

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εξέταση αποτελεσματικότητας της βιοαποδόμησης
πετρελαιοειδών από τρία μικροβιακά κονσόρσια από τον
κόλπο της Ελευσίνας»

ΟΛΓΑ Κ. ΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Καλογεράκης (επιβλέπων καθηγητής)

Δανάη Βενιέρη

Νίκος Πασαδάκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα στη βιοεξυγίανση πετρελαιοειδών σε θαλάσσιο περιβάλλον, μέσω βιοαποδόμησης τους, από τρία μικροβιακά κονσόρσια (E4, E8 και E9) σε ένα πείραμα 28 ημερών. Τα κονσόρσια E4, E8 και E9 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν από δείγματα θαλασσινού νερού τα οποία ελήφθησαν στις 6 Απριλίου 2011, από περιοχή πλησίον των διυλιστηρίων στην Ελευσίνα (Αθήνα, Ελλάδα), μια περιοχή χρόνια εκτεθειμένη σε ρύπανση πετρελαιοειδών. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικοί εμπλουτισμοί και απομονώσεις μέσα σε διάλυμα ONR7, μαζί με πετρέλαιο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή υδρογονανθράκων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του έργου FP-7 ULINEX.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης στηρίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης που ανέπτυξε η EPA (Environmental Protection Agency) [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. Για την επίτευξη των στόχων αυτών το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα μέσω της ανάλυσης του πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) με τη χρήση GC/MS. Ως μέθοδος βιοεξυγίανσης, χρησιμοποιήθηκε η **βιο-ενίσχυσης** (bio-augmentation). Τα κονσόρσια αρχικά προσαρμόστηκαν και αναπτύχθηκαν ξεχωριστά και στη συνέχεια προστέθηκαν σε μίγμα καθαρού θαλασσινού νερού-πετρελαίου. Το πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές δοκιμές ήταν ένα ελαφρύ ιρανικό αργό πετρέλαιο (από την εταιρία Ελληνικά Πετρέλαια, Ασπρόπυργος, Ελλάδα), τεχνητά γηρασμένο σύμφωνα με το πρότυπο ASTM D86 (Standard Test Method for Distillation of Petroleum Product). Το νερό συλλέχτηκε από την περιοχή του Αγ. Ονούφριου (Χανιά, Ελλάδα).

Δειγματοληψίες για τις μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιούνταν σε εβδομαδιαίο επίπεδο και αμέσως μετά ακολουθούσε η προετοιμασία των δειγμάτων για τις χημικές αναλύσεις. Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας στηρίχτηκε στις μεταβολές της συγκέντρωσης των κανονικών αλκανίων, των ισοπρενοειδών και επιλεγμένων αρωματικών συστατικών του πετρελαίου κανονικοποιημένες ως προς ένα βιοδείκτη (χοπάνιο).

ABSTRACT

In this study examined the effectiveness of bioremediation of petroleum in marine environment, through biodegradation by three microbial consortia (E4, E8 and E9), during a 28 days experiment. Consortia E4, E8 and E9 which have been used in this study have been obtained from successive enrichments and isolations in ONR7 medium with crude oil as the sole hydrocarbon source of seawater samples taken on April 6th, 2011 from the Elefsina Refinery (Hellenic Petroleum), a site exposed to chronic oil pollution in Elefsina gulf near Athens, Greece. This work has been conducted under the FP-7 project ULIXES.

The method which has been used for the evaluation of these bioremediation agents is based on a modified bioremediation agent effectiveness testing protocol developed by the EPA (Environmental Protection Agency) [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 as a result of biodegradation. The protocol tests the microbial activity by Most Probable Number (MPN) determination and quantifies the removal of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by GC/MS analysis.

As a method, bio-remediation was achieved by bio-augmentation. The consortia were initially adapted and grown separately and then were added into a mixture of clean seawater and crude oil. The petroleum that was used for the experimental tests, was a light Iranian crude oil (compliment of Hellenic Petroleum Co., Aspropyrgos, Greece) which was artificially weathered according to ASTM D86 standard (Standard Test Method for Distillation of Petroleum Product). The seawater was collected from St. Onoufrios area (Chania, Greece).

Samples for microbial analysis were taken once a week and after that the samples were prepared for chemical analysis. The evaluation of the effectiveness is based on the concentration changes of petroleum ingredients such as n-alkene, pristene-phytene and selected aromatic ingredients, normalized by a biomarker (hopene).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε με σκοπό την εύρεση του πιο αποδοτικού συνδυασμού μικροβιακών πληθυσμών στην αποδόμηση πετρελαιοειδών ως μέσων για αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων σε περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης.

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

- ❖ Στον κ. **Καλογεράκη Νικόλαο**, καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την επιλογή του θέματος, την άριστη συνεργασία καθώς επίσης και για τις συμβουλές αλλά και τη διόρθωση της εργασίας αυτής.
- ❖ Στην κα. **Βενιέρη Δανάη**, επίκουρη καθηγήτρια του Πολυτεχνείου Κρήτης, για το χρόνο που διέθεσε για τη διόρθωση και την εξέταση της εργασίας αυτής.
- ❖ Στον κ. **Πασαδάκη Νίκο**, αναπληρωτή καθηγητή του πολυτεχνείου Κρήτης για τις πολύτιμες συμβουλές και συμπαραστάσή του κατά την εκπόνηση των πειραμάτων, την άριστη συνεργασία, καθώς επίσης και για το χρόνο που διέθεσε για τη διόρθωση και την εξέταση της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- ❖ Την κα. **Νικολοπούλου Μαρία**, μεταδιδακτορική στο εργαστήριο *Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας*, για την καθοδήγηση, την αμέριστη συμπαραστάση, τις πολύτιμες συμβουλές και την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας, καθώς επίσης και για τη πολύτιμη βοήθειά της στην επεξεργασία των μετρήσεων.
- ❖ Την συνάδελφο και συνεργάτιδα, κατά τις πειραματικές δοκιμές, κα **Σπυριδάκη Ελένη**, για την άριστη συνεργασία και τη συμβολή της στην παρούσα εργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω **την οικογένεια μου**, που όλα αυτά τα χρόνια με συμβουλεύει, και με στηρίζει ανελλιπώς και με κάθε τρόπο, σε κάθε απόφαση και επιλογή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΕΤΡΕΛΕΟΚΗΛΙΔΩΝ, ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Σύντομη ιστορία του πετρελαίου.....	9
1.3 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων.....	9
1.4 Συνέπειες πετρελαϊκής ρύπανσης.....	12
1.4.1 Επιπτώσεις στην πανίδα.....	13
1.4.2 Επιπτώσεις στη χλωρίδα.....	14
1.4.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	14
1.4.4 Κοινωνικές επιπτώσεις.....	15
1.4.5 Οικονομικές επιπτώσεις.....	15
1.5 Τεχνικές αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.....	15
1.5.1 Φυσική αποκατάσταση περιβάλλοντος.....	15
1.5.2 Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.....	16
1.5.3 Η τεχνική της Βιοεξυγίανσης ως μέθοδος αντιμετώπισης.....	18
1.5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεξυγίανσης.....	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ

2.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου.....	20
2.2 Φυσικό- Χημικές ιδιότητες πετρελαίου και η σημασία τους.....	24
2.3 Συμπεριφορά πετρελαίου στο περιβάλλον- Διεργασίες Γήρανσης.....	25
2.4 Βιο-αποδόμηση πετρελαίου (Bio-degradation).....	28
2.4.1 Μηχανισμοί βιοαποδόμησης πετρελαίου.....	28
2.4.2 Βιοαποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου.....	29
2.4.3 Παράγοντες που επιδρούν στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου.....	30
2.4.4 Εκτίμηση του βαθμού βιοαποδόμησης πετρελαίου- Εφαρμογή Βιοδεικτών (Biomarkers).....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Περίληψη μεθόδου.....	34
3.2 Θεωρητικό υπόβαθρο.....	35
3.2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	35

3.2.1.1 Μέθοδος MPN.....	35
3.2.1.2 Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού σε τριβλία	35
3.2.2 Χημικές αναλύσεις	35
3.2.2.1 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE)	35
3.2.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).....	36
3.2.2.3 Ανάλυση GC/MS	37
3.2 Δομή του πειράματος.....	42
3.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	42
3.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός μικροβιολογικών αναλύσεων	42
3.3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός χημικών αναλύσεων	43
3.4 Προετοιμασία- Αντιδραστήρια και μέσα καλλιέργειας.....	43
3.4.1 Προετοιμασία θαλασσινού νερού	43
3.4.2 Προετοιμασία πετρελαίου.....	44
3.4.3 Μικροβιακά consortia.....	44
3.5. Προετοιμασία δείγματος.....	45
3.6 Μικροβιολογική ανάλυση	46
3.6.1 Προετοιμασία τριβλίων με Marine agar (θρεπτικού μέσου)	46
3.6.2 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Bushnell-Hass (B.H.)	46
3.6.3 Μικροβιακή απαρίθμηση	46
3.6.3.1 Αραιώσεις.....	46
3.6.3.2 Μέτρηση πληθυσμού μικροοργανισμών στα τριβλία (plate counts)	47
3.6.3.3 Εμβολισμός 96microtiter well mpn plates- MPN.....	47
3.7 Προετοιμασία και μέθοδοι χημικών αναλύσεων.....	48
3.7.1 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE) σε διαχωριστική χοάνη.....	49
3.7.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)- Κλασματοποίηση πετρελαίου	49
3.7.3 Ανάλυση GC-MS	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	
4.1 Δείγμα E4.....	51
4.1.1 Φυσικές παρατηρήσεις.....	51
4.1.2 GC/MS Ανάλυση	51
4.1.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού.....	53
4.2 Δείγμα E8.....	54

4.2.1 Φυσικές παρατηρήσεις.....	54
4.2. 2 GC/MS Ανάλυση	55
4.2.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού.....	57
4.3 Δείγμα E9.....	58
4.3.1 Φυσικές παρατηρήσεις.....	58
4.3.2 GC/MS Ανάλυση	59
4.3.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού.....	61
4.4 Γενικές παρατηρήσεις- Σχόλια.....	62
4.5 Συγκριτικά αποτελέσματα για τα δείγματα E4, E8 και E9.....	63
4.5.1 Φυσικές παρατηρήσεις.....	63
4.5.2 Σύγκριση πληθυσμών.....	63
4.5.3 GC/MS Ανάλυση	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
ΒΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ....	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΕΤΡΕΛΕΟΚΗΛΙΔΩΝ, ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

1.1 Εισαγωγή

Η εξάρτηση της ενεργειακής κάλυψης των σύγχρονων κοινωνιών, από τη χρήση υδρογονανθράκων, γίνεται η αιτία για τη μεταφορά εκατομμυρίων τόνων πετρελαίου ανά έτος δια μέσου θαλάσσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες πετρελαίου να καταλήγουν ετησίως στα θαλάσσια περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι κατά την τετραετία 2010-2013 δημιουργήθηκαν 28 πετρελαιοκηλίδες, από τις οποίες ελευθερώθηκαν στη θάλασσα συνολικά 22,000 τόνοι πετρελαίου (θα πρέπει να σημειωθεί ότι το 90% αυτών των πετρελαιοκηλίδων δημιουργήθηκαν μόνο από 8 περιστατικά) [1].

Ένα μέρος του υλικού που διαρρέει στη θάλασσα αποτελείται από πτητικά συστατικά τα οποία εξατμίζονται σχεδόν άμεσα, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά παραμένουν στο περιβάλλον δημιουργώντας ένα λεπτό στρώμα πετρελαίου, παρεμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις ύδατος- ατμόσφαιρας που είναι απαραίτητες για τον βιολογικό κύκλο της θαλάσσιας ζωής, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τις ευαίσθητες ισορροπίες των θαλάσσιων οικοσυστημάτων.

Κάθε πετρελαιοκηλίδα, ανεξάρτητα από το μέγεθος και τον τρόπο δημιουργίας της, μπορεί να επιφέρει τεράστιες επιπτώσεις, τόσο στο φυσικό περιβάλλον, όσο και στην οικονομία, την κοινωνία αλλά και τον ίδιο τον άνθρωπο. Έτσι από τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη για την ανάπτυξη τεχνολογιών με σκοπό την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί ή βρίσκονται υπό ανάπτυξη αρκετές τεχνικές για το σκοπό αυτό. Μια αρκετά υποσχόμενη και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος για την απομάκρυνση πετρελαιοειδών είναι η βιοεξυγίανση, η οποία πραγματοποιείται μέσω της βιοαποδόμησης των υδρογονανθράκων. Η βιοαποδόμηση (biodegradation) ουσιαστικά αποτελεί μια βιολογική διεργασία, κατά την οποία μικροοργανισμοί- καταναλωτές υδρογονανθράκων διασπούν τις διάφορες ενώσεις του πετρελαίου, μετατρέποντας τις σε πιο απλές και ακίνδυνες για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Η διεργασία της βιοαποδόμησης και η αποτελεσματικότητά της στην βιοεξυγίανση θαλάσσιου περιβάλλοντος, αποτελεί το βασικό αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας.

1.2 Σύντομη ιστορία του πετρελαίου

Το ακατέργαστο ή αργό πετρέλαιο χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο εδώ και αρκετούς αιώνες. Συγκεκριμένα υπάρχουν αναφορές για χρήση πίσσας (μερικών ακόμα προϊόντων πετρελαίου) από τους μεσαιωνικούς ακόμα χρόνους. Η ουσιαστική και σημαντική όμως επεξεργασία πετρελαίου ξεκίνησε κατά τον 19^ο αιώνα, με τη Ρωσία, τη Ρουμανία και την Αμερική να κρατάνε τα ινία της πετρελαϊκής βιομηχανίας.

Η πρώτη γεώτρηση με τρυπάνι καταγράφηκε το 1859 στην Πενσυλβάνια και σήμανε την αρχή της σύγχρονης βιομηχανίας πετρελαίου. Μικρές και απλές εγκαταστάσεις επεξεργασίας πετρελαίου άρχισαν να κάνουν την εμφάνισή τους κοντά σε πετρελαιοπηγές. Σταδιακά οι εγκαταστάσεις αυτές άρχισαν να μεγαλώνουν και να χρησιμοποιούν νέες τεχνολογίες, για την εποχή, για την επεξεργασία του πετρελαίου. Η διεργασία της συνεχούς απόσταξης, η οποία χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά στο Μπακού της Ρωσίας (1875) αποτέλεσε σημαντική πρόοδο στην επεξεργασία του πετρελαίου.

