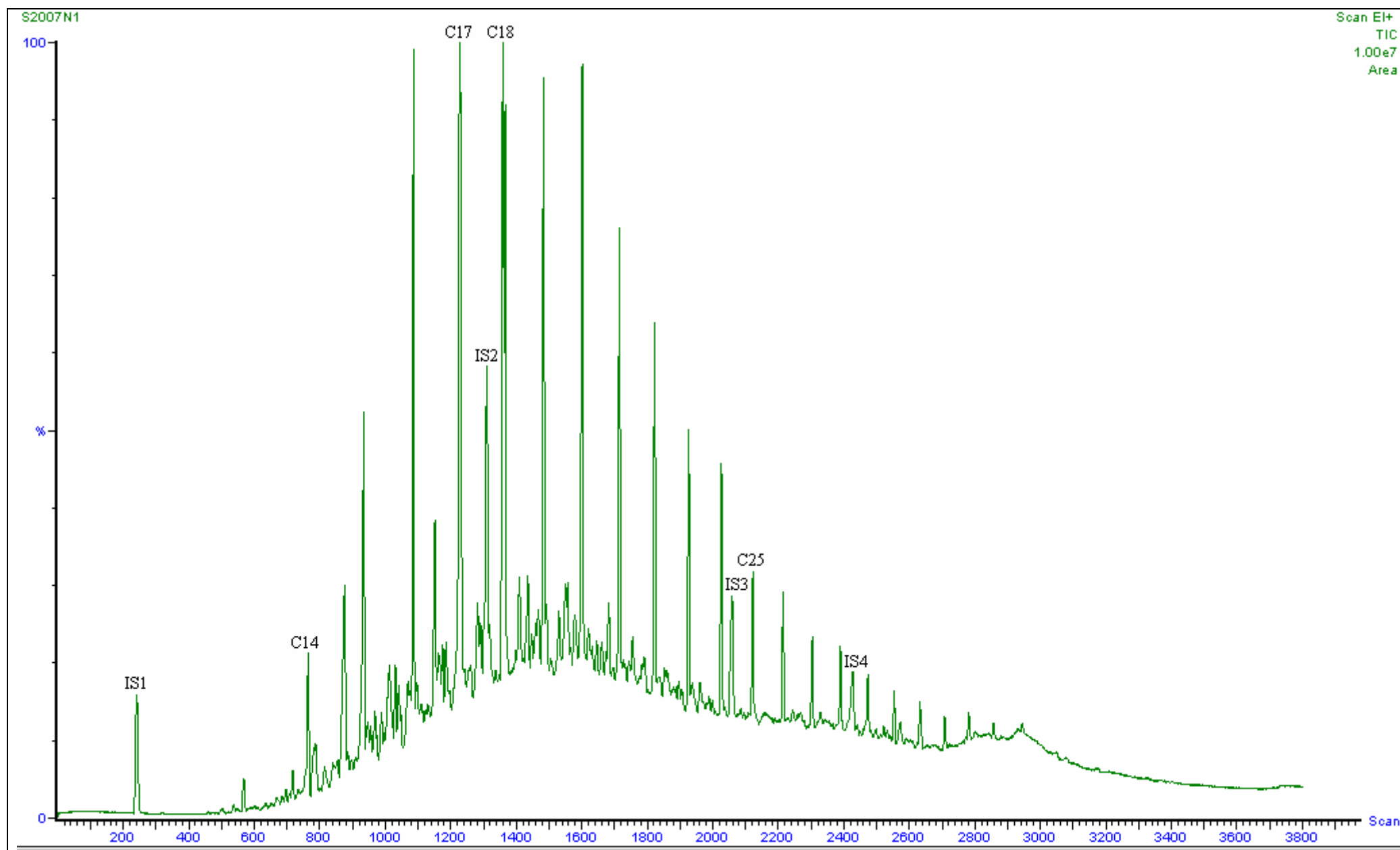


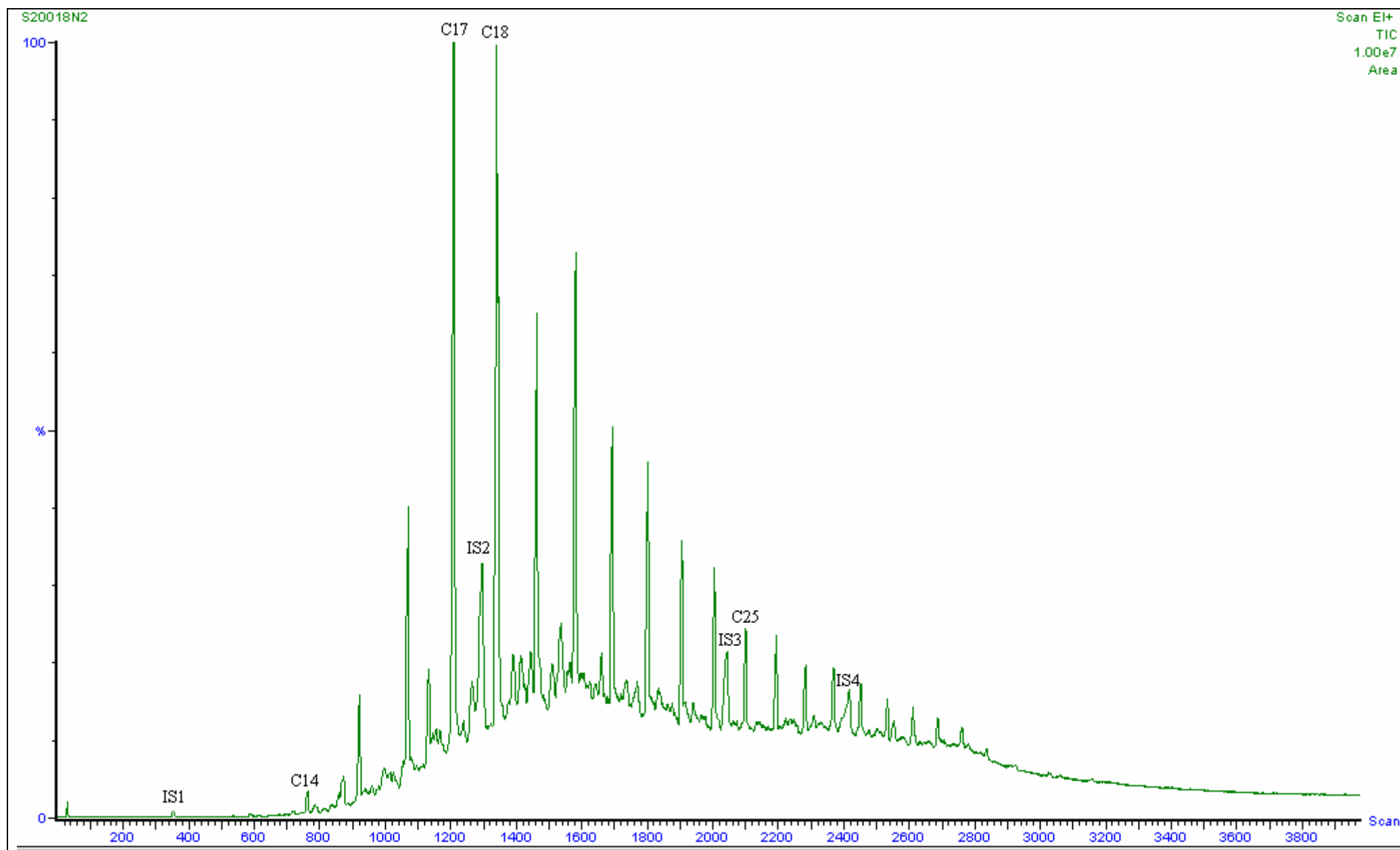


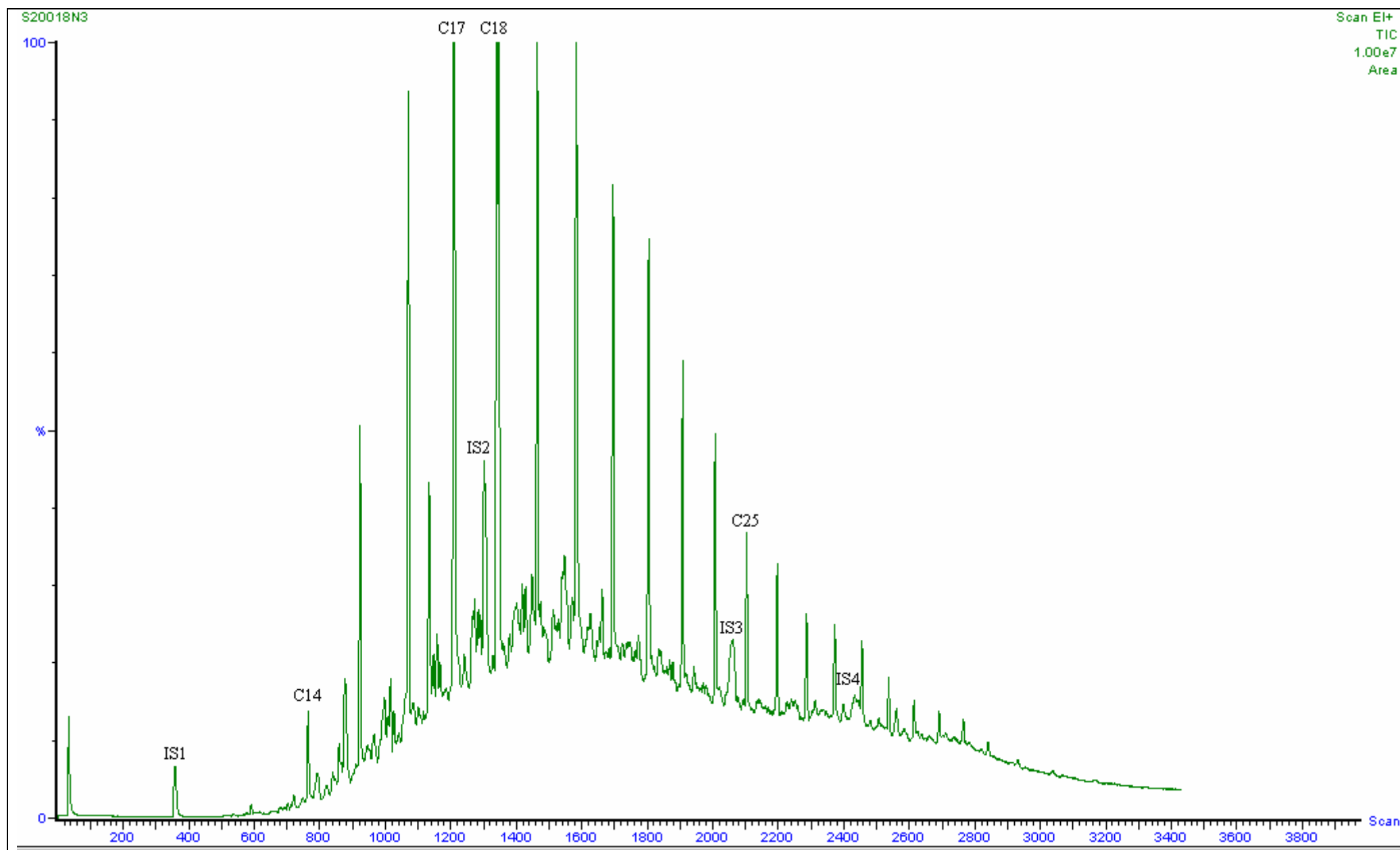


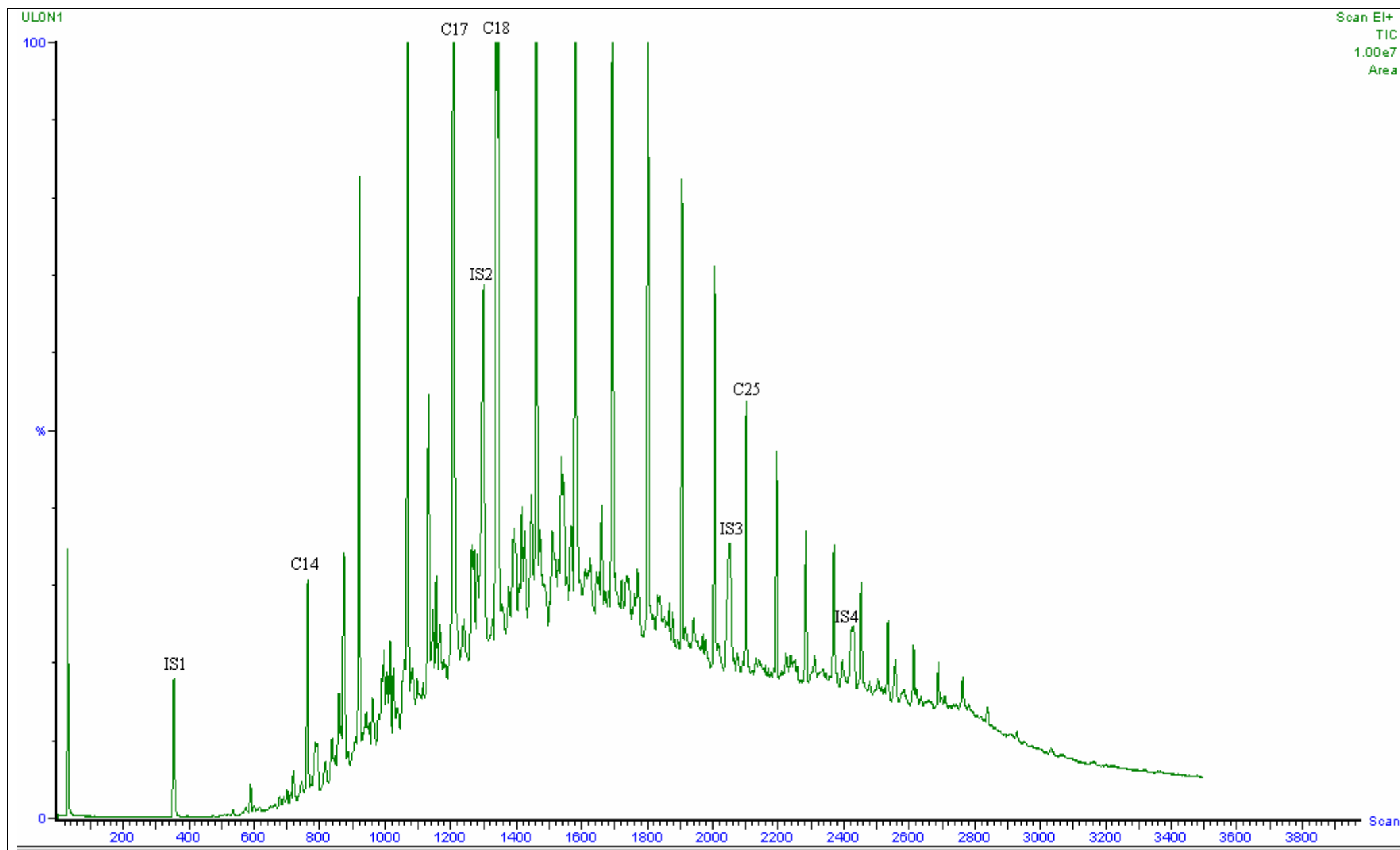


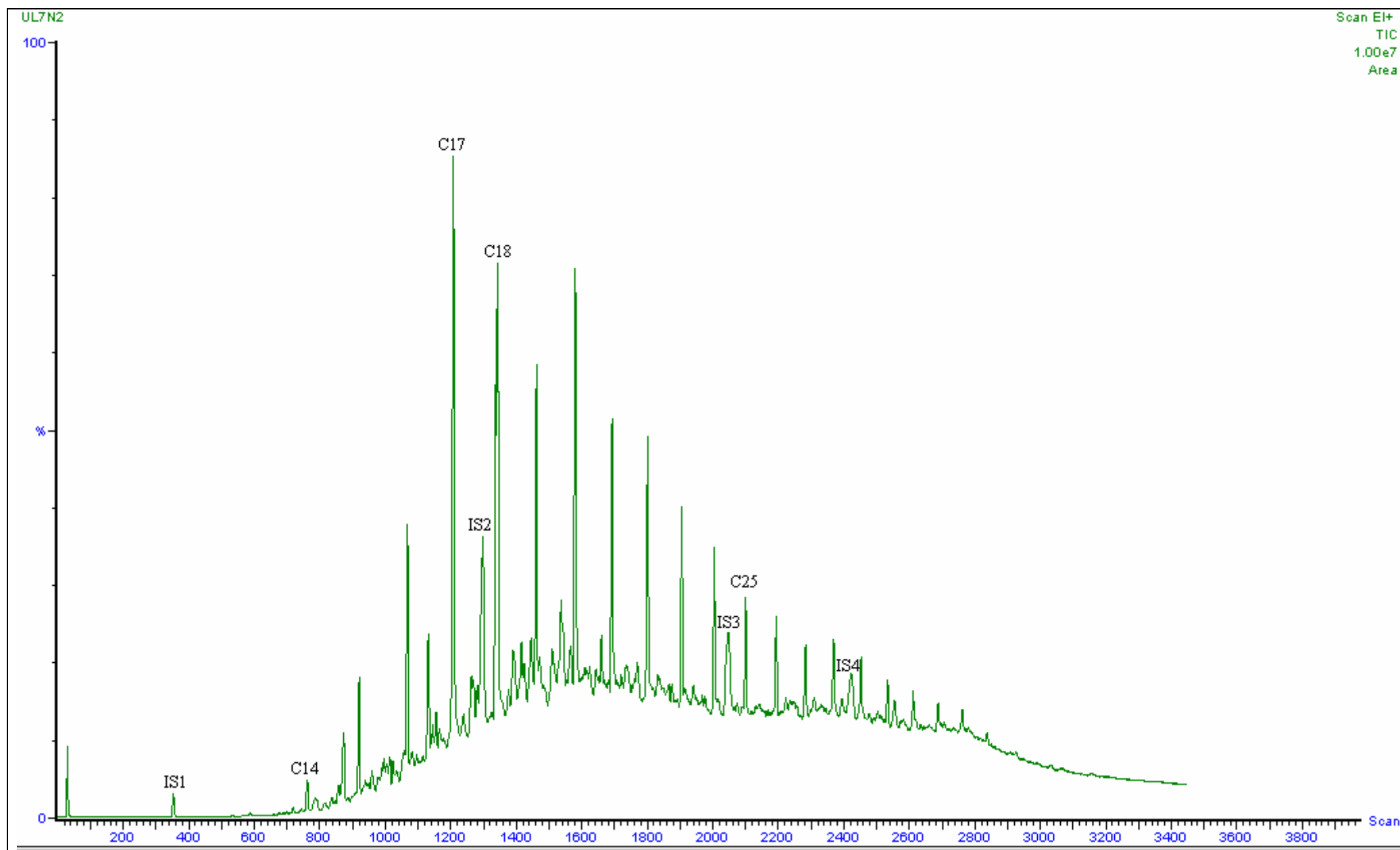


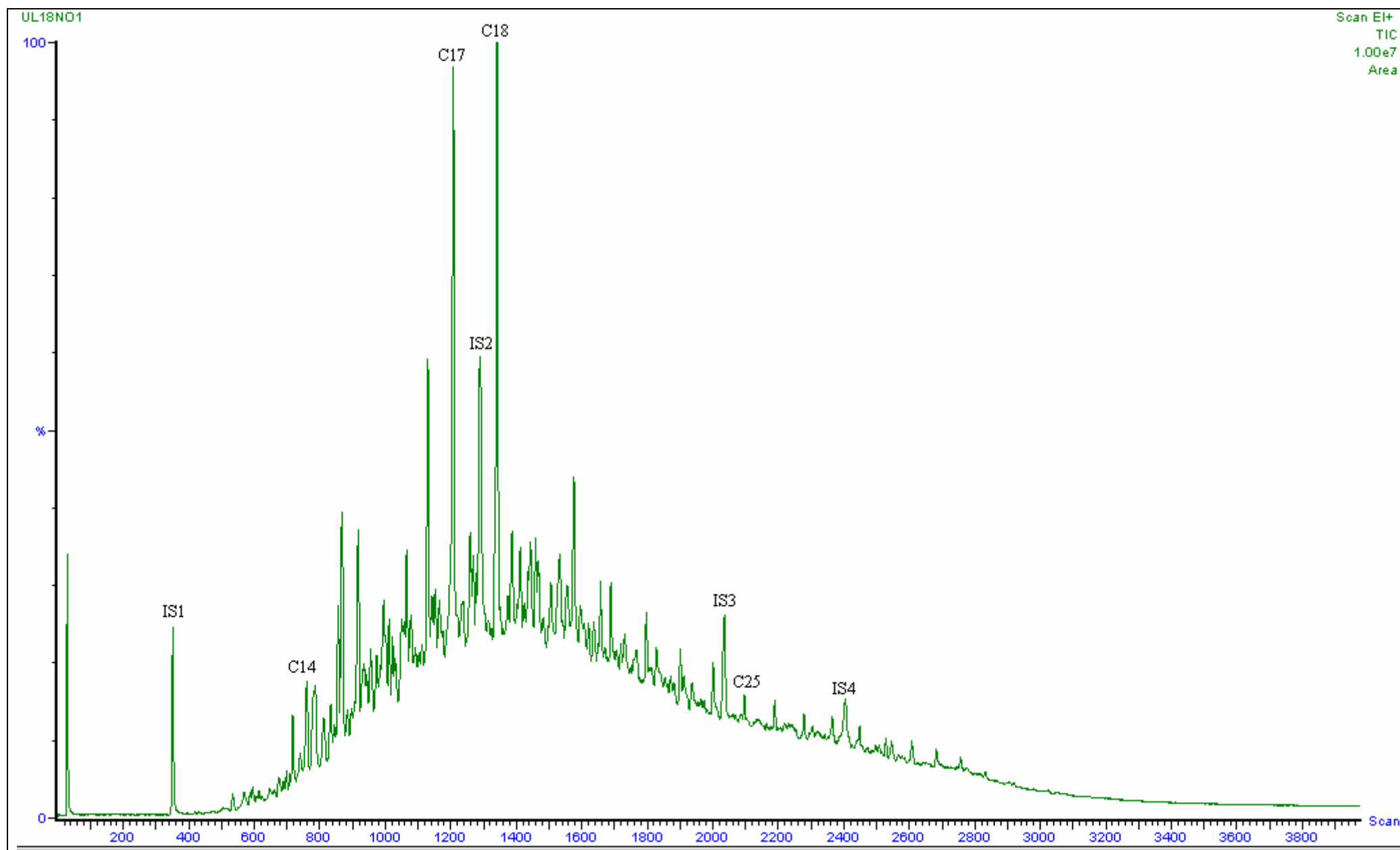


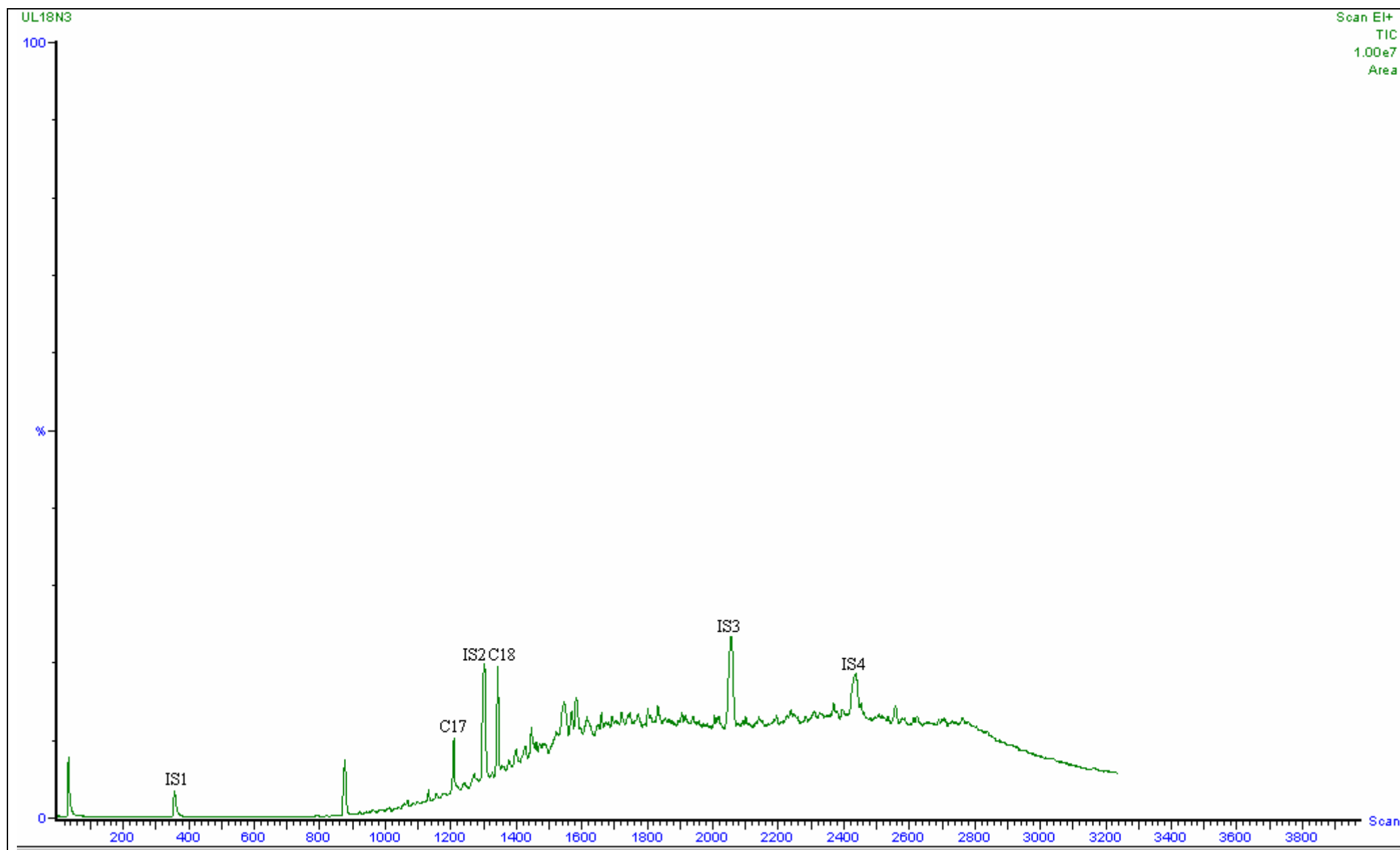


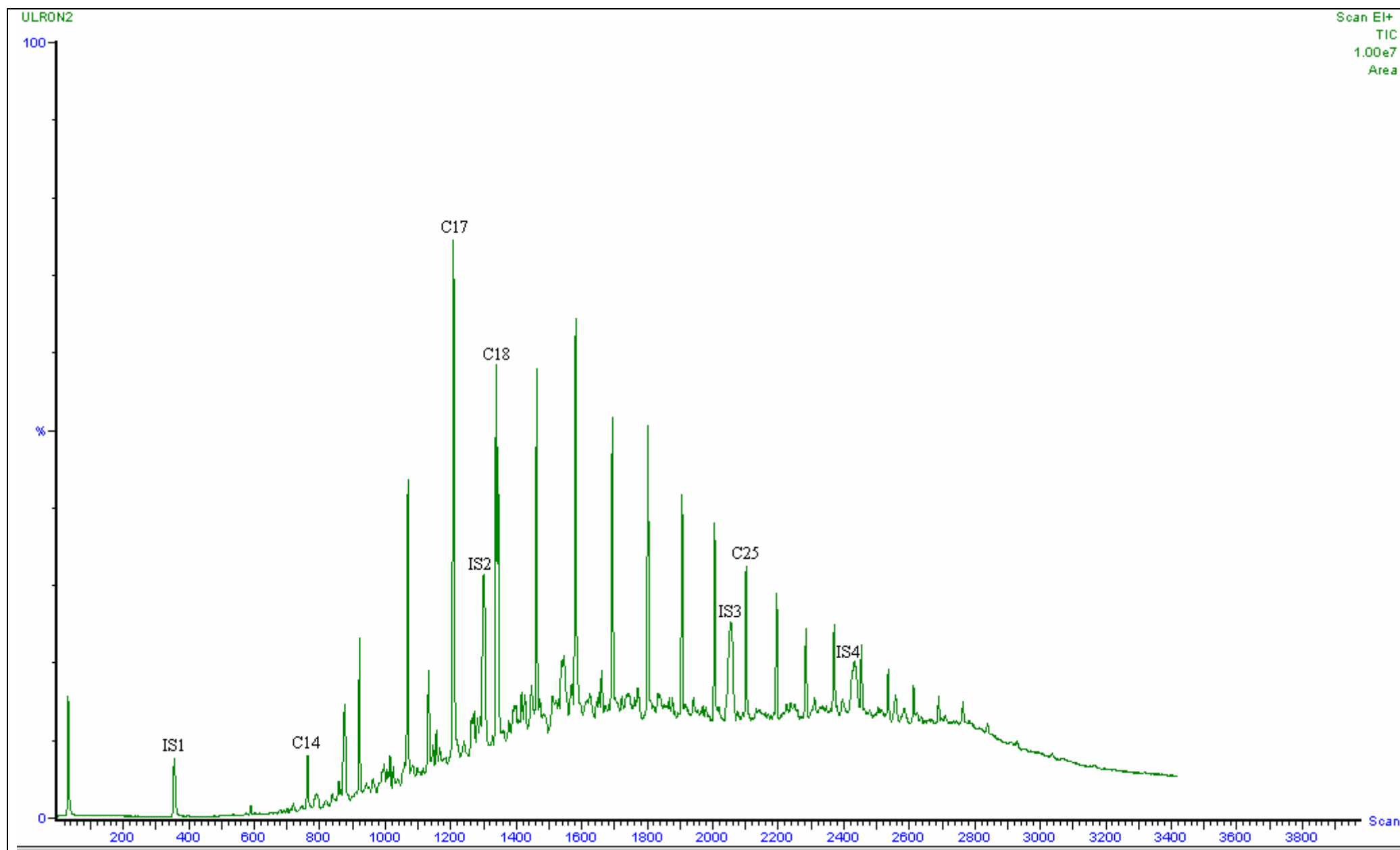


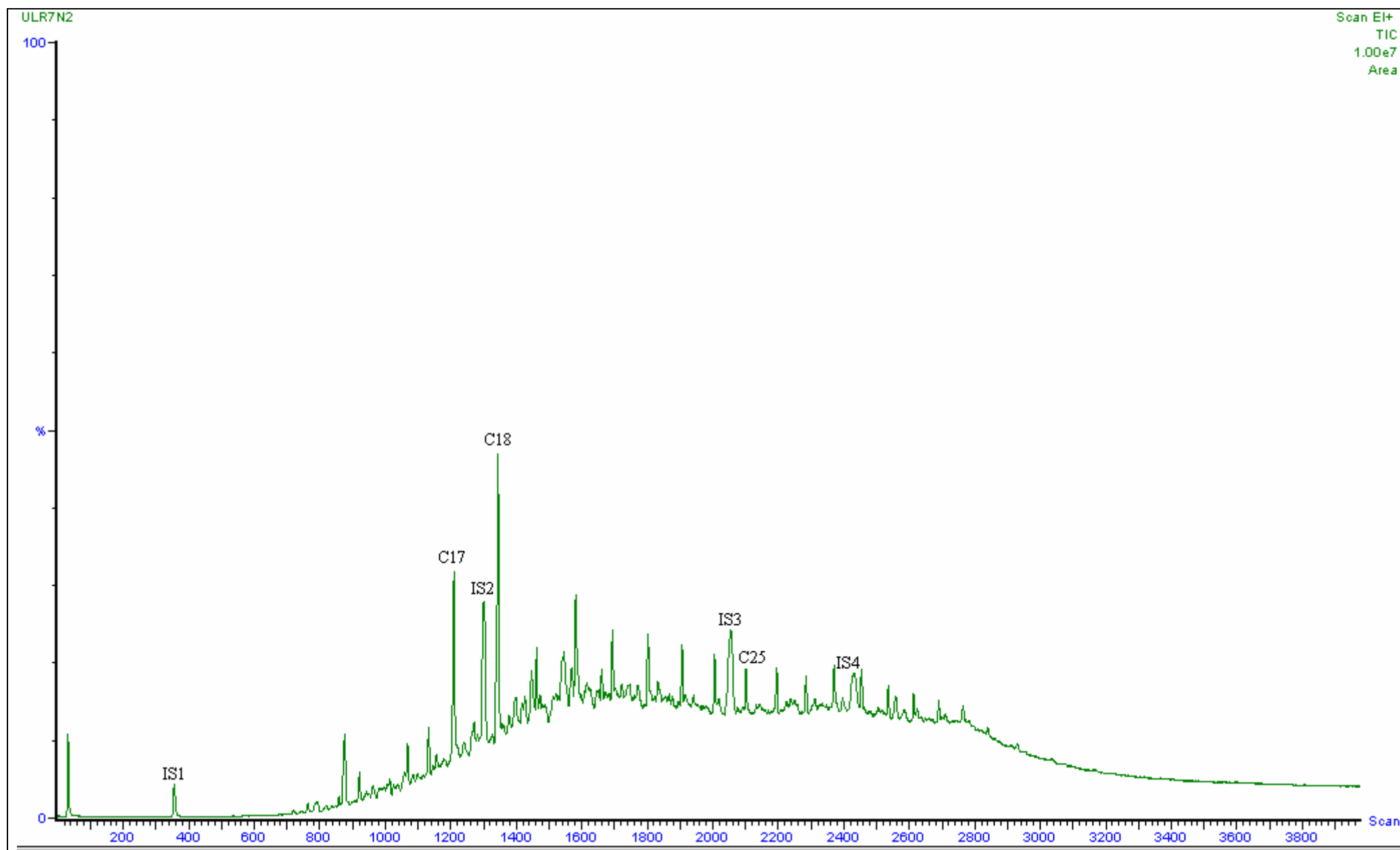


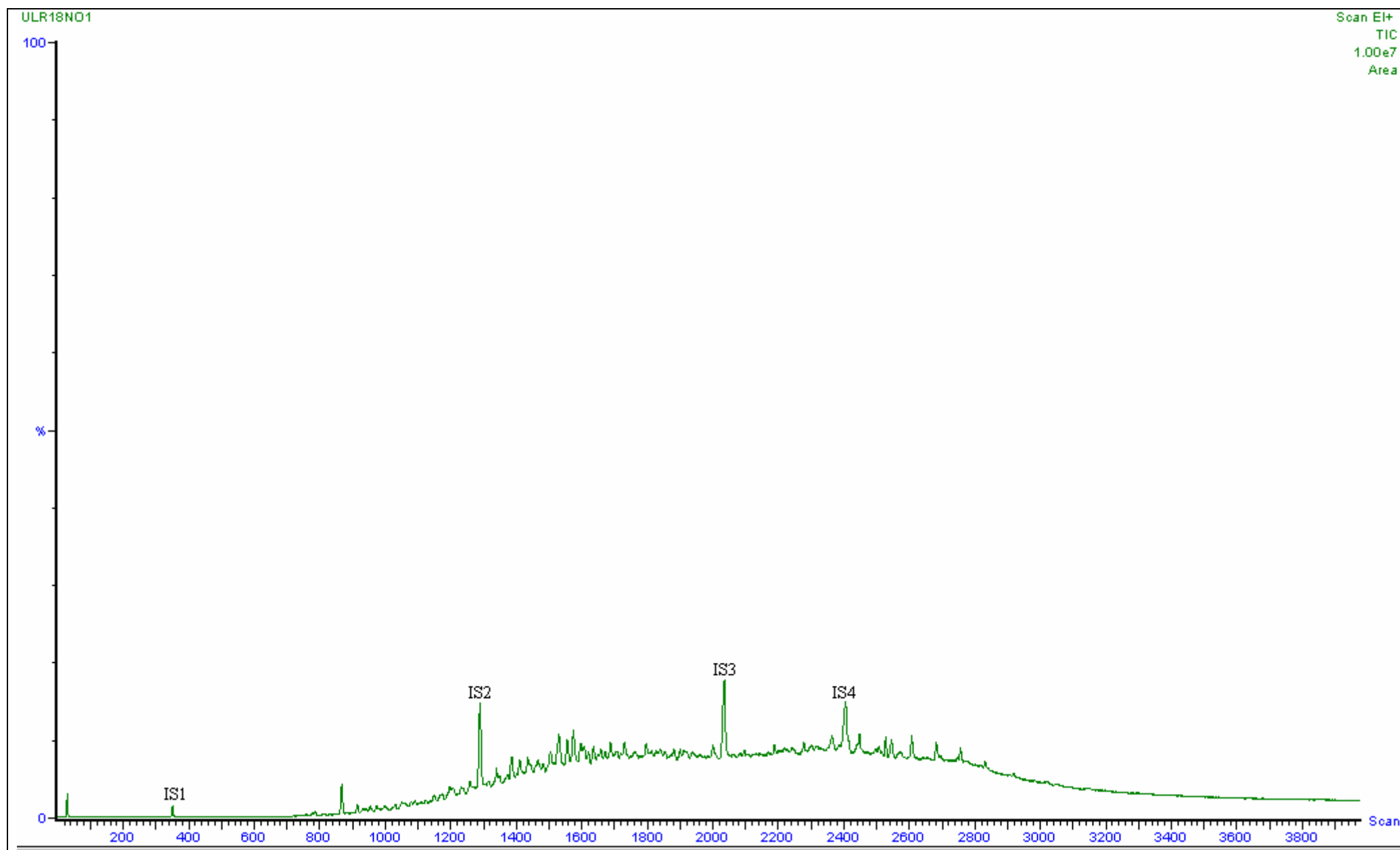


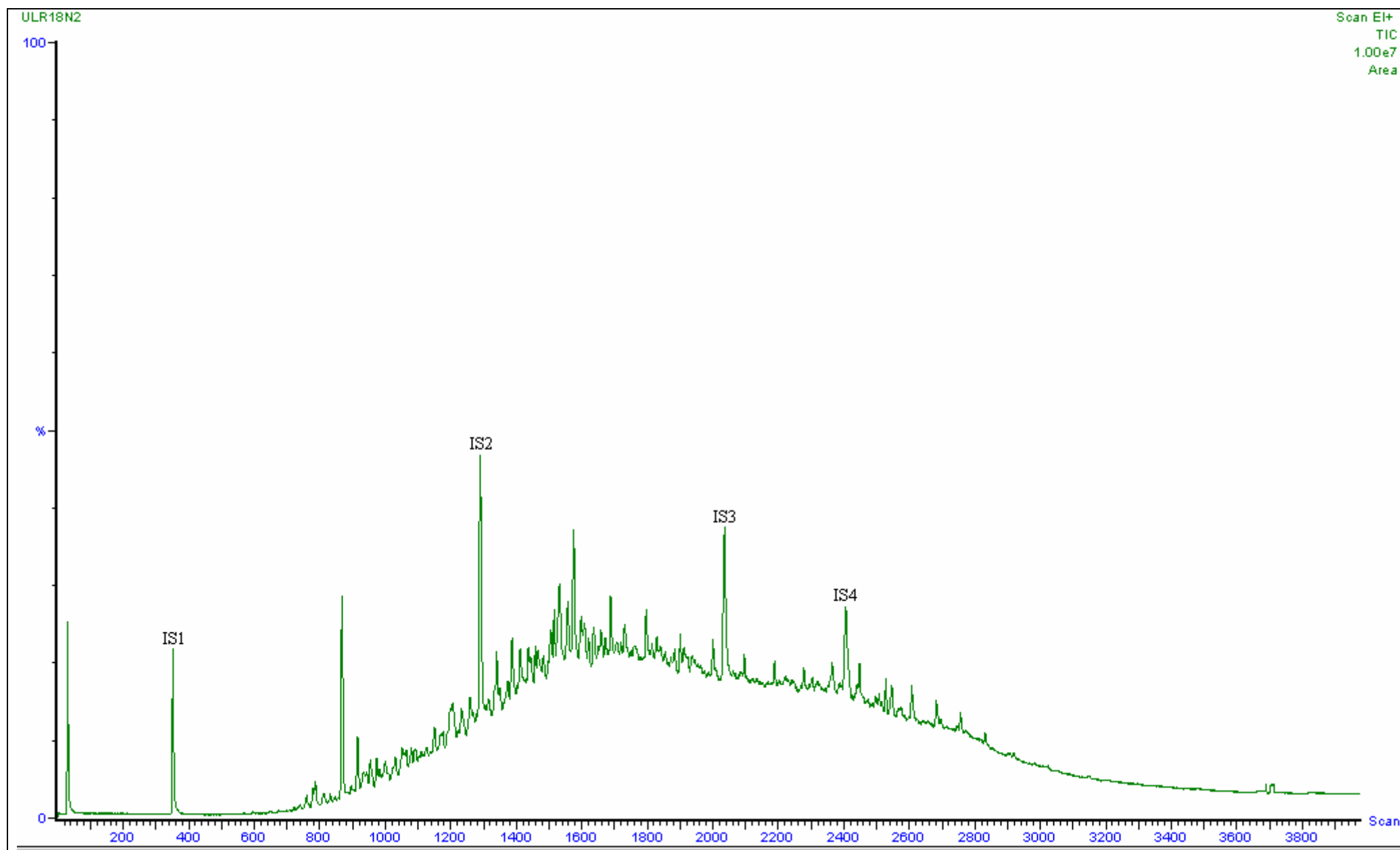


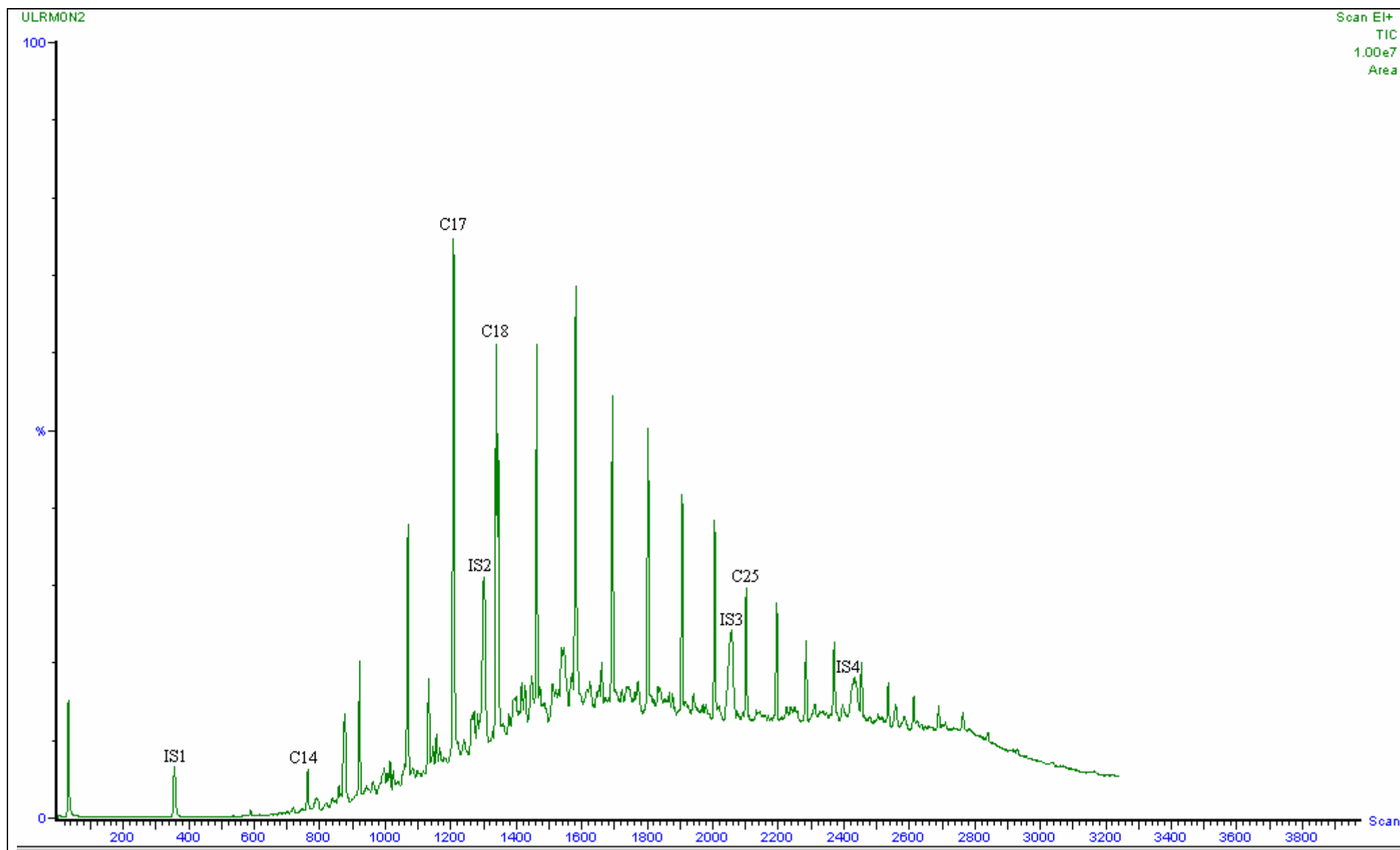


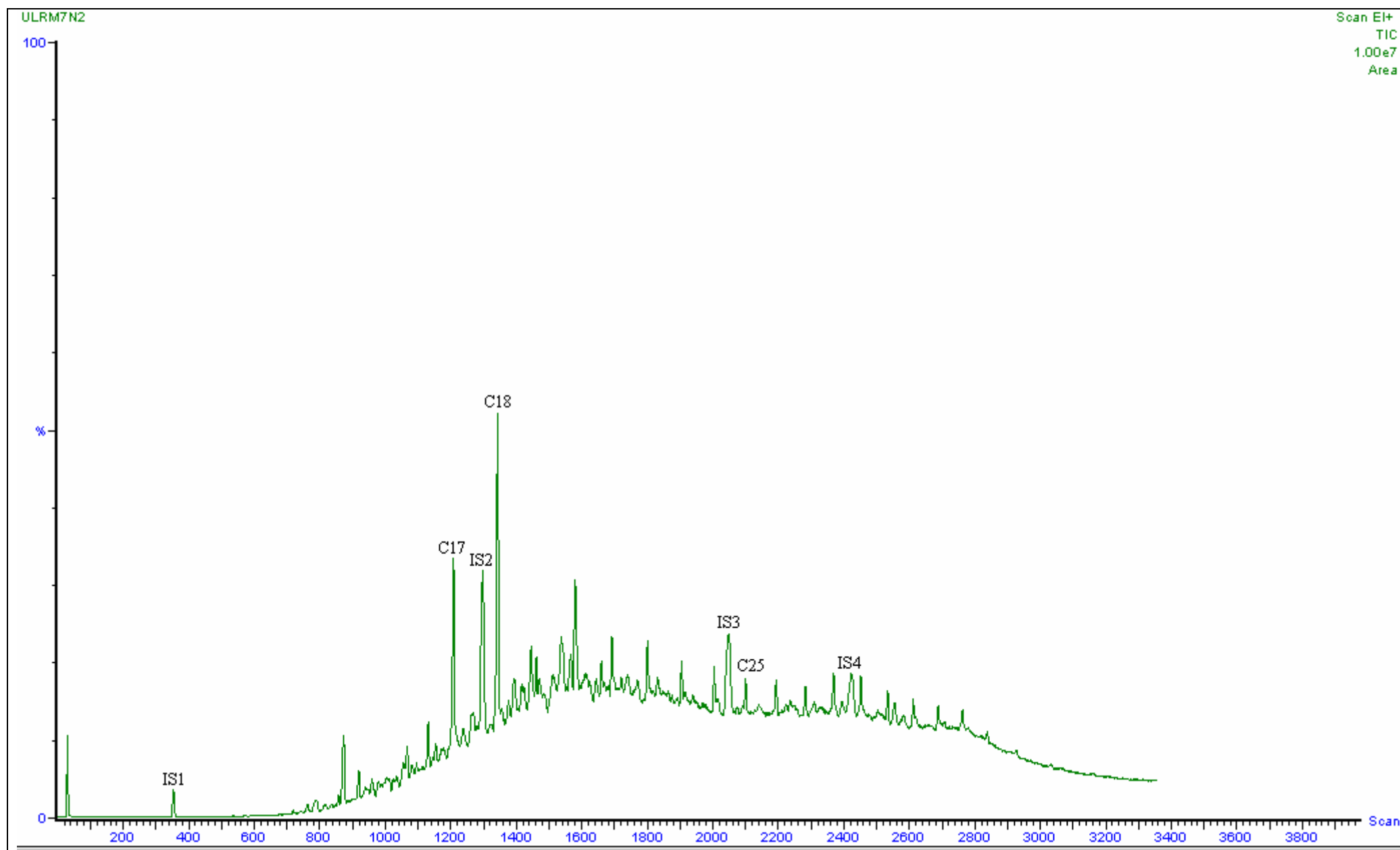


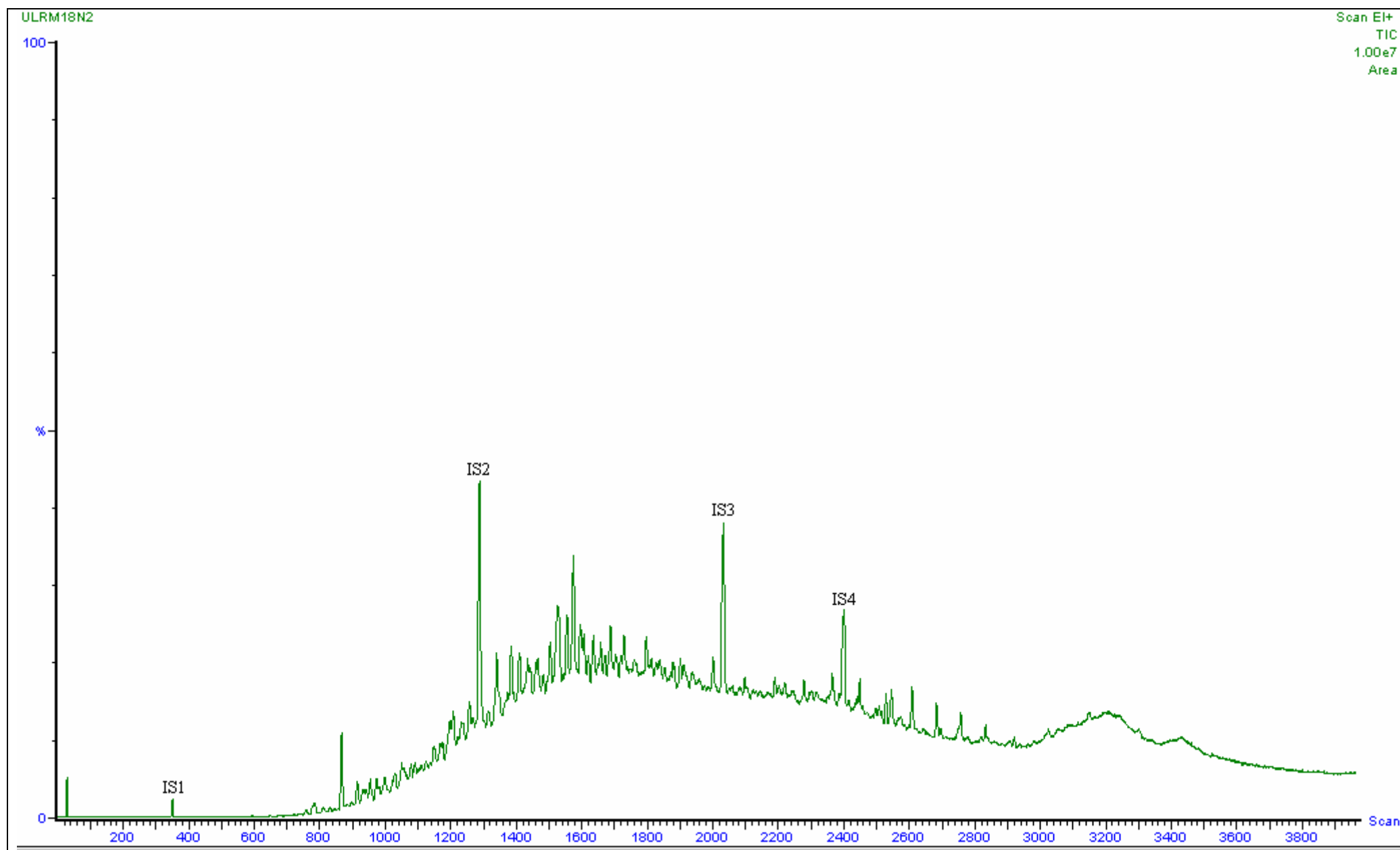


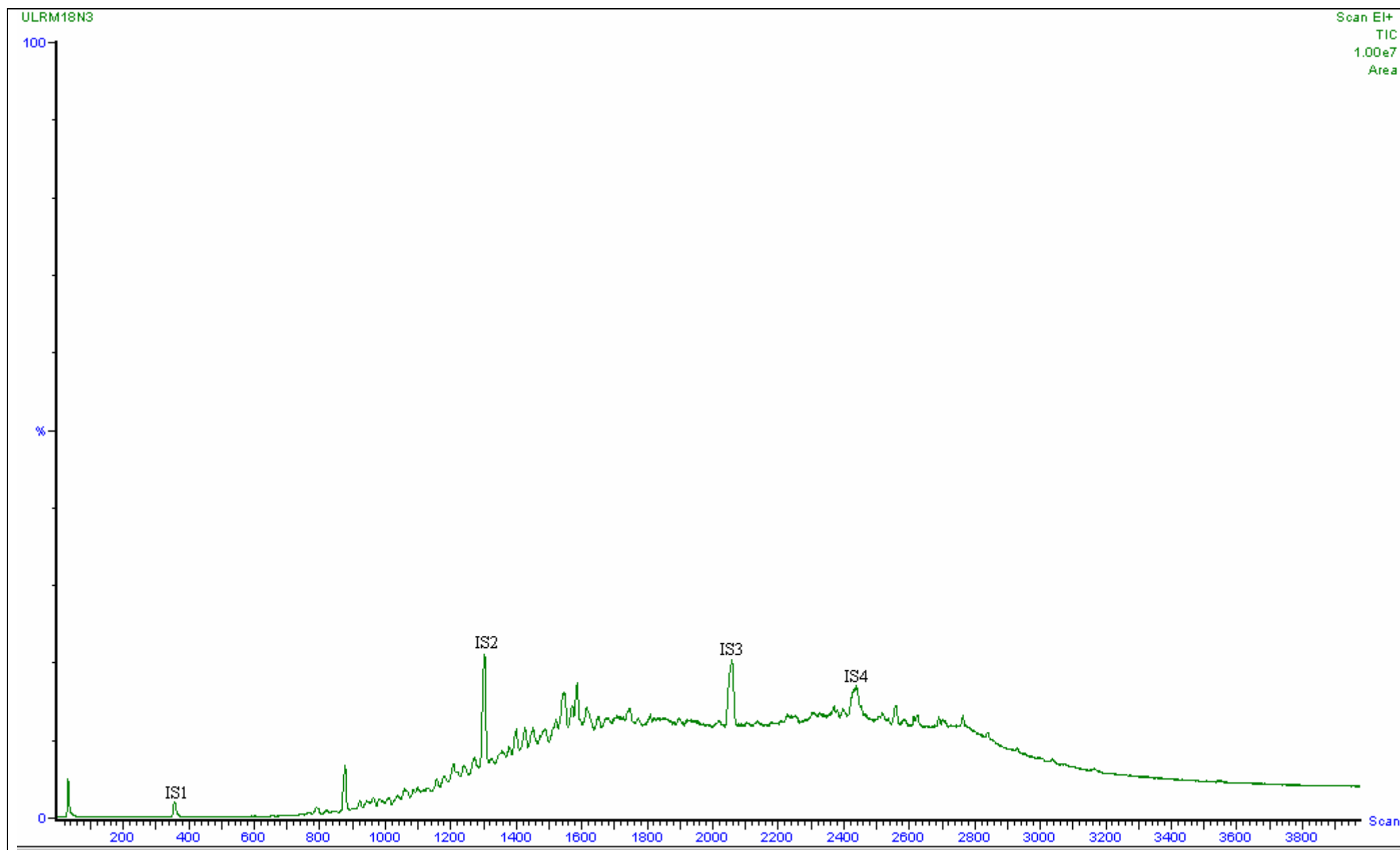






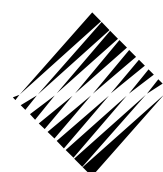






ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

MPN Αναλύσεις



Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC0#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0087	-0.1	-0.06	36.002	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	1	2	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF

CC0#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC7#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0087	-0.1	-0.06	36.002	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	1	2	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							

	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC7#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							

	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου α	x x	$S(x)$ L	$S'n(x)$ R	P P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης dr	Παράγοντας Εμπιστοσύνης CF
CC18#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ.	Αρ.	Αρ.	Όγκος	x	$S(x)$	$S'n(x)$	P	Εκτίμηση	Λόγος	Παράγοντας
--------	---------	-----	-----	-----	-------	-----	--------	----------	-----	----------	-------	------------

		Θετικών	Αρνητικών	Σωλήνων Αραίωσης	Εμβολίου					Πληθυσμού	Αραίωσης	Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC18#2	1.00E-01	2	1	3	1.00E+00	1.4899	-0.8	-0.75	24.692	14.90	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
CC18#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	10.0779	-0	-0.02	31.551	100.78	10.00	4.67

	1.00E-02	2	1	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S200-0#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
--------	---------	----------------	------------------	----------------------------	-------------------	---	------	--------	---	-----------------------	-------------------	----------------------------

		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S200-0#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	0	3	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S2007#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	4247.7989	-0	0.00	36.90574	42477.99	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							

	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	1	2	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S2007#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	424.9048	-0	0.00	36.90565	4249.05	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	1	2	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							

	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S20018#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2306.2812	-0	0.00	33.83712	23062.81	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S20018#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	92.7577	-0	0.00	31.81663	927.58	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	2	1	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
S20018#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	231.2653	-0	0.00	33.83655	2312.65	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
UL0#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3026	0	-0.37	33.837	23.03	10.00	4.67
	1.00E-02	1	2	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
UL0#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0087	-0.1	-0.06	36.002	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	1	2	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF

UL7#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	23301.2200	-0	0.00	3.3833E+01	233012.20	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
UL7#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	14685.7588	-0	0.00	11.9048	146857.59	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							