Κατά τα πρώτα πενήντα χρόνια της βιομηχανίας πετρελαίου, κυριότερο προϊόν, με τη μεγαλύτερη ζήτηση, αποτελούσε η κηροζίνη (φωτιστικό πετρέλαιο), ενώ κατά την ίδια περίοδο τα ελαφρύτερα και βαρύτερα προϊόντα της απόσταξης (δηλ η βενζίνη και τα υπολείμματα) οδηγούνταν για καύση, καθώς δεν είχαν κάποια χρησιμότητα. Ο 20^{ος} αιώνας όμως, με την ραγδαία εξάπλωση της ηλεκτρικής ενέργειας και την ανάπτυξη της αυτοκινητοβιομηχανίας, οδήγησε σε πλήρη μετατόπιση των απαιτήσεων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ζήτησης κηροζίνης και την ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση βενζίνης. Επίσης κατά τη διάρκεια του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην ζήτηση βενζίνης και ντίζελ η οποία συνεχίστηκε έως τη δεκαετία του '30. Παράλληλα η κατασκευή και επέκταση του οδικού δικτύου αύξησαν τις απαιτήσεις σε πίσσα.

Η συνεχόμενη βελτίωση στην επεξεργασία του πετρελαίου και η βελτίωση της απόδοσης των προϊόντων του είχαν σαν αποτέλεσμα την ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση και χρησιμοποίηση των προϊόντων πετρελαίου. Η αύξηση στη ζήτηση του πετρελαίου κορυφώθηκε κατά τις δεκαετίες από το 1950-1980, όπου σχεδόν πενταπλασιάστηκε.

Το οικονομικοπολιτικό σκηνικό που επικράτησε μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, καθώς επίσης η ίδρυση του ΟΠΕΚ (Οργανισμός Πετρελαιο Εξαγωγικών Κρατών, 1960) έφεραν σημαντικές εξελίξεις για το διεθνές εμπόριο και τη μεταφορά πετρελαίου[2].

1.3 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων

Η μεταφορά αργού πετρελαίου προς τα διυλιστήρια γίνεται συνήθως με δεξαμενόπλοια και αγωγούς, ενώ στη συνέχεια αποθηκεύεται σε δεξαμενές μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας του. Για το λόγω αυτό τα διυλιστήρια αυτά είναι συνήθως κατασκευασμένα πλησίον παράκτιων περιοχών. Πολλές φορές ατυχήματα ή διαρροές από τις εγκαταστάσεις μεταφοράς και αποθήκευσης οδηγούν στην απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων πετρελαίου σε θάλασσες και ακτές. Επίσης η μεταφορά πετρελαίου με πετρελαιοφόρα για εμπορικούς σκοπούς, καθώς επίσης και η γενικότερη αύξηση της ναυτιλιακής δραστηριότητας (αλιεία, μεταφορές, πολεμικές επιχειρήσεις) σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν

αυξήσει κατά πολύ τα επίπεδα της θαλάσσιας πετρελαϊκής ρύπανσης. Τα τελευταία 40 χρόνια έχουν σημειωθεί χιλιάδες ατυχήματα, σε ολόκληρο τον κόσμο, ορισμένα εκ των οποίων έχουν προκαλέσει τεράστια οικολογική καταστροφή στα υδάτινα οικοσυστήματα. Πετρελαϊκές διαρροές που προκαλούνται σε ποτάμια, κόλπους και ωκεανούς, προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενή δραστηριότητα, από ατυχήματα σε δεξαμενόπλοια, ποταμόπλοια, αγωγούς, διυλιστήρια καθώς και σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης.[5]

Οι αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν ατύχημα και κατ' επέκταση εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας μπορεί να οφείλονται σε:

- Προσάραξη
- Σύγκρουση
- Φωτιά και έκρηξη
- Βύθιση
- Λάθος κατά τη μεταφορά πετρελαίου
- Ανθρώπινο λάθος ή Απροσεξία
- Καταστροφή εξοπλισμού.
- Άλλα ατυχήματα (π.χ. πολεμικές επιχειρήσεις, μηχανικές ή δομικές αστοχίες, διαρροές σε επίγειους αγωγούς, φυσικές καταστροφές κ.α.). [5][6]

Δύο από τα σημαντικότερα ατυχήματα που έχουν σημειωθεί είναι: το ατύχημα του πετρελαιοφόρου Exxon Valdez (Μάρτιος 1989) στην περιοχή της Αλάσκας των ΗΠΑ και το ατύχημα που προκλήθηκε από έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon (Απρίλιος 2010) στον κόλπο του Μεξικού σε απόσταση περίπου 50 ναυτικά μίλια νοτιοδυτικά του ποταμού Μισισσιπή.

Το πρώτο ατύχημα είχε σαν αποτέλεσμα να απελευθερωθούν στη θάλασσα 11εκ. γαλόνια (42εκ, λίτρα) πετρελαίου καθιστώντας το, ως το καταστροφικότερο ατύχημα έως τότε της Αμερικής, καθώς η συνολική έκταση της πετρελαιοκηλίδας υπολογίστηκε στα 11.000 τετραγωνικά ναυτικά μίλια. Περίπου 486 μίλια (778 χλμ) της ακτογραμμής του πορθμού Prince William στην Αλάσκα και 818 μίλια (1309 χλμ) της ακτογραμμής του κόλπου της Αλάσκας καλύφθηκαν (κατά μέρη) με πετρέλαιο. Για το δεύτερο ατύχημα ο πραγματικός όγκος του πετρελαίου και του αερίου που απελευθερώθηκε από την έκρηξη ήταν δύσκολο να υπολογιστεί, εκτιμάται όμως ότι απελευθερώθηκαν στο περιβάλλον 205,8εκ γαλόνια (780εκ λίτρα) πετρελαίου, καθιστώντας το ατύχημα αυτό ως το δεύτερο μεγαλύτερο παγκοσμίως [3]. Στις εικόνες 1-1 και 1-2 φαίνονται εικόνες από τα δύο ατυχήματα.



Εικόνα 1-1: Προσάραξη δεξαμενόπλοιο Exxon Valdez στον πρθμό Prince William, Αλάσκα. (NOAA)



Εικόνα 1-2: Έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon στον Κόλπο του Μεξικού (BBC, 2013).

Exxon Valdez

41.6 million liters

North Slope Heavy Oil (API 29)

tanker spill with known volume

discharged as surface spill

on Bligh (near island shorelines)

impacted cobble/rocky shorelines, major storm in area with 50 mph winds 2 days after spill

bioremediation used extensively

fate of oil remnants still studied more than 21 years after spill

much scientific and operating experience gained is applicable to other spills

BP Deepwater Horizon

779 million liters estimated by the National Incident Command's Flow Rate Technical Group (FRTG)

Light Louisiana Oil (API 35.2)

well leak with uncertain flow rates, large amounts of methane also released discharged at well head in 1500 m of seawater

77 km offshore

impacted deep-sea cloud of fine droplets of low concentration oil, marshes and sandy beach shorelines, 84 days to stop leak

aerial and subsurface dispersants used extensively

fate of oil remnants yet to be determined

largest remediation and emergency response to an oil spill ever, worldwide

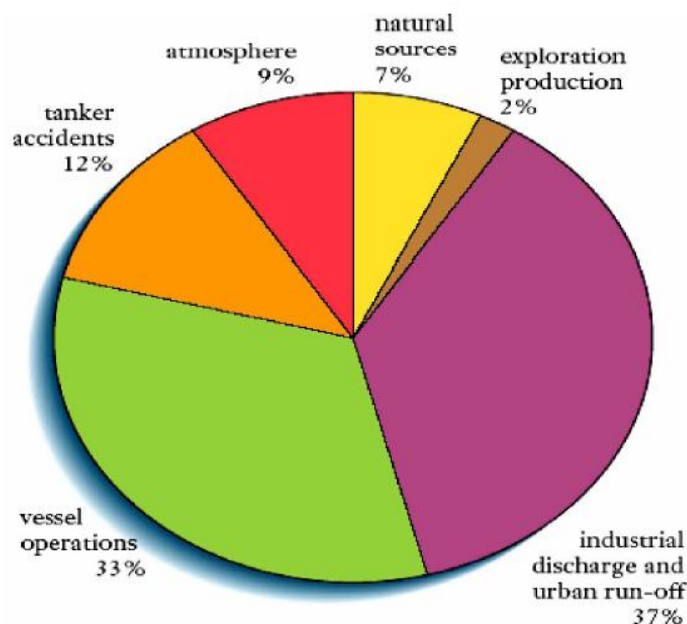
Εικόνα 1-3: Σύγκριση ατυχημάτων Exxon Valdez και BP Deepwater Horizon [3].

Αρκετά ατυχήματα έχουν σημειωθεί και στον ελλαδικό χώρο. Δεδομένου ότι η Ελλάδα αποτελεί γεωγραφικό «πέρασμα» των θαλάσσιων μεταφορών Ασίας και Ευρώπης, αλλά και λόγω της ναυτιλιακής δραστηριότητας της ίδιας της χώρας μας, η ναυτιλιακή κινητικότητα των ελληνικών θαλασσών (και γενικότερα της μεσογείου) είναι ιδιαίτερος αυξημένη, γεγονός που με τη σειρά του αυξάνει τον κίνδυνο πετρελαϊκής ρύπανσης.

Δύο από τα πιο σημαντικά ατυχήματα που συνέβησαν στον ελλαδικό χώρο αποτελούν το ατύχημα του πετρελαιοφόρου «Irenes Serenade» στην περιοχή της Πύλου στην Πελοπόννησο (Φεβρουάριος 1980), το οποίο είχε σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση 40.000 τόνων πετρελαίου στην περιοχή, και το πρόσφατο ατύχημα της καταβύθισης του κρουαζιερόπλοιου «Sea Diamond» στην περιοχή Καλδέρα της Σαντορίνης (Απρίλιος 2007).[4]

Σύμφωνα με τα παραπάνω και λόγω της αυξημένης δημοσιοποίησης και προβολής των σχετικών ατυχημάτων από τα ΜΜΕ, δημιουργείται η αντίληψη ότι τα ατυχήματα των δεξαμενόπλοιων αποτελούν την κυριότερη αιτία πετρελαϊκής ρύπανσης. Η αντίληψη αυτή διαψεύδεται από στατιστικά στοιχεία των Ηνωμένων Εθνών, σύμφωνα με τα οποία τα ατυχήματα αυτά καταλαμβάνουν περίπου το 26% του συνολικού πετρελαίου που διαρρέει στις θάλασσες [4]. Ως κυριότερη αιτία ρύπανσης αναφέρεται η ρύπανση που προκαλείται από τις συνήθεις λειτουργικές εργασίες (επιχειρησιακή ρύπανση) και από λειτουργικές διαρροές. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε διαδικασίες ρουτίνας, οι απώλειες ενός δεξαμενόπλοιου υπολογίζονται περίπου ίσες με 0,53εκ. μετρικών τόνων/έτος. Επίσης αρκετοί πλοιοκτήτες για οικονομικούς λόγους δεν τηρούν τις προδιαγραφές λειτουργίας και πλεύσης (π.χ. καθαρισμός και έκπλυση δεξαμενών «εν πλώ» και όχι σε ειδικούς χώρους στα λιμάνια όπως επιβάλλεται από τους διεθνείς κανονισμούς), γεγονός που αυξάνει τις πετρελαϊκές διαρροές.

Στην εικόνα 1-4 φαίνεται συγκριτικό διάγραμμα των κυριότερων αιτιών εισαγωγής πετρελαίου στα θαλάσσια οικοσυστήματα.



Εικόνα 1-4: Κύριες αιτίες εισαγωγής πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον.
(International Petroleum Industry Environmental Conservation Association, 2000.)

1.4 Συνέπειες πετρελαϊκής ρύπανσης

Τα διάφορα περιστατικά πετρελαιοκηλίδων έχουν προκαλέσει μεγάλες επιπτώσεις, τόσο στο περιβάλλον όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Φυσικά δεν έχουν όλες οι πετρελαιοκηλίδες τις ίδιες καταστροφικές συνέπειες. Το μέγεθος της καταστροφής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μερικοί από τους σημαντικότερους είναι οι εξής:

- **Το σημείο εκδήλωσης και ο τύπος της ακτής.** Υπάρχουν ορισμένα σημεία και περιοχές που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία κατά την έκθεσή τους σε πετρελαιοειδή. Η ευαισθησία αυτή εξαρτάται τόσο από τον τύπο της ακτής σε σχέση με τη διεισδυτική ικανότητα του πετρελαίου στο υπόστρωμά της, όσο και από την ύπαρξη ευαίσθητων πληθυσμών χλωρίδας και πανίδας στην περιοχή. Στον πίνακα 1-1 φαίνεται η κατηγοριοποίηση των ακτών με βάση την ευαισθησία του ως προς το πετρέλαιο.
- **Η ποσότητα του διαρρέοντος πετρελαίου και ο τρόπος σχηματισμού πετρελαιοκηλίδας.** Η ξαφνική εμφάνιση μιας μικρής πετρελαιοκηλίδας θα προκαλέσει (πιθανώς) μικρότερο οικολογικό πρόβλημα (ακόμα και σε μια σχετικά ευαίσθητη περιοχή), σε σχέση με μια πετρελαιοκηλίδα που προκαλείται από χρόνια ρύπανση. Αυτό οφείλεται στους φυσικούς μηχανισμούς του περιβάλλοντος για σταδιακή φυσική αποκατάσταση.
- **Ο τύπος του πετρελαίου.** Γενικά τα ελαφρά κλάσματα του πετρελαίου είναι λιγότερο τοξικά σε σχέση με τα βαρύτερα. Επίσης υπάρχουν πετρέλαια τα οποία δεν απομακρύνονται εύκολα, και παρόλο ότι έχουν σχετικά μικρή τοξικότητα είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα.
- **Οι επικρατούσες καιρικές συνθήκες.** Έντονες καιρικές συνθήκες όπως ισχυρός άνεμος, μεγάλα κύματα, εκτεταμένη ηλιοφάνεια κ.α. επηρεάζουν τις φυσικές

διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου και συνεπώς τις διαδικασίες βιοεξυγίανσης του.

Ανεξάρτητα όμως από το μέγεθος της καταστροφής η εμφάνιση πετρελαιοκηλίδων επιφέρει πολύπλευρες επιπτώσεις στην περιοχή στην οποία εμφανίζονται. Οι επιπτώσεις αυτές αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

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

Πίνακας 1-1: Κατηγοριοποίηση ακτών με βάση τον βαθμό ευαισθησίας τους στο πετρέλαιο σε σειρά αύξουσας ευαισθησίας (το 1 αντιστοιχεί στην πιο ανθεκτική, ενώ το 10 στην πιο ευαίσθητη κατηγορία ακτής) [7]

1.4.1 Επιπτώσεις στην πανίδα

Ως πανίδα ορίζεται το σύνολο των ζωικών ειδών ενός (χερσαίου ή υδάτινου) οικοσυστήματος. Στην περίπτωση του υδάτινου (θαλάσσιου) οικοσυστήματος στην ομάδα αυτή κατατάσσονται τα θαλάσσια θηλαστικά (φώκες, θαλάσσιες βίδρες, φάλαινες δελφίνια κ.α.), θαλάσσια πτηνά (θαλασσοπούλια ή άλλα υδρόβια πτηνά), τα ψάρια, τα μαλάκια (καλαμάρια, αχιβάδες, χταπόδια, σαλιγκάρια, στρείδια, μύδια κ.α.) και το ζωοπλαγκτόν.

Οι σημαντικότερες επιπτώσεις στην πανίδα είναι:

- Κάλυψη του τριχώματος, του δέρματος ή των φτερών με πετρέλαιο, με αποτέλεσμα την πτώση της θερμοκρασίας του σώματος, την εμφάνιση αλλοιώσεων στο δέρμα και δυσκολία στο πέταγμα. Η πτώση της θερμοκρασίας σώματος οδηγεί σε καταστροφή του λιπώδη ιστού και κατ' επέκταση σε αδυνάτισμα λόγω της προσπάθειας του οργανισμού να διατηρήσει την θερμοκρασία του. Επίσης τα πτηνά

τα φτερά τον οποίον έχουν καλυφθεί με πετρέλαιο υποφέρουν από αφυδάτωση και έλλειψη τροφής καθώς δεν μπορούν ούτε να βουτήξουν για να τραφούν ούτε να κολυμπήσουν.

- Αλλοιώσεις στην όραση και την όσφρηση γεγονός που μπορεί να τα απομακρύνει από το κοπάδι.
- Παθολογικές βλάβες εσωτερικών οργάνων από κατάποση ή μακροχρόνια έκθεση.
- Μείωση ανάπτυξης και ανάπλασης ιστών ή ακόμα και τερατογενέσεις.

Δεν παρουσιάζουν όλα τα ήδη την ίδια ευαισθησία, καθώς επίσης και στα ίδια ήδη σημαντικό ρόλο παίζει και το στάδιο της ανάπτυξης του οργανισμού κατά την περίοδο της έκθεσης (πχ παράδειγμα τα νεογνά είναι πιο ευαίσθητα και ευάλωτα στην τοξικότητα σε σχέση με τα ενήλικα άτομα κάθε είδους).

1.4.2 Επιπτώσεις στη χλωρίδα

Ως χλωρίδα ορίζεται το σύνολο των φυτικών ειδών ενός (χερσαίου ή υδάτινου) οικοσυστήματος. Στην περίπτωση του υδάτινου (θαλάσσιου) οικοσυστήματος στην ομάδα αυτή κατατάσσονται όλα τα είδη παράκτιων φυτών (π.χ. αρμυρίκια), όλα τα φύκη και το φυτοπλαγκτόν.

Οι σημαντικότερες επιπτώσεις στην χλωρίδα είναι:

- Προσκόλληση πετρελαίου στα φύλλα, το οποίο δεν απομακρύνεται με την παλίρροια, με αποτέλεσμα την μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητάς τους και κατ' επέκταση το σταδιακό κιτρίνισμα των φύλλων και τελικά νέκρωση του φυτικού οργανισμού.
- Εισχώρηση πετρελαίου στο χώμα, το οποίο επηρεάζει το ριζικό σύστημα, τους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους και τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου.

Για ρύπανση μικρής έκτασης η αποκατάσταση του φυσικού περιβάλλοντος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι πολύ μικρές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων (της τάξης του 50ng/g) επιταχύνουν τις φωτοσυνθετικές διεργασίες του φυτοπλαγκτόν, ίσως γιατί επιδρούν ως θρεπτικά.

1.4.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Επικίνδυνες τοξικές ουσίες (υδρογονάνθρακες, ρητίνες, ασφαλτίνες κ.α.) μπορούν να εισαχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της εισπνοής, του δέρματος, των βλεννογόνων αδένων και σε μικρότερο βαθμό μέσω της πέψης. Οι υδρογονάνθρακες μολύνουν κυρίως της πνεύμονες και όργανα με μεγάλο ποσοστό λίπους. Από τον μεταβολισμό των ουσιών αυτών είναι πιθανό να παραχθούν μεταβολίτες οι οποίοι μπορεί να απομακρυνθούν με τα ούρα.

Οι κυριότερες επιπτώσεις την ανθρώπινη υγεία είναι:

- Σε περιπτώσεις διαρκούς έκθεσης: νευρολογικά συμπτώματα, πονοκέφαλοι, ναυτία, ζάλη, υπνηλία, δύσπνοια, εμετός και κοιλιακοί πόνοι. Ορισμένα πτητικά συστατικά μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο του δέρματος
- Άμεσες επιπτώσεις: πονοκέφαλοι, ερεθισμοί στα μάτια, δύσπνοια, ενοχλήσεις στην ρινική και λαρυγγική κοιλότητα, δερματίτιδα και πόνοι στην πλάτη.

Οι παραπάνω επιπτώσεις μπορεί να προκληθούν είτε με άμεση έκθεση του ατόμου στην εστία της ρύπανσης (λόγο διαμονής ή εργασίας στην περιοχή) ή και έμμεσα με κατανάλωση μολυσμένων ψαριών.

1.4.4 Κοινωνικές επιπτώσεις

Η εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας σε μια θαλάσσια περιοχή συντελεί στην άμεση υποβάθμισή της καθώς κρίνεται ακατάλληλη για χρήση. Η μη ελεύθερη χρήση των ακτών και συνεπώς η μη ελεύθερη πραγματοποίηση ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (π.χ. κολύμπι, αθλητικές δραστηριότητες, βόλτα, ψάρεμα κλπ), καθώς επίσης και η οπτική όχληση που δημιουργείται προκαλούν υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των κατοίκων.

1.4.5 Οικονομικές επιπτώσεις

Περιοχές οι οποίες στηρίζονται στην αλιεία, τις ιχθυοκαλλιέργειες ή τον τουρισμό είναι πιθανόν να πληγούν σημαντικά από την εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας. Η μείωση του πληθυσμού των ψαριών, τα κακής ποιότητας αλιεύματα, και η υποβάθμιση των ακτών (οπτικά και ποιοτικά) οδηγούν σε μείωση των εισοδημάτων των αντίστοιχων επαγγελματιών (ψαράδες, ξενοδόχοι κλπ) και κατ' επέκταση οικονομική υποβάθμιση της ευρύτερης περιοχής.

Επίσης θα πρέπει να καταναλωθούν επιπλέον χρηματικά ποσά (από κρατικούς φορείς) για τις διεργασίες καθαρισμού και αποκατάστασης του περιβάλλοντος. Οι διεργασίες αυτές περιλαμβάνουν: τις αμοιβές των εργατών, την αγορά ή ενοικίαση του κατάλληλου εξοπλισμού και υλικών, έξοδα για μέσα μεταφοράς (πλωτά, χερσαία, εναέρια), έξοδα για την προσωρινή αποθήκευση του περισυλλεγμένου πετρελαίου, έξοδα για την επιστημονική παρακολούθηση και καταγραφή των άμεσων και μακροπρόθεσμων επιπτώσεων μέσω ερευνών στο πεδίο.

1.5 Τεχνικές αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων

1.5.1 Φυσική αποκατάσταση περιβάλλοντος

Αμέσως μετά την εισαγωγή πετρελαίου στο περιβάλλον, λαμβάνουν χώρα διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες που οδηγούν στη σταδιακή εξασθένηση των συστατικών του. Ανάλογα με την αντίδρασή τους σε αυτές τις διεργασίες τα πετρελαιοειδή μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, στα εμμένοντα (persistent) και στα μη εμμένοντα (non persistent). Εμμένοντα ονομάζονται εκείνα που, τα οποία λόγω της χημικής τους σύστασης, μετά τη διαρροή τους στη θάλασσα αποικοδομούνται και εξαπλώνονται με πολύ αργούς ρυθμούς. Αντίστοιχα, τα μη εμμένοντα, μπορούν να διασκορπιστούν και να εξατμιστούν φυσικά με γρήγορους ρυθμούς, οδηγώντας σταδιακά στην σχεδόν ολική αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

Έτσι σε ορισμένες περιπτώσεις (όπως πετρελαιοκηλίδες σε απόμακρες ή απρόσιτες περιοχές ή σε περιπτώσεις όπου υπάρχει κίνδυνος οι ενέργειες καθαρισμού- cleanup action-

να προκαλέσουν μεγαλύτερη ζημία), και εφόσον η σύσταση του πετρελαίου είναι τέτοια ώστε να ευνοείται η φυσική αποκατάσταση, κρίνεται αποδεκτό, να μην εφαρμοστεί καμία τεχνική αντιμετώπισης (leave alone action) πετρελαιοκηλίδων. Φυσικά στην περίπτωση που ως μέθοδος εξυγίανσης επιλέγεται η φυσική αποκατάσταση, είναι απαραίτητη η εφαρμογή κατάλληλου προγράμματος παρακολούθησης, από ειδικά καταρτισμένο προσωπικό, έτσι ώστε να αξιολογείται η απόδοση της μεθόδου.

1.5.2 Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων

Όπως προαναφέρθηκε, οι πετρελαϊκές διαρροές (ανεξαρτήτως προέλευσης και μεγέθους), επιβαρύνουν κάθε χρόνο τα θαλάσσιο περιβάλλον με αρκετούς τόνους πετρελαιοειδών, προκαλώντας τεράστιες οικολογικές καταστροφές. Έτσι από όλα τα παραπάνω προκύπτει επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη κατάλληλης αντιρρυπαντικής τεχνολογίας, με στόχο την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων.

Αρκετοί κυβερνητικοί κανονισμοί έχουν οριστεί από τις διάφορες χώρες με σκοπό την πρόληψη και την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων στα υπεράκτια περιβάλλοντα, οι οποίοι σχετίζονται κυρίως με τον μηχανικό εξοπλισμό και την θεσμοθέτηση ελέγχων ασφαλείας. Τα μέτρα αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων έχουν ως κύριους στόχους τους την αποτροπή της μεταφοράς της διαρροής στην ακτή, η περιορισμός των επιπτώσεων στη θαλάσσια ζωή καθώς επίσης και η αποδόμηση των συστατικών του εναπομείναντος πετρελαίου[8]. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί αρκετές φυσικές, χημικές, θερμικές και βιολογικές μέθοδοι για το σκοπό αυτό, ορισμένες εκ των οποίων βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο και έχουν συμπληρωματικό χαρακτήρα.

Οι συνηθέστερες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται είναι δύο: η προσθήκη χημικών ουσιών διασποράς και η ανάκτηση του πετρελαίου. Στην πρώτη περίπτωση η προσθήκη των χημικών (chemical dispersants) μπορεί να γίνει είτε από αέρος (με χρήση γεωργικών αεροπλάνων), είτε από τη θάλασσα με χρήση πλοιαρίων. Τα χημικά προστίθενται με στόχο την ενίσχυση της φυσικής διασποράς του πετρελαίου και περιέχουν μια τασιενεργή ουσία και ένα διαλύτη. Η μέθοδος αυτή είναι επιτυχής όταν το ιξώδες των επιπλέοντων συστατικών του πετρελαίου είναι χαμηλό. Στη δεύτερη περίπτωση ο περιορισμός και η ανάκτηση επιπλέοντος πετρελαίου (containment and recovery of floating oil) γίνεται με χρήση ειδικών πλοιαρίων (σάρωθρα-skimmers) και φραγμάτων (booms) και μπορεί να εφαρμοστεί εξίσου πλησίον ακτής και σε ανοιχτή θάλασσα.[4] [5] [9]

Εκτός από τις παραπάνω έχουν αναπτυχθεί και άλλες, εναλλακτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων όπως η επιτόπου καύση (in situ burning) και η βιολογική αποκατάσταση- **βιοεξυγίανση** (bioremediation).

Με τη μέθοδο της ελεγχόμενης καύσης της πετρελαιοκηλίδας, δημιουργείται ένα στερεό υπόλειμμα το οποίο είτε καταβυθίζεται είτε συλλέγεται με κατάλληλα μηχανήματα. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, τόσο λόγω των προβλημάτων στην εφαρμογή της (δυσκολία ανάφλεξης πετρελαίου κάτω από ορισμένες συνθήκες) όσο και λόγω των αρκετών περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκαλεί.

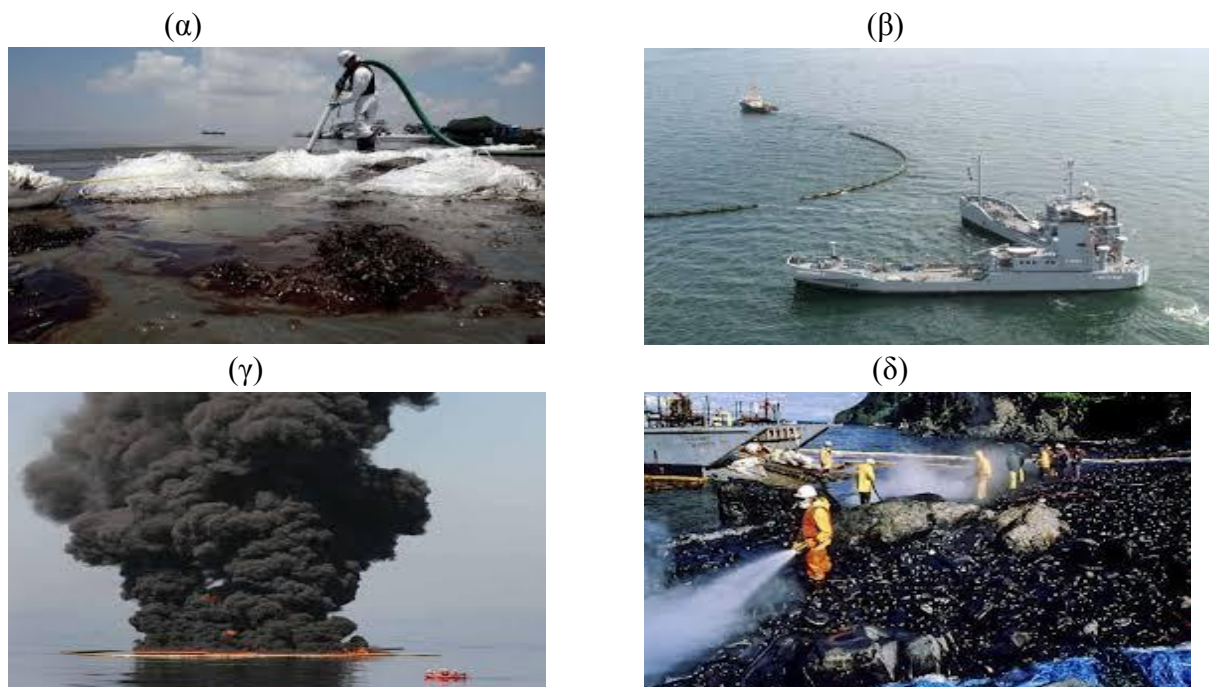
Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης αποτελεί μια βιολογική μέθοδο η οποία με τη βοήθεια της ανθρώπινης παρέμβασης, στοχεύει στην αύξηση του ρυθμού φυσικής βιοδιάσπασης του

πετρελαίου. Η μέθοδος αυτή αποτελεί κυρίως δευτερεύουσα- βοηθητική τεχνική και θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω.