	1.00E-05	2	1	3	1.00E-04							
	1.00E-06	1	2	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	a	x	L	R	P		dr	CF
UL18#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.8014E+14	-0	0.00	0.0000	1.8014E+15	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	3	0	3	1.00E-06							
	1.00E-08	1	2	3	1.00E-07							

	1.00E-09	1	2	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
UL18#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.5100E+06	-0	0.00	24.3305	1.5100E+07	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	2	1	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
UL18#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.4469E+05	0	0.00	11.9026	1.4469E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	2	1	3	1.00E-05							
	1.00E-07	1	2	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULR0#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	23.9701	-0	0.00	3.3783E+01	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULR0#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	23.9701	-0	0.00	3.3783E+01	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	0	3	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF

ULR7#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3488E+06	-0	0.00	33.8505	2.3488E+07	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULR7#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0332E+05	-0	0.00	35.9549	5.0332E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							

	1.00E-05	2	1	3	1.00E-04							
	1.00E-06	1	2	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	a	x	L	R	P		dr	CF
ULR18#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0332E+05	-0	0.00	35.9549	5.0332E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	3	0	3	1.00E-06							
	1.00E-08	1	2	3	1.00E-07							

	1.00E-09	1	2	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULR18#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.8014E+14	-0	0.00	0.0000	1.8014E+15	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	2	1	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULR18#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0332E+05	-0	0.00	35.9549	1.4469E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	2	1	3	1.00E-05							