Οι παραπάνω τεχνολογίες και μέθοδοι, αναφέρονται κυρίως στην αντιμετώπιση πετρελαιοϊκής ρύπανσης στην θάλασσα. Για τον καθαρισμό των ακτών από πετρελαιοκηλίδες (shoreline clean-up) έχουν αναπτυχθεί εξίσου αρκετές μέθοδοι. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό της ακτογραμμής είναι: η ανάκτηση του πετρελαίου που έφτασε στην ακτή με χειρονακτική εργασία ή χρήση αντλιών κενού και η πλύση των βράχων με θαλασσινό νερό και περισυλλογή του πετρελαίου με χρήση skimmers και booms. Ακόμα, αν κριθεί απαραίτητο, μπορεί χρησιμοποιηθεί ζεστό νερό υπό πίεση ή και χημικά διασποράς. [5][9][7]

Φυσικά δεν είναι όλες οι μέθοδοι κατάλληλες για κάθε περίπτωση. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου θα εξαρτηθεί: από τον τύπο του πετρελαίου, από τα φυσικά, βιολογικά και οικονομικά χαρακτηριστικά και την τοποθεσία της διαρροής, τις καιρικές και τις θαλάσσιες συνθήκες, το μέγεθος της διαρροής, το βάθος της στήλης του νερού, την εποχή του χρόνου και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Από τη συγκριτική ανάλυση που έχει πραγματοποιηθεί από σχετικές μελέτες ως πιο αποδοτική μέθοδος αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδας προκύπτει η συνδυαστική εφαρμογή μηχανικών μέσων και ουσιών διασποράς ακολουθούμενα από μεθόδους βιοεξυγίανσης [8].

Παρακάτω φαίνονται εικόνες από την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων στο πεδίο.



Εικόνα 1-5: (α) Χειρονακτική συλλογή πετρελαίου με μηχανικά μέσα. (β) Περιορισμός και συλλογή πετρελαίου με skimmers και booms. (γ) Καύση πετρελαιοκηλίδας. (δ) Έκπλυση πετρελαιοκηλίδας με νερό υπό πίεση.

1.5.3 Η τεχνική της Βιοεξυγίανσης ως μέθοδος αντιμετώπισης

Όπως προαναφέρθηκε η μέθοδος της βιοεξυγίανσης, αποτελεί μια από τις υπό ανάπτυξη μεθόδους για την αντιμετώπιση της πετρελαϊκής ρύπανσης σε θαλάσσια περιβάλλοντα. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί δευτεροβάθμια επιλογή επεξεργασίας (secondary treatment option), οι πειραματικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι αρκετά ελπιδοφόρες.

Η μέθοδος συγκαταλέγεται στις βιολογικές μεθόδους και στηρίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό των συστατικών του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπώμενο στην φύση λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών- καταναλωτών υδρογονανθράκων. Οι καταναλωτές αυτοί μπορεί να είναι βακτήρια ή μύκητες και μπορεί να είναι είτε αυτόχθονες, είτε να αναπτύσσονται σε άλλο σημείο και να μεταφέρονται στη συνέχεια στην περιοχή της ρύπανσης. Υπάρχουν και άλλα είδη μικροοργανισμών με την ικανότητα να καταναλώνουν υδρογονάνθρακες, όχι όμως με πολύ σημαντικά αποτελέσματα βιοαποδόμησης. Οι μικροοργανισμοί για την αποσύνθεση των οργανικών ενώσεων χρησιμοποιούν ως καταλύτες κατάλληλα ένζυμα (πρωτεΐνες) τα οποία παράγουν τα ίδια. Το τελικό προϊόν της διεργασίας της βιοαποδόμησης είναι, διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), βιομάζα και νερό (H_2O). Σε ορισμένες περιπτώσεις ατελούς αποσύνθεσης μπορεί να παραχθούν και άλλες ενώσεις όπως μεθάνιο, υδρόθειο, και ενώσεις αζώτου και θείου. Η βιοεξυγίανση μπορεί να εφαρμοστεί με τους εξής δυο τρόπους: α) **βιοδιέγερση (biostimulation)** και β) **βιοενίσχυση (bioaugmentation)**.

BIO-ΔΙΕΓΕΡΣΗ (BIOSTIMULATION): Πρόκειται για την προσθήκη ειδικών θρεπτικών ουσιών (N, P και O_2), οι οποίες συνήθως αποτελούν περιοριστικό παράγοντα της επιβίωσης των μικροοργανισμών. Η προσθήκη των ουσιών αυτών γίνεται κυρίως μέσω οργανικών ή ανόργανων λιπασμάτων, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η αναλογία άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου ($\text{C:N:P} = 120:10:1 \text{ mol}$), που απαιτείται για την επιβίωση, την ανάπτυξη και την εκτέλεση των βασικών μεταβολικών λειτουργιών των καταναλωτών. Οι πιο ευρέως διαδεδομένες μορφές λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται είναι τα βραδείας αποδέσμευσης και τα ελαιοφιλικά (slow-release and oleophilic fertilizers).

BIO-ΕΝΙΣΧΥΣΗ (BIOAUGMENTATION): Πρόκειται για την προσθήκη εξειδικευμένων γηγενών (ABA- Autochthonous Bio-Augmentation) ή μη μικροοργανισμών, με σκοπό την ενίσχυση της ήδη υπάρχουσας μικροβιακής κοινότητας, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διασπούν τα περισσότερα συστατικά των πετρελαιοειδών. Αυτή η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού επιτυγχάνει έναν υψηλό ρυθμό βιοδιάσπασης. Για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι απαραίτητη η εξασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών για την επιβίωση και την εκτέλεση των μεταβολικών λειτουργιών των μικροοργανισμών.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο πεδίο για την σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων. Το πόρισμα που προκύπτει από τη σύγκριση αυτή είναι ότι η αποκλειστική

προσθήκη θρεπτικών έχει καλύτερα αποτελέσματα στην διάσπαση του πετρελαίου συγκριτικά με την προσθήκη μόνο μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα υπάρχει μια όλο και αυξανόμενη πεποίθηση ότι η μέθοδος της βιοενίσχυσης βελτιστοποιείται με τη χρήση γηγενών μικροοργανισμών (ABA) [10]

1.5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεξυγίανσης

Όπως κάθε μέθοδος, έτσι και η βιοεξυγίανση παρουσιάζει εξίσου πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία πρέπει να εκτιμώνται και να αξιολογούνται κατά την εφαρμογή της, καθώς οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι καθοριστικοί για την καταλληλότητα της ή μη ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες.

Τα βασικότερα **πλεονεκτήματα** της μεθόδου είναι τα εξής:

- Αποτελεί φυσική διεργασία γεγονός που την καθιστά ευκολότερα αποδεκτή από το ευρύ κοινό καθώς δεν προκαλεί περαιτέρω ρύπανση (όπως προαναφέρθηκε δίνει ως τελικά προϊόντα CO_2 , H_2O και βιομάζα). Η ενίσχυση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση του περιβάλλοντος, λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη διάρκεια εμφάνισης της ρύπανσης.
- Προκαλεί ελάχιστη φυσική διάσπαση της περιοχής, με σχεδόν μηδενικές επιπτώσεις αν εφαρμοστεί σωστά.
- Εμφανίζεται αρκετά αποδοτική στην αποδόμηση μεγάλου αριθμού οργανικών ενώσεων, μετατρέποντας ένα μεγάλο αριθμό επικίνδυνων και τοξικών συστατικών του πετρελαίου σε ακίνδυνα, επιλύοντας έτσι και το πρόβλημα της μελλοντικής διάθεσης και διαχείρισης του ρύπου.
- Η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται επιτόπου στο σημείο της ρύπανσης (*on site*), έτσι αποφεύγεται η συλλογή και η μεταφορά του ρύπου από ένα μέσο σε ένα άλλο, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο αρκετά απλή αλλά και σημαντικά οικονομικότερη στην εφαρμογή της σε σχέση με άλλες τεχνικές.

Τα σημαντικότερα **μειονεκτήματα** της μεθόδου είναι τα εξής:

- Αποτελεί μια σχετικά αργή μέθοδο. Παρά το γεγονός ότι μπορεί να λειτουργήσει πιο γρήγορα από τη φυσική βιοδιάσπαση, δεν εμφανίζει σύντομα σημαντικά αποτελέσματα, ειδικά σε σχέση με άλλες μεθόδους, έτσι η εφαρμογή της δεν ενδείκνυται για περιπτώσεις όπου απαιτείται άμεση αποκατάσταση.
- Είναι αναποτελεσματική για ρύπανση σε ανοιχτή θάλασσα λόγω αυξημένης διάχυσης.
- Επίσης σε περιπτώσεις «βαριάς» ρύπανσης εφαρμόζεται ως δευτερεύουσα και συμπληρωματική μέθοδος καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική.
- Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου, τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης και από το σημείο της ρύπανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ

Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης περιβάλλοντος, στηρίζεται καθ' ολοκλήρου στην διαδικασία της βιοαποδόμησης των επιμέρους συστατικών του πετρελαίου. Η διεργασίες βιοαποδόμησης μπορούν να επηρεαστούν από μια πληθώρα παραγόντων που αφορούν τόσο το ίδιο το πετρέλαιο (σύσταση, ιδιότητες, συμπεριφορά του στο περιβάλλον κλπ) όσο και εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η θερμοκρασία, το pH, η δράση των κυμάτων κλπ)

2.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου

Το πετρέλαιο είναι ορυκτό, το οποίο συναντάται κυρίως σε υγρή ελαιώδη μορφή και αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας ως σήμερα. Η σύσταση του ποικίλει και μεταβάλλεται ανάλογα με την περιοχή άντλησης, τις συνθήκες δημιουργίας και την ηλικία του. Κατά κύριο λόγο όμως αποτελείται από μια μεγάλη ποικιλία υδρογονανθράκων (ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από άνθρακα και υδρογόνο), καθώς και από μικρές συγκεντρώσεις μη υδρογονανθρακικών ενώσεων (ετεροενώσεις) όπως οξυγονούχες, αζωτούχες, θειούχες και ενώσεις μετάλλων. Η ύπαρξη θειούχων ενώσεων ευθύνεται για την έντονη και δυσάρεστη οσμή του πετρελαίου.

Οι υδρογονάνθρακες, ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που περιέχουν, συναντώνται σε αέρια, υγρή ή στερεή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αναλυτικότερα υδρογονάνθρακες με ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα εμφανίζονται σε αέρια μορφή (μεθάνιο- βουτάνιο), από πέντε μέχρι περίπου δεκαέξι άτομα βρίσκονται σε υγρή μορφή (πεντάνιο, εξάνιο κλπ), ενώ από δεκαεφτά άτομα άνθρακα και πάνω συναντώνται σε στερεή μορφή (ως καθαρές ενώσεις). Οι ενώσεις υδρογονανθράκων μπορούν να πραγματοποιηθούν με τους εξής τρεις τύπους μοριακών δομών: ευθεία αλυσίδα, διακλαδωμένη αλυσίδα και με δομές δακτυλίου.

Για τους διάφορους τύπους αργού πετρελαίου η αναλογία των συστατικών τους ποικίλει από 83-87% για τον άνθρακα και 10-14% για το υδρογόνο [4]. Για τα υπόλοιπα στοιχεία τα ποσοστά είναι πολύ μικρότερα (μικρότερο του 8%). Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα των διαφόρων στοιχείων στη μάζα του πετρελαίου φαίνεται αναλυτικότερα στον πίνακα 2-1.

Στοιχεία	Περιεκτικότητα (%κ.β)
Carbon	83 to 87%
Hydrogen	10 to 14%
Nitrogen	0.1 to 2%
Oxygen	0.1 to 1.5%
Sulfur	0.5 to .6%
Metals	< 0.1%

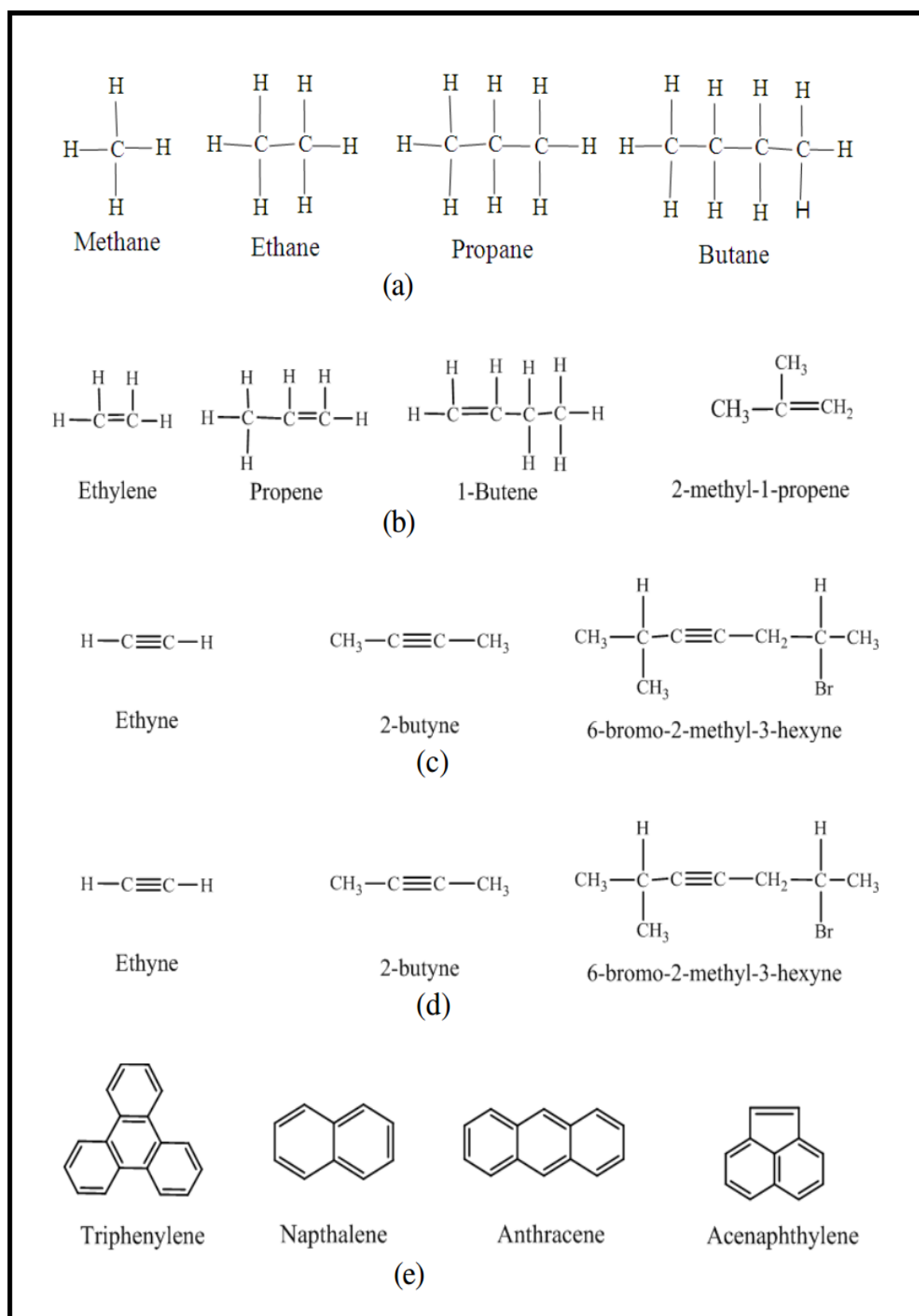
Πίνακα 2-1: Στοιχειακή ανάλυση αργού πετρελαίου.[11]

Οι υδρογονάνθρακες μπορούν να διαχωριστούν σε δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με την σύνθεσή τους, οι οποίες είναι:

- **Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες**, στους οποίους περιλαμβάνονται οι παραφίνες ή αλκάνια (ονομασία κατά IUPAC) και τα κυκλοαλκάνια ή ναφθένια.
 - Αλκάνια (παραφινικοί υδρογονάνθρακες): Πρόκειται για ενώσεις με μοριακό τύπο C_nH_{2n+2} (αλειφατικά). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το προπάνιο και το μεθάνιο. Αποικοδομούνται σχετικά εύκολα από διάφορους μικροοργανισμούς.
 - Κυκλικά αλκάνια ή κυκλοαλκάνια (ναφθενικοί υδρογονάνθρακες): Πρόκειται για ενώσεις με μοριακό τύπο C_nH_{2n} (αλκυκυκλικά). Αποτελούν το 30-60% του συνολικού πετρελαίου. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη βιοδιάσπαση από μικροοργανισμούς.
- **Αρωματικοί υδρογονάνθρακες**, οι οποίοι μπορεί να αποτελούνται από απλές αρωματικές ενώσεις (π.χ. βενζόλιο, τολουόλιο κλπ), από συμπυκνωμένες πολυπυρηνικές αρωματικές ενώσεις ή συστήματα αρωματικών δακτυλίων (PAHs) όπως η ναφθαλίνη, το ανθρακένιο και το φθαινανθρένιο. Τα PAHs παρουσιάζουν ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία, καθώς θεωρούνται πιθανές καρκινογενείς ουσίες. Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποικοδομούνται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς.

Άλλες κατηγορίες υδρογονανθράκων είναι τα Ασφαλτένια, οι Ρητίνες (πχ πυριδίνες, καρβαζόλες κ.α) και οι Ακόρεστοι υδρογονάνθρακες. Οι Ρητίνες και τα Ασφαλτένια αποτελούν κατά κύριο λόγο υποκατηγορία των αρωματικών υδρογονανθράκων, αν και ορισμένες Ρητίνες περιέχουν αποκλειστικά ναφθενικούς δακτυλίους. Οι Ακόρεστοι υδρογονάνθρακες (ολεφίνες ή αλκένια) κανονικά δεν περιλαμβάνονται στα ακατέργαστα πετρέλαια, καθώς συναντώνται κυρίως στα προϊόντα διύλισης.

Ένα μέσο αργό πετρέλαιο αποτελείται από 30% αλκάνια, 50% κυκλοαλκάνια, 15% αρωματικά και 5% ενώσεις αζώτου, θείου και οξυγόνου.



Εικόνα 2-1: Μοριακοί τύποι και Κατηγοριοποίηση Υδρογονανθράκων κατά IUPAC. (a, b, c) Αλκάνια, (d) Κυκλοαλκάνια, (e) Αρωματικοί υδρογονάνθρακες.[8]

Οι κατηγορίες υδρογονανθράκων, με σειρά φθίνουσας τοξικότητας, κατατάσσονται σε αρωματικούς, ναφθενικούς, και τέλος παραφινικούς υδρογονάνθρακες.

Τα ακατέργαστα πετρέλαια μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με:

- τον τύπο υδρογονανθράκων,
- την απόδοση τους σε επιμέρους κλάσματα ή
- την περιεκτικότητά τους σε θείο.

Με βάση τον τύπο των υδρογονανθράκων τα ακατέργαστα πετρέλαια μπορούν να διαχωριστούν σε πετρέλαια παραφινικής, ασφαλούχου ή μεικτής βάσης.[4]

Τύπος, προέλευση	Απόδοση (% κ.ό.)				
	Αέρια, LPG	Βενζίνη	Κηροζίνη	Gasoil	Ατμοσφαιρικό Υπόλειμμα
Nigerian light, Νιγηρία	3.0	26.0	14.5	27.5	29.0
Ekofisk, Νορβηγία	3.5	31.0	13.5	21.5	30.5
Forties, Μεγάλη Βρετανία	4.0	22.5	12.0	22.0	39.5
Arabian light, Σαουδική Αραβία	1.5	20.5	12.0	21.0	45.0
Alaska, Ηνωμένες Πολιτείες	0.5	13.5	11.5	21.5	53.0
Tia Juana, Βενεζουέλα	–	1.5	3.5	14.5	80.5

Πίνακας 2-2: Αποδόσεις σε κλάσματα επιλεγμένων ακατέργαστων πετρελαίων. [2]

Group	Πυκνότητα	Τύπος πετρελαιοειδών
1	< 0.8	Gasoline, Kerosene
2	0.8 - 0.85	Gas Oil, Abu Dhabi Crude
3	0.85-0.95	Arabian Light Crude, North Sea Crude Oils (e.g. Forties)
4	> 0.95	Heavy Fuel Oil, Venezuelan Crude Oils

Πίνακας 2-3: Χαρακτηριστικές πυκνότητες για διάφορα είδη πετρελαίου.[9]

2.2 Φυσικό- Χημικές ιδιότητες πετρελαίου και η σημασία τους

Το ακατέργαστο ή αργό πετρέλαιο αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα μεταβλητής σύνθεσης, με αποτέλεσμα το σύνολο των αργών πετρελαίων αλλά και των προϊόντων τους να εκφράζονται από ένα ευρύ φάσμα φυσικών και χημικών ιδιοτήτων.

Οι ιδιότητες αυτές είναι μοναδικές για κάθε πετρέλαιο και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, με πιο σημαντικούς την προέλευση του οργανικού υλικού και τις επιδράσεις που δέχτηκε κατά τη διάρκεια της γεωλογικής του ιστορίας. Συνεπώς η μελέτη και η κατανόησή τους είναι πολύ σημαντική, καθώς μπορεί επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τις παραμέτρους συμπεριφοράς, μετανάστευσης και παγίδευσης του ρευστού.

Οι σημαντικότερες φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου είναι:

1. **Η πυκνότητα**, με συνηθέστερη χρήση της **ειδικής πυκνότητας**, η οποία για το αργό πετρέλαιο κυμαίνεται από 0,73 έως 1,04 gr/cm³ και αποτελεί δείκτη της κατάληξης της πορείας του πετρελαίου στο νερό. Γενικά μεγάλη περιεκτικότητα σε ελαφρούς (παραφινικούς) ή σε βαρείς (ναφθενικούς/ αρωματικούς) υδρογονάνθρακες υποδηλώνει πετρέλαιο χαμηλής ή υψηλής (αντίστοιχα) πυκνότητας.
2. **Το χρώμα** το οποίο ποικίλει από ανοιχτό κίτρινο έως σκούρο μαύρο (ασφαλτενικά πετρέλαια) και είναι πιθανό να παρουσιάζει πράσινο (παραφινικό) ή μπλε (ναφθενικό) χρώμα. Εξαρτάται από το είδος των υδρογονανθράκων και τη γενική σύσταση του πετρελαίου.
3. **Επιφανειακή τάση**. Σχετίζεται με τη θερμοκρασία και ουσιαστικά αποτελεί την ικανότητα του πετρελαίου να εξαπλώνεται. Πετρέλαια με χαμηλή επιφανειακή τάση εξαπλώνονται πολύ πιο γρήγορα, ακόμα και σε απουσία ανέμου ή θαλάσσιων ρευμάτων. Η επιφανειακή τάση μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.
4. **Το ιξώδες**, το οποίο ποικίλει ανάλογα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος και την περιεκτικότητά του πετρελαίου σε ελαφρά κλάσματα. Αποτελεί σημαντικό δείκτη του ρυθμού εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας, καθώς επίσης και της δυνατότητας προσκόλλησης και διείδυσης του πετρελαίου τόσο στο έδαφος όσο και στα παράκτια υποστρώματα.
5. **Το σημείο ροής**, το οποίο ουσιαστικά αποτελεί τη θερμοκρασία στην οποία το πετρέλαιο γίνεται ημιστερεό ή σταματάει να ρέει. Για τους συνήθεις τύπους αργού πετρελαίου το σημείο ροής έχει τιμή μικρότερη του μηδενός.

Οι σημαντικότερες χημικές ιδιότητες του πετρελαίου είναι:

1. **Η διαλυτότητα στο νερό**, η οποία γενικά για το πετρέλαιο είναι εξαιρετικά χαμηλή. Για το αργό πετρέλαιο υπολογίζεται περίπου στα 30mg/l αν και γενικά μεταβάλλεται ανάλογα με τη σύσταση και τη θερμοκρασία του. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τις διεργασίες βιοεξυγίανσης.
2. **Το σημείο ανάφλεξης**. Είναι η κατώτερη θερμοκρασία στην οποία είναι δυνατή η ανάφλεξη μίγματος ατμών (πετρελαίου)- αέρα, όταν αυτό θερμαίνεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Το σημείο ανάφλεξης είναι εξαιρετικά χαμηλό για το πετρέλαιο (μικρότερο από 30°C), γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερος εύφλεκτο.

Εξίσου σημαντικές ιδιότητες αποτελούν **η πίεση ατμών και τα σημεία τήξης και ζέσεως**.

2.3 Συμπεριφορά πετρελαίου στο περιβάλλον- Διεργασίες Γήρανσης

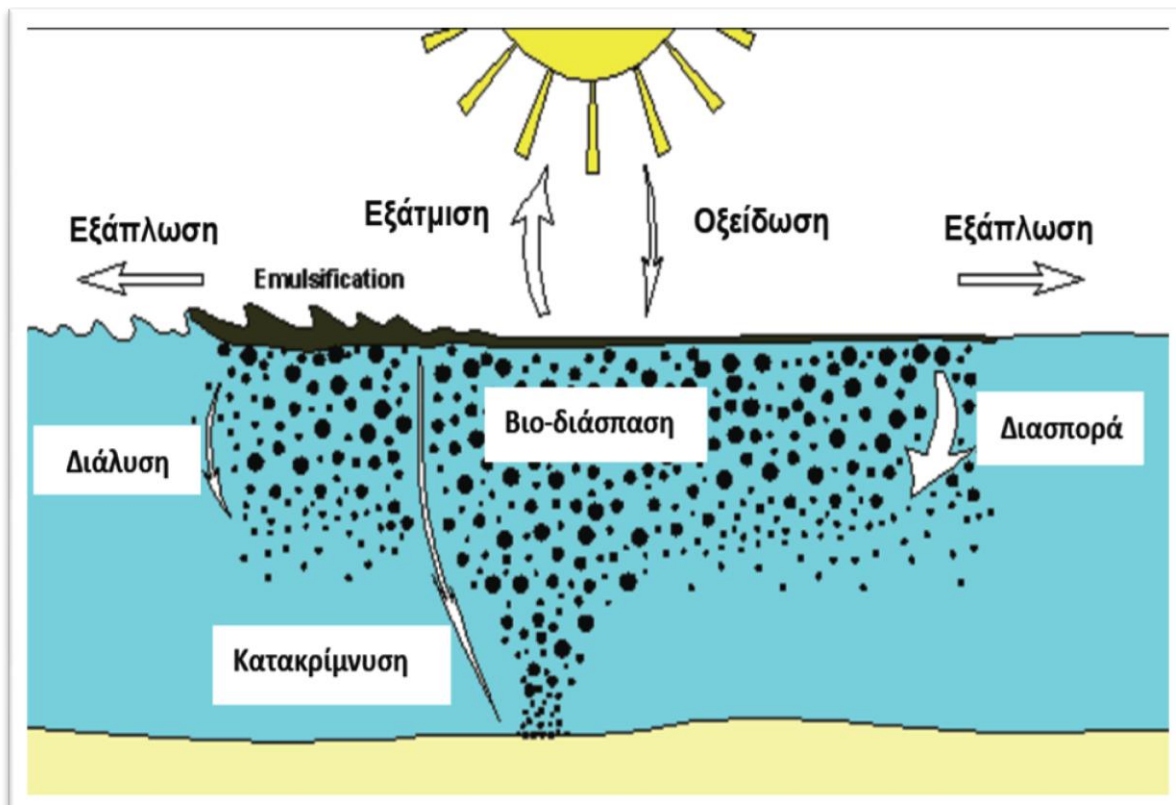
Αμέσως μετά τη διαρροή πετρελαίου στο περιβάλλον, αρχίζουν να πραγματοποιούνται ορισμένες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες, οι οποίες είναι ικανές να μεταβάλουν σταδιακά τη σύνθεση και τις ιδιότητες του πετρελαίου. Η πορεία του πετρελαίου μέσα σε ένα θαλάσσιο περιβάλλον εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ποσότητα του διαρρέοντος πετρελαίου, τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και το αν το πετρέλαιο αυτό θα παραμείνει στη θάλασσα ή θα φτάσει στην ακτή[22]. Οι διεργασίες αυτές ονομάζονται *γήρανση πετρελαίου*.