	1.00E-07	1	2	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM0#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	231.2653	-0	0.00	3.3837E+01	50.09	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM0#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	9.2758E+01	-0	0.00	31.8166	9.2758E+02	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	2	1	3	1.00E-02							
	1.00E-04	0	3	3	1.00E-03							
	1.00E-05	0	3	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF

ULRM7#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.4469E+05	0	0.00	11.9026	1.4469E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	0	3	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM7#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.5100E+06	-0	0.00	24.3305	1.5100E+07	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							

	1.00E-05	2	1	3	1.00E-04							
	1.00E-06	1	2	3	1.00E-05							
	1.00E-07	0	3	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM18#1	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	1.6777E+06	-0	0.00	11.6156	1.6777E+07	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	3	0	3	1.00E-06							
	1.00E-08	1	2	3	1.00E-07							

	1.00E-09	1	2	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM18#2	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	5.0332E+05	-0	0.00	35.9549	5.0332E+06	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	3	0	3	1.00E-05							
	1.00E-07	2	1	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							

Δείγμα	Αραίωση	Αρ. Θετικών	Αρ. Αρνητικών	Αρ. Σωλήνων Αραίωσης	Όγκος Εμβολίου	x	S(x)	S'n(x)	P	Εκτίμηση Πληθυσμού	Λόγος Αραίωσης	Παράγοντας Εμπιστοσύνης
		p	q	n	α	x	L	R	P		dr	CF
ULRM18#3	1.00E-01	3	0	3	1.00E+00	2.3488E+06	-0	0.00	33.8505	2.3488E+07	10.00	4.67
	1.00E-02	3	0	3	1.00E-01							
	1.00E-03	3	0	3	1.00E-02							
	1.00E-04	3	0	3	1.00E-03							
	1.00E-05	3	0	3	1.00E-04							
	1.00E-06	2	1	3	1.00E-05							
	1.00E-07	1	2	3	1.00E-06							
	1.00E-08	0	3	3	1.00E-07							
	1.00E-09	0	3	3	1.00E-08							
	1.00E-10	0	3	3	1.00E-09							