Η διαδικασία γήρανσης του πετρελαίου περιλαμβάνει τις εξής διεργασίες:

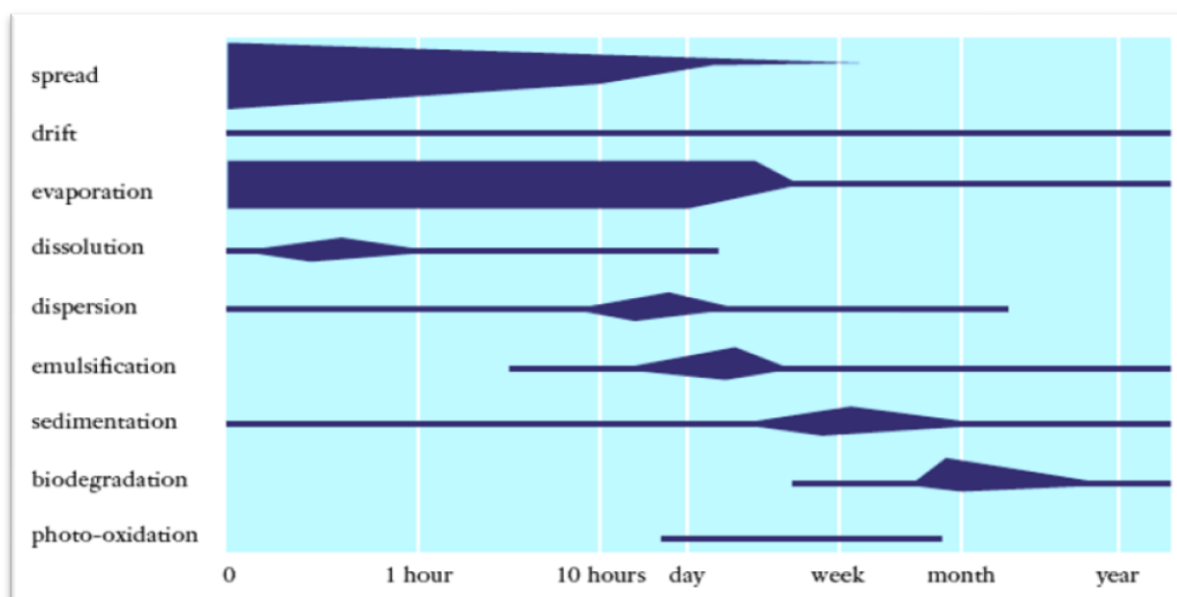
1. **Εξάπλωση (Spreading):** Το πετρέλαιο αφού ελευθερωθεί στην επιφάνεια της θάλασσας παρουσιάζει συνοχή, λίγο αργότερα όμως αρχίζει να εξαπλώνεται (λόγο της επίδρασης του ανέμου και των κυμάτων) δημιουργώντας ζώνες παράλληλες με την διεύθυνση του ανέμου. Η εξάπλωση μιας πετρελαιοκηλίδας επηρεάζεται από το ιξώδες (όσο χαμηλότερο τόσο πιο γρήγορη εξάπλωση), τη θερμοκρασία, την τριβή και τα θαλάσσια ρεύματα. Μετά την εξάπλωση το πάχος της πετρελαιοκηλίδας δεν είναι παντού το ίδιο. Η εξάπλωση αποτελεί τη σημαντικότερη διεργασία κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της πετρελαιοκηλίδας.
2. **Εξάτμιση (Evaporation):** Είναι η διεργασία γήρανσης κατά την οποία εξατμίζονται τα ελαφριά συστατικά του πετρελαίου (κανονικά αλκάνια, μικρότερα από το C15, καθώς και ορισμένες πτητικές αρωματικές ενώσεις όπως το βενζόλιο και το τολουόλιο). Γενικά όλα τα συστατικά που έχουν θερμοκρασία βρασμού μικρότερη από 200°C, συνήθως εξατμίζονται εντός των πρώτων 24 ωρών από τη στιγμή της διαρροής. Φυσικά ο ρυθμός εξάτμισης είναι ανάλογος του βαθμού εξάπλωσης.
3. **Διασπορά (Dispersion):** Επιτυγχάνεται μέσω του έντονου κυματισμού που επικρατεί στην επιφάνεια της θάλασσας, και ουσιαστικά αποτελεί τον διαχωρισμό της κηλίδας σε σταγονίδια διαφόρων μεγεθών. Τα σταγονίδια που παραμένουν μέσα, αλλά κοντά στο νερό καταλαμβάνουν πολύ μεγάλη επιφάνεια, γεγονός που ενισχύει και επιταχύνει άλλες διεργασίες (διαλυτοποίηση, βιοδιάσπαση και ιζηματοποίηση) που οδηγούν σε ταχύτερη αποκατάσταση του περιβάλλοντος. Το μέγεθος της διασποράς εξαρτάται από τις επικρατούσες συνθήκες, τη σύσταση και το ιξώδες. Η διεργασία μπορεί να επιταχυνθεί με προσθήκη χημικών.
4. **Γαλακτωματοποίηση (Emulsification):** Είναι αποτέλεσμα της ανάδευσης της πετρελαιοκηλίδας λόγω της επίδρασης των κυμάτων και ουσιαστικά αναφέρεται στην παραμονή σταγονιδίων θαλασσινού νερού εντός της οργανικής φάσης (αργό πετρέλαιο). Ο σχηματισμός γαλακτώματος μπορεί να αυξήσει μέχρι και στο δεκαπλάσιο τον όγκο του ρύπου, μετατρέποντάς τη μορφή του σε πιο στέρεη από την αρχική. Το γαλάκτωμα έχει συνήθως υψηλό ιξώδες και έχει την τάση να παραμένει περισσότερο στο περιβάλλον από το αρχικό πετρέλαιο, ενώ παράλληλα επιβραδύνει άλλες διεργασίες ρύπανσης.
5. **Διάλυση (Dissolution):** Οι απώλειες από τη διάλυση είναι σχετικά μικρές, καθώς τα περισσότερα συστατικά του πετρελαίου εμφανίζουν μικρή διαλυτότητα στο θαλασσινό

νερό, γεγονός που την καθιστά διεργασία δευτερευούσης σημασίας. Όσα από τα συστατικά του πετρελαίου διαλυθούν, απομακρύνονται μέσω της εξάτμισης. Η διεργασία επηρεάζεται από τα επίπεδα αλατότητας του νερού (ψηλότερα ποσοστά άλατος επιβραδύνουν τη διεργασία της διάλυσης).

6. **Φωτο-Οξείδωση (Photo-Oxidation):** Πρόκειται για χημική αντίδραση μεταξύ του οξυγόνου και των υδρογονανθράκων από την οποία παράγονται, είτε διαλυτά προϊόντα (τα οποία σύντομα αποικοδομούνται), είτε αδιάλυτες ενώσεις. Η διεργασία της οξείδωσης εξαρτάται από την ηλιακή ακτινοβολία, το πάχος και τη σύσταση του στρώματος του πετρελαίου. Στην καλύτερη περίπτωση (έκθεση λεπτού στρώματος σε δυνατό ήλιο), ο μέγιστος ρυθμός οξείδωσης και διάσπασης του φιλμ, δεν ξεπερνά το 0,1% ανά ημέρα.
7. **Κατακρήμνιση/Καταβύθιση (Sedimentation/Sinking):** Μετά την επίδραση των παραπάνω διεργασιών, είναι πιθανό να παρατηρηθεί βύθιση της πετρελαιοκηλίδας, ειδικά όταν οι διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε καθαρό ή ελαφρά υφάλμυρο νερό. Στην περίπτωση όμως που οι παραπάνω διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε θαλασσινό νερό, λόγω της μεγάλης του πυκνότητας, η βύθιση της πετρελαιοκηλίδας μπορεί να επιτευχθεί μόνο με δημιουργία συσσωματωμάτων, δηλαδή με την προσκόλληση στερεών σωματιδίων (οργανικών ή ανόργανων) πάνω στα σωματίδια της κηλίδας. Κατακρήμνιση πετρελαιοκηλίδας σε θαλάσσιο περιβάλλον, μπορεί να παρατηρηθεί κυρίως είτε: α) λόγω προσκόλλησης άμμου πάνω στη μάζα της πετρελαιοκηλίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση του βάρους της και κατ' επέκταση την βύθισή της όταν επιστρέψει (λόγω της δράσης των κυμάτων) στη θάλασσα, β) σε περίπτωση φωτιάς, λόγω της αυξημένης πυκνότητας (σε σχέση με αυτή του νερού) των υπολειμμάτων.
8. **Βιοδιάσπαση (Biodegradation):** Αναφέρεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών, που περιέχονται στο θαλασσινό νερό, να διασπούν συγκεκριμένα συστατικά του αργού πετρελαίου, δίνοντας ως τελικό προϊόν διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και νερό (H_2O). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, ζύμες, μονοκύτταρα άλγη και πρωτόζωα. Ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την ύπαρξη θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου καθώς και από τον τύπο του πετρελαίου. Καθώς οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι ενεργοί στη διαχωριστική επιφάνεια πετρελαίου/νερού, ο ρυθμός αποικοδόμησης επιταχύνεται σημαντικά όταν το πετρέλαιο παρουσιάζει μεγάλη διασπορά, λόγω αύξησης της διεπιφάνειας. Τα ελαφρά κλάσματα αποικοδομούνται γρηγορότερα. Η μικροβιακή ανάπτυξη ευνοείται στους 25°C , ενώ κάτω από 5°C οποιαδήποτε μικροβιακή δραστηριότητα σταματά.



Εικόνα 2-2: Σχηματικό διάγραμμα των οκτώ βασικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την γήρανση (weathering) μια πετρελαιοκηλίδας στη θάλασσα.[9]



Εικόνα 2-3: Σχηματικό διάγραμμα της διάρκειας (μήκος γραμμής), του πιο κρίσιμου σταδίου (πάχος γραμμής) και της αλληλοεπικάλυψης των διεργασιών γήρανσης πετρελαιοκηλίδας.[12]

2.4 Βιο-αποδόμηση πετρελαίου (Bio-degradation)

Η σημαντικότερη διεργασία για την απομάκρυνση του πετρελαίου και κατ'επέκταση για την αποκατάσταση ενός θαλάσσιου περιβάλλοντος, είναι η διεργασία της βιοαποδόμησης. Ως βιοαποδόμηση ορίζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματά της είναι δύσκολο να προβλεφθούν, καθώς αποτελεί μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων η οποία εξαρτάται και επηρεάζεται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες τόσο φυσικής όσο και βιολογικής προέλευσης.

2.4.1 Μηχανισμοί βιοαποδόμησης πετρελαίου

Η διεργασία της βιοαποδόμησης επιτυγχάνεται μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών. Κατά τη διεργασία της βιοαποδόμησης οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τον άνθρακα, που περιέχεται στα διάφορα συστατικά του πετρελαίου, ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Οι βασικότερες κατηγορίες μικροοργανισμών που καταναλώνουν τους υδρογονάνθρακες είναι τα βακτήρια και οι μύκητες. Υπάρχουν πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων που αποικοδομούν το πετρέλαιο, από τις πιο απλές ενώσεις του όπως το μεθάνιο μέχρι και τις πιο μεγάλες ενώσεις που περιέχουν περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα.[7]

Στα θαλάσσια οικοσυστήματα κυρίαρχο ρόλο στην αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων κατέχουν τα βακτήρια. Το ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών των υδρογονανθράκων σε σχέση με τη συνολική μικροβιακή κοινότητα ποικίλει για κάθε οικοσύστημα. Ένας παράγοντας που μπορεί να μεταβάλλει το ποσοστό αυτό είναι η ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Συγκεκριμένα σε καθαρά οικοσυστήματα οι καταναλωτές των υδρογονανθράκων μπορεί να καταλαμβάνουν ποσοστό μικρότερο από το 1% της συνολικής μικροβιακής κοινότητας, ενώ μετά την εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας το ποσοστό αυτό φτάνει περίπου το 10%. Σε χρόνια επιβαρυνόμενα περιβάλλοντα οι πληθυσμοί των αποδομητών του πετρελαίου μπορεί να καταλαμβάνουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά της μικροβιακής κοινότητας φτάνοντας μέχρι και το 100%.

Η διαδικασία της βιοαποδόμησης, ξεκινά με τη διάσπαση των ελαφρύτερων συστατικών του πετρελαίου (απλούστεροι υδρογονάνθρακες), καθώς διασπώνται πολύ πιο εύκολα, ενώ για τη διάσπαση των πιο σύνθετων υδρογονανθράκων απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρόνο προσαρμογής (acclimation) προκειμένου να παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα που διασπούν τις πιο σύνθετες ενώσεις. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι κανένα είδος βακτηρίων δεν διαθέτει μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά του πετρελαίου. Η συνολική διαδικασία διάσπασης των υδρογονανθράκων επιτυγχάνεται με μια συνεχή διαδοχή ειδών μέσα σε συσσωματώματα μικροοργανισμών (consortia) με συνεργατική δράση. Έτσι μία ομάδα μικροοργανισμών διασπά τις πιο σύνθετες ενώσεις σε απλούστερες ή μετατρέπει τις τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη τοξικές και στη συνέχεια αυτές διασπώνται με τη σειρά τους σε ακόμα πιο απλές, από κάποια άλλη ομάδα. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου υπάρχει επαρκής ποσότητα οξυγόνου και θρεπτικών

μέσα στο νερό. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ένα μέρος των σύνθετων και επικίνδυνων ενώσεων του πετρελαίου έχουν μετατραπεί σε πολύ απλούστερες και ακίνδυνες ενώσεις όπως CO₂, H₂O, CH₄ κ.α.

<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

Εικόνα 2-4: Αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί- καταναλωτές υδρογονανθράκων.[7]

2.4.2 Βιοαποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου

Τα διάφορα συστατικά του πετρελαίου δεν παρουσιάζουν την ίδια δεκτικότητα στις επιθέσεις των αποδομητών τους. Γενικά όσο περισσότεροι δεσμοί και διακλαδώσεις υπάρχουν στα διάφορα συστατικά του πετρελαίου, τόσο μεγαλύτερη αντίσταση φέρουν στην μικροβιακή επίθεση. Έτσι προκύπτει ότι τα πιο ελαφρά συστατικά του πετρελαίου αποικοδομούνται ταχύτερα σε σχέση με τα πιο βαριά, γεγονός όμως που δεν ισχύει πάντα, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της ναφθαλίνης (και άλλων μικρού μοριακού βάρους αρωματικών ενώσεων), η οποία οξειδώνεται πριν από αρκετά κορεσμένα συστατικά. Σε γενικές γραμμές πάντως η ακολουθία διάσπασης των συστατικών σε σειρά από το πιο εύκολα στο πιο δύσκολα αποικοδομήσιμο είναι: n-αλκάνια, διακλαδισμένα αλκάνια, μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις και κυκλικά αλκάνια.

Ο κυρίαρχος μηχανισμός αποδόμησης των κορεσμένων υδρογονανθράκων περιλαμβάνει την τελική οξείδωσή τους στην αντίστοιχη αλκοόλη, αλδεΐδη ή κάποιο λιπαρό οξύ.

Αντίστοιχα η αποδόμηση των αρωματικών ενώσεων περιλαμβάνει τη σχηματισμό μια διόλης και στη συνέχεια τη διάσπαση δακτυλίου και τον σχηματισμό ενός καρβοξυλικού οξέως.

Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αποδόμησης των συστατικών διαδραματίζουν και οι διεργασίες *συμμεταβολισμού (cometabolism)*. Ως *συμμεταβολισμός* ορίζεται η εξάρτηση της αποικοδόμησης μιας ένωσης από την παρουσία κάποιας άλλης ένωσης. Για παράδειγμα κατά την αποδόμηση ενώσεων όπως το μεθάνιο παράγονται ένζυμα τα οποία είναι ικανά να διασπούν επικινδύνους χλωριωμένους διαλύτες όπως το τρι- και τετρα-χλωροαιθυλαίνιο, τα οποία σε άλλη περίπτωση δεν θα ήταν δυνατόν να διασπαστούν. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι για διαφορετικά είδη πετρελαίου ο ρυθμός αποδόμησης διαφέρει αρκετά ακόμα και για τα ίδια συστατικά.

2.4.3 Παράγοντες που επιδρούν στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου

Η διεργασία της βιοαποδόμησης είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς επηρεάζεται και εξαρτάται από πολλές και διαφορετικές παραμέτρους που σχετίζονται τόσο με την ίδια τη διεργασία, όσο και με εξωτερικούς παράγοντες. Αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπ' όψιν καθώς μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην επιτυχία της βιοεξυγίανσης.

Οι σημαντικότερες παράμετροι που επηρεάζουν τη βιοαποδόμηση είναι:

- ***Οι διεργασίες γήρανση,***
- ***Η συγκέντρωση του πετρελαίου και των υδρογονανθράκων***
- ***Η θερμοκρασία***
- ***Το οξυγόνο***
- ***Η ύπαρξη θρεπτικών***
- ***Η αλατότητα***
- ***Η πίεση***
- ***Το pH***

Αναλυτικότερα οι διεργασίες γήρανσης μπορούν να επηρεάσουν τις διαδικασίες αποικοδόμησης είτε άμεσα με την επίδραση των ίδιων των διεργασιών, είτε έμμεσα μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις μεμονωμένων συστατικών. Για παράδειγμα η διεργασία της εξάτμισης μπορεί να ευνοήσει τη διαδικασία αποδόμησης καθώς απομακρύνει σχεδόν αμέσως τα μικρού μοριακού βάρους τοξικά συστατικά, ενώ η διεργασία της γαλακτωματοποίησης επιβραδύνει τη διαδικασία αποδόμησης καθώς μειώνει τη διεπιφάνεια ύδατος πετρελαίου στην οποία δρουν και συγκεντρώνονται οι μικροοργανισμοί.

Επίσης ανασταλτικό παράγοντα αποτελεί και η μείωση των συγκεντρώσεων των συστατικών καθώς σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις η επίθεση των μικροοργανισμών είναι αναποτελεσματική. Υψηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων μπορούν να εμφανίζουν περιορισμένα ποσοστά βιοαποδόμησης λόγω έλλειψης οξυγόνου ή λόγω της επίδρασης της τοξικότητας των πτητικών υδρογονανθράκων.

Σημαντικό παράγοντα, μπορεί να αποτελέσει και η θερμοκρασία, καθώς επηρεάζει εξίσου τις ιδιότητες του πετρελαίου και τη δραστηριότητα των μικροβιακών πληθυσμών. Ορισμένοι υδρογονάνθρακες, όπως τα αλκάνια μικρής αλυσίδας, διαλύονται καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ παράλληλα τα διάφορα είδη μικροοργανισμών επιβιώνουν και

αναπτύσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε γενικές γραμμές για το θαλάσσιο περιβάλλον οι υψηλότεροι ρυθμοί αποικοδόμησης εμφανίζονται στη θερμοκρασιακή περιοχή από 15 έως 20°C.

Θετική επίδραση στη βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων μπορεί να έχει δράση των κυμάτων. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι σε περιβάλλοντα όπως παραλίες, λιμάνια, λίμνες κ.α όπου η πετρελαιοκηλίδα είναι σχετικά προστατευμένη από τη διασπορά που προκαλείται από τον άνεμο και τη δράση των κυμάτων εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά αποδόμησης του αργού πετρελαίου συγκριτικά με περιοχές που χαρακτηρίζονται από έντονη κυματική δραστηριότητα [13].

Η διατήρηση αερόβιων συνθηκών (παρουσία οξυγόνου) είναι απαραίτητη για την αποδόμηση των υδρογονανθράκων, καθώς η διάσπασή τους επιτυγχάνεται με τις οξυγενάσεις¹. Συνήθως το οξυγόνο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στα κατώτερα στρώματα της υδάτινης στήλης (ανοξική ζώνη) καθώς επίσης και στις περισσότερες λεπτόκοκκές θαλάσσιες ακτές[13]. Παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητά του οξυγόνου αποτελούν: η δράση των κυμάτων, η φυσική κατάσταση του πετρελαίου και το ποσοστό των διαθέσιμων υποστρωμάτων.

Η πίεση είναι επίσης ένας παράγοντας που αφορά τα κατώτερα στρώματα της υδάτινης στήλης και ιδιαίτερα τα βαθιά ωκεανικά περιβάλλοντα (deep ocean environment), καθώς η αύξηση του βάθους προκαλεί και αύξηση της πίεσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι το πετρέλαιο που φτάνει σε πιο μεγάλα βάθη, αποικοδομείται με πολύ πιο αργούς ρυθμούς από τους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα ορισμένα από τα πιο ανθεκτικά συστατικά του πετρελαίου να παραμένουν στο υδάτινο περιβάλλον ακόμα και για δεκαετίες. [13]

Η εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας σε υδάτινο περιβάλλον, έχει σαν αποτέλεσμα την δραματική αύξηση των επιπέδων άνθρακα, χωρίς την αντίστοιχη αύξηση ανόργανων θρεπτικών όπως είναι το άζωτο και ο φώσφορος. Έτσι συχνά παρατηρούνται υπερβολικά μεγάλοι λόγοι άνθρακα/αζώτου ή/και άνθρακα/φωσφόρου, γεγονός που δυσχεραίνει τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Ένας ακόμα ανασταλτικός παράγοντας στην βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων αποτελεί το επίπεδο αλατότητας, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μειώνεται, όσο αυξάνεται το επίπεδο της αλατότητας. Η μείωση αυτή εκτιμάται σε ένα εύρος τιμών από 3,3- 28,4% και αποδίδεται σε γενική μείωση της συνολικής μικροβιακής μεταβολικής δραστηριότητας). [13]

Η τιμή του pH μπορεί επίσης να επηρεάσει τη δράση των μικροοργανισμών. Το θαλασσινό νερό έχει σε γενικές γραμμές σταθερό και ελαφρώς αλκαλικό pH, ενώ τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες φαίνεται να ευνοούνται από ουδέτερο το pH. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση του pH αυξάνει την αποικοδόμηση του πετρελαίου, με τη βέλτιστη αποικοδόμηση να εμφανίζεται σε ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες. Ο ρυθμός μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μπορεί να μειωθεί επίσης με την αύξηση της αλατότητας (βέλτιστο εύρος αλατότητας 2,5-3,5%).[13]

Επίσης η επιτυχία της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί και από αρκετές άλλες παραμέτρους όπως το είδος του οικοσυστήματος στον οποίο λαμβάνει χώρα η ρύπανση και ο τύπος της ακτής, καθώς τα διαφορετικά οικοσυστήματα έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης στην ρύπανση

¹ Καταλυτικά ένζυμα της αντίδρασης μιας οργανικής ουσίας με το μοριακό οξυγόνο

2.4.4 Εκτίμηση του βαθμού βιοαποδόμησης πετρελαίου- Εφαρμογή Βιοδεικτών (Biomarkers)

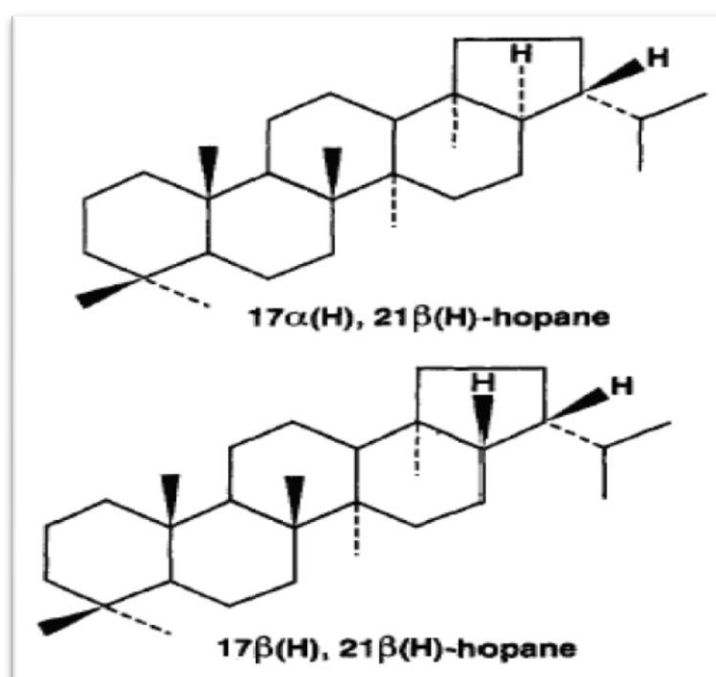
Όπως προαναφέρθηκε η διεργασίες γήρανσης μπορεί να επηρεάσουν και να μεταβάλλουν κατά πολύ τη σύνθεση και τις συγκεντρώσεις των συστατικών του πετρελαίου. Έτσι οι ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές συνήθως χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια ως προς τις συγκεντρώσεις των συστατικών του, ανάγοντας τη διαδικασία αξιολόγησης του βαθμού βιοαποδόμησης σε έναν αρκετά δύσκολο στόχο. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος γίνεται χρήση βιοδεικτών.

Βιοδείκτες ονομάζονται τα οργανικά απολιθώματα που διατηρούνται εκατομμύρια χρόνια μέσα στα ιζηματογενή πετρώματα και προέρχονται από βιολογικά λιπίδια [14]. Κατά κύριο λόγο αποτελούνται από άνθρακα και υδρογόνο (υδρογονάνθρακες) και σε μικρότερες ποσότητες από ετεροσυστατικά όπως το άζωτο και το οξυγόνο. Οι βιοδείκτες ουσιαστικά είναι τα μη ή αργά βιοδιασπώμενα συστατικά του πετρελαίου και μεταξύ άλλων χρησιμοποιούνται για να μετριάσουν την υψηλή μεταβλητότητα των συγκεντρώσεων των υπόλοιπων συστατικών του πετρελαίου. Σε πειραματικό επίπεδο η χρησιμότητά τους είναι ιδιαίτερος σημαντική καθώς επιβεβαιώνουν ότι ο βαθμός βιοαποδόμησης οφείλεται όντως στη διάσπαση των συστατικών του πετρελαίου. Η εκτίμηση του βαθμού βιοαποδόμησης γίνεται μέσω των λόγων των συγκεντρώσεων των υδρογονανθράκων στόχων προς τη συγκέντρωση αυτών των σταθερών βιοδεικτών. Κύριες κατηγορίες βιοδεικτών των αργών πετρελαίων είναι τα ισοπρενοειδή (πριστάνιο και φυτάνιο), τα στεράνια και τα χοπανοειδή [14]. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί, ότι τα ισοπρενοειδή δεν θεωρούνται ιδιαίτερα αξιόπιστοι δείκτες, καθώς σε σχετικές μελέτες για την βιοαποδόμηση πετρελαιοειδών που έχουν γίνει, τα συστατικά αυτά έχουν σημειώσει ως και ολική απομάκρυνση [15].

Ο πλέον διαδεδομένος βιοδείκτης είναι το **χοπάνιο** (πεντακυκλικά τερπενοειδή), κυρίως λόγω της ιδιαίτερης ανθεκτικότητας που παρουσιάζει στην βιοαποδόμηση. Ωστόσο η χρήση του θα πρέπει να γίνεται με προσοχή σε περιπτώσεις όπου το δείγμα πετρελαίου που μελετάται δεν έχει υποστεί σημαντικές επιδράσεις από τις διεργασίες γήρανσης.

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
18α(H)-22,29,30- Τρισ-νορ-νεοχοπάνιο, Ts	C ₂₇ H ₄₆
17α(H)-22,29,30-Τρισνορχοπάνιο, Tm	C ₂₇ H ₄₆
17α(H), 18α(H), 21β(H)-28, 30-Δισνορχοπάνιο	C ₂₈ H ₄₈
17α(H), 21β(H)-30-Νορχοπάνιο	C ₂₉ H ₅₀
17α(H), 21β(H)-χοπάνιο	C ₃₀ H ₅₂
17β(H), 21α(H)-Μορετάνιο	C ₃₀ H ₅₂
17α(H), 21β(H)-30-Ομοχοπάνιο	C ₃₁ H ₅₄
17α(H), 21β(H)-30, 31-Δισομοχοπάνιο	C ₃₂ H ₅₆
17α(H), 21β(H)-30, 31, 32-Τρισομοχοπάνιο	C ₃₃ H ₅₈
17α(H), 21β(H)-30, 31, 32, 33-Τετραομοχοπάνιο	C ₃₄ H ₆₀
17α(H), 21β(H)-30, 31, 32, 33, 34-Πεντομοχοπάνιο	C ₃₅ H ₆₂

Εικόνα 2-5: Κυριότερα χοπανοειδή.[14]



Εικόνα 2-6: Δομές χοπανίων.[7]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Περίληψη μεθόδου

Σκοπός του πειράματος είναι η εξέταση της αποτελεσματικότητας τριών (γηγενών) μικροβιακών κονσόρσιων στη βιοαποδόμηση πετρελαιοειδών σε θαλάσσιο περιβάλλον, μέσω βιοενίσχυσης (bioaugmentation).

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης στηρίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης που ανέπτυξε η EPA (Environmental Protection Agency) [40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C]. Το πρωτόκολλό σχεδιάστηκε με στόχο να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος στη βιοδιάσπαση πετρελαίου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, το πρωτόκολλο απαιτεί την εξέταση της μικροβιακής δραστηριότητας καθώς επίσης και την ποσοτικοποίηση των χημικών μεταβολών (απομάκρυνση κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων) στη σύσταση του πετρελαίου.

Αναλυτικότερα, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν παράλληλα μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις. Οι πρώτες περιλαμβάνουν τις μικροβιακές καλλιέργειες για τον έλεγχο της βιωσιμότητάς, μέσω απαριθμήσεων, των βιοαποδομητών. Η απαριθμήσεις των βιοαποδομητών έγιναν σύμφωνα με τη μέθοδο του πιο πιθανού αριθμού (MPN- Most Probable Number) . Αμέσως μετά ακολουθεί η χημική ανάλυση των δειγμάτων, η οποία περιλαμβάνει την προετοιμασία του δείγματος, με εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου σε διχλωρομεθάνιο (DCM)- εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE- Liquid-Liquid Extraction)- και την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE- Solid Phase Extraction) κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του πετρελαίου σε κορεσμένο και αρωματικό κλάσμα. Τέλος η χημική ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων κλασμάτων του δείγματος γίνεται με χρήση Αέριου Χρωματογράφου-Φασματομέτρου μάζας υψηλής ανάλυσης (Gas Chromatography/Mass Spectrometry- GC/MS). Για την αποτελεσματική ολοκλήρωση των στόχων του πρωτοκόλλου δοκιμής, απαιτείται η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης των διαφόρων αναλυτών στόχων προς έναν μη-βιοδιασπάσιμο δείκτη- βιοδείκτης- (C2-ή C3-φενανθρένιο, C2-χρυσένιο ή χοπάνια).

3.2 Θεωρητικό υπόβαθρο

3.2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

3.2.1.1 Μέθοδος MPN

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παραδοχή ότι δείγματα ίδιου βάρους ή όγκου τα οποία προέρχονται από την ίδια πηγή, θα περιέχουν κατά μέσο όρο τον ίδιο αριθμό μικροβίων με την αρχική πηγή. Ο προσδιορισμός του πιο πιθανού αριθμού γίνεται με καταγραφή των θετικών και αρνητικών πηγαδιών που προκύπτουν από τις αραιώσεις. Ως θετικά καταγράφονται τα πηγαδάκια που παρουσιάζουν μικροβιακή ανάπτυξη (παίρνουν ένα κόκκινο-μοβ χρώμα), αντίστοιχα αυτά που δεν παρουσιάζουν μικροβιακή ανάπτυξη καταγράφονται ως αρνητικά. Ιδανικά τα πηγαδάκια με την μικρότερη αραιώση πρέπει να είναι θετικά, ενώ αυτά με τη μεγαλύτερη αραιώση θα πρέπει να είναι αρνητικά. Η σχέση μεταξύ των θετικών και αρνητικών πηγαδιών έχει προσδιοριστεί μαθηματικά και έχουν προκύψει πίνακες συσχέτισής τους, για τον ακριβή υπολογισμό του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων [16]. Στην παρούσα εργασία για τον υπολογισμό του πιο πιθανού αριθμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα EPA-MPN calculator.

3.2.1.2 Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού σε τριβλία

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα αναμεμειγμένο με agar και θρεπτικά υλικά σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται από τη μέθοδο αυτή αναφέρονται σε μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (Colony Forming Units- CFU) και όχι σε αριθμό ζωντανών κυττάρων. [16]

3.2.2 Χημικές αναλύσεις

3.2.2.1 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE)

Η διεργασία της εκχύλισης αποτελεί μια από τις συνηθέστερες και σημαντικότερες εργαστηριακές τεχνικές. Σκοπός της εκχύλισης είναι η απομόνωση μιας ουσίας από το δείγμα, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη στενή επαφή του δείγματος με ένα διαλυτικό μέσο, το οποίο τη διαλύει εκλεκτικά. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε τρία στάδια: την επαφή, τον διαχωρισμό και την ανάκτηση διαλύτη και λαμβάνει χώρα εντός διαχωριστικής χοάνης. Η επαφή του διαλύτη με το με το δείγμα γίνεται με ανάδευση, στη συνέχεια το μίγμα διαλύτη- διαλύματος αφήνεται έως ότου γίνει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (διαχωρισμός γίνεται σε εκχύλισμα το οποίο κατακάθεται και αποτελείται κυρίως από κάποιο οργανικό διαλύτη και στο υπόλειμμα το οποίο «επιπλέει» και περιέχει κυρίως νερό και μικρή ποσότητα διαλύτη). Καθοριστικός παράγοντα στην διεργασία της εκχύλισης αποτελεί η επιλογή διαλύτη. Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διεργασία της εκχύλισης.[17] Τα βασικότερα χαρακτηριστικά για την επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη είναι:

- να διαλύει εκλεκτικά την οργανική ουσία
- να μην αντιδρά με αυτήν
- να απομακρύνεται εύκολα
- να μην είναι εύφλεκτος ή τοξικός

Στην παρούσα εργασία εκχυλίσες πραγματοποιήθηκαν μετά από την ολοκλήρωση κάθε μικροβιολογικής δειγματοληψίας (δηλαδή μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες επώασης). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε διχλωρομεθάνιο (DCM-dichloromethene, CH_2Cl_2), το οποίο πρόκειται για έναν οργανικό διαλύτη, μη αναμίξιμο με το νερό. Πριν από την διεργασία της εκχύλισης προστέθηκε στο δείγμα ένα πρότυπο διάλυμα ανάκτησης (surrogate recovery standard) το οποίο αποτελεί ένδειξη του βαθμού αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Η ανάδευση του δείγματος μέσα στη διαχωριστική χοάνη πρέπει να γίνεται με προσοχή καθώς, η παρουσία διαλύτη σε συνδυασμό με την ανάδευση δημιουργεί μια αύξηση πίεσης εντός της χοάνης.



Εικόνα 2-1: Διάταξη εκχύλισης υγρού-υγρού μέσου (LLE). [17]

3.2.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

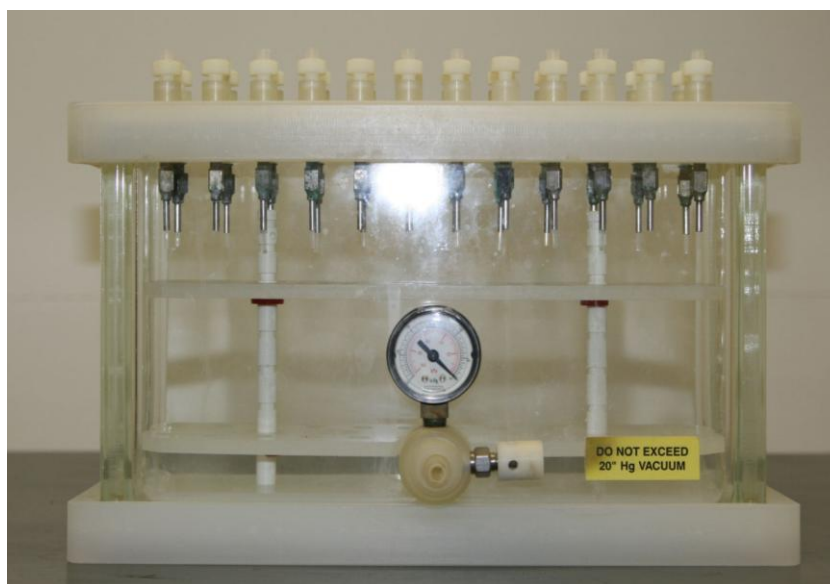
Η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελεί μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική για το διαχωρισμό του κορεσμένου και του αρωματικού κλάσματος δείγματος πετρελαίου. Αποτελεί προκαταρκτικό στάδιο της χημικής ανάλυσης του δείγματος πριν την αέρια χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας. Μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού- υγρού καθώς επιλύει πολλά προβλήματα όπως:

- Ο ατελής διαχωρισμός φάσεων,
- Η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών,
- Η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες),

- Η χρήση και η απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών, εύφλεκτων και τοξικών οργανικών διαλυτών.

Η ταχύτητα στην εφαρμογή, η ευκολία ποσοτικών διαχωρισμών και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου αποτελούν μερικά από τα πλεονεκτήματα της. Η SPE χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και τη δέσμευση ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων από αυτά. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά δείγματα τα οποία προηγουμένως θα έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη.[18]

Κατά την πειραματική διαδικασία για το διαχωρισμό των δυο κλασμάτων ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν DCM (για τα αρωματικά) και εξάνιο (για τα κορεσμένα). Η διάταξη SPE που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από δώδεκα (12) θέσης κάθε μια από τις οποίες μπορεί στεγανοποιηθεί ξεχωριστά από το σύστημα. Η ροή του δείγματος μέσα από την στήλη SPE πραγματοποιήθηκε με φυσικό τρόπο, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις όπου κρίθηκε αναγκαία η εφαρμογή κενού.



Εικόνα 3-2: Διάταξη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).

3.2.2.3 Ανάλυση GC/MS

Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί έναν αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (συσκευή GC/MS), λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Σκοπός της χημικής ανάλυσης είναι η τεκμηρίωση και η αξιολόγηση του βαθμού αποδόμησης δείγματος πετρελαίου.

Το σύστημα ανάλυσης GC/MS χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της γήρανσης και της τύχης των διαρροών πετρελαίου στο περιβάλλον. Πρόκειται για μια αρκετά αξιόπιστη μέθοδο η οποία ουσιαστικά αποτελεί συνδυασμό δυο διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων, της Αέριας Χρωματογραφίας και της Φασματομετρίας Μάζας. Ο αέριος χρωματογράφος (GC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών του χημικού δείγματος, ενώ αντίστοιχα ο φασματογράφος μάζας (MS) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συστατικών αυτών. Η τεχνική GC/MS έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα

χρήσιμη στην χημική ανάλυση πετρελαιοειδών λόγω του μεγάλου αριθμού συστατικών που περιέχουν και της δυσκολίας χρωματογραφικού διαχωρισμού τους.

ΑΕΡΙΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ (GC):

Ο αναλυτής GC (Gas Chromatography) αποτελείται από μια μεταλλική στήλη, στο ένα άκρο της οποίας βρίσκεται μια θυρίδα έκχυσης, από την οποία γίνεται η είσοδος του δείγματος και στο άλλο άκρο είναι τοποθετημένος ένας ανιχνευτής. Ο αναλυτής διαχωρίζει τα συστατικά του εκάστοτε δείγματος και παρέχει ένα χαρακτηριστικό προφίλ εξόδου το οποίο καταγράφεται ηλεκτρονικά. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών χρόνων που απαιτεί το κάθε συστατικό για να διανύσει την απόσταση από το ένα άκρο της στήλης στο άλλο. Αυτό που αναγκάζει τα επιμέρους συστατικά να κινηθούν με διαφορετική ταχύτητα είναι τα χαρακτηριστικά των μορίων τους, μερικά εκ των οποίων είναι το μοριακό βάρος, το σχήμα και η αλληλεπίδρασή τους με την επιφάνεια της στήλης.[19]

Η εισαγωγή του δείγματος στη θυρίδα έκχυσης γίνεται με ένεση διαμέσου ενός ελαστικού διαφράγματος. Η θυρίδα εκχύσεως θα πρέπει να διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία, έτσι ώστε το δείγμα να εξατμίζεται αμέσως. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της ένεσης και της έκλυσης του δείγματος από τη στήλη, ονομάζεται **χρόνος κατακράτησης** (retention time). Ο χρόνος κατακράτησης μπορεί να οδηγήσει στη διάκριση ορισμένων ενώσεων, ωστόσο δεν αποτελεί αξιόπιστο παράγοντα για την ταυτοποίηση ενώσεων.

Ένα φέρον αέριο (carrier gas) χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του δείγματος διαμέσου της στήλης με συνηθέστερη τη χρήση των στοιχείων αργό, ήλιο, υδρογόνο και άζωτο. Βασική προϋπόθεση για αξιόπιστα αποτελέσματα είναι το αέριο να μην αντιδρά με το δείγμα ή τη στήλη. Στην παρούσα μελέτη *χρησιμοποιήθηκε ήλιο*.

Κάθε δείγμα, ιδανικά, παράγει στην έξοδο ένα ιστόγραμμα, το ύψος του οποίου είναι ανάλογο της ποσότητας των αντίστοιχων ουσιών του δείγματος.

Για τον έλεγχο της βαθμονόμησης και του σωστού συντονισμού του οργάνου εισάγεται για ανάλυση διάλυμα που περιλαμβάνει κάποια ουσία γνωστής συγκέντρωσης ή κάποιο τυφλό διάλυμα (δεν περιέχει ανιχνεύσιμες ενώσεις). Αν το όργανο δεν ανιχνεύσει την ουσία ή την ανιχνεύσει σε διαφορετική συγκέντρωση από αυτή που εισάχθηκε, τότε θα πρέπει να επαναληφθεί η βαθμονόμηση και ο συντονισμός του οργάνου.

Για την ποσοτική βαθμονόμηση του οργάνου, παράχθηκαν από πρότυπο δείγμα, διαλύματα συγκεντρώσεως από 1ppb έως 20ppm.

ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΑΣ (MS):

Ο αναλυτής (MS) αποτελείται από μία είσοδο δείγματος, μια πηγή ιόντων, έναν μοριακό επιταχυντή και έναν ανιχνευτή. Προσδιορίζει τις ουσίες διασπώντας τις ενώσεις σε ιοντικά θραύσματα (ηλεκτρικά φορτισμένα μέρη). Η διάσπαση αυτή επιτυγχάνεται με «βομβαρδισμό» των μορίων με ιόντα, εντός μαγνητικού πεδίου, που δημιουργείται σε ένα τετράπολο. Η πορεία διάσπασης της κάθε ένωσης εξαρτάται από τη χημική της δομή και παρέχει ένα μοναδικό αποτύπωμα (ίχνος).

Η ανάλυση απαιτεί ένα καθαρό αέριο δείγμα, για το λόγο αυτό το στόμιο εισόδου του δείγματος θα πρέπει να διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία (μέχρι 400°C) για να εξασφαλίζεται ότι το δείγμα παραμένει σε αέρια μορφή. Στη συνέχεια το δείγμα εισέρχεται στο θάλαμο ιονισμού, όπου μια δέσμη ηλεκτρονίων επιταχύνεται με υψηλή τάση. Τα μόρια του δείγματος, αφού συγκρουστούν με τα ηλεκτρόνια υψηλής τάσης συντρίβονται σε καλά καθορισμένα θραύσματα, τα οποία συνεχίζουν να κινούνται επιταχυνόμενα ως μεμονωμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά περνούν μέσα από μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται σε ένα τετράπολο, στο οποίο εφαρμόζεται μεταβαλλόμενη τάση. Για κάθε τιμή τάσης, μόνο μια μάζα μπορεί να επιταχύνει επαρκώς ώστε να φτάσει στον ανιχνευτή. Συνεπώς η τάση επιτάχυνσης μεταβάλλεται έτσι ώστε να καλύπτει ένα ευρύ φάσμα μαζών, προκειμένου όλα τα τεμάχια να φτάσουν στον ανιχνευτή[19]. Ο ανιχνευτής μετρά και καταγράφει ηλεκτρονικά την μάζα των θραυσμάτων η οποία, όπως είναι φυσικό, είναι ανάλογη του ανιχνευμένου δείγματος.

Το όργανο παράγει ως έξοδο ένα γράφημα που αποτελείται από μια συστοιχία κορυφών. Το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο του αριθμού των θραυσμάτων που ανιχνεύτηκαν για μια συγκεκριμένη μάζα.

Ο φασματογράφος μάζας βαθμονομήθηκε με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της EPA (EPA 8270). Αναλυτικότερα οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 10ppm (αντι 40ppm). Δημιουργείται μία καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 0,5-20ppm. Η βαθμονόμηση 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο δείγμα συστατικών για να προσδιοριστεί ο σχετικός συντελεστής απόκρισης (RRFs) για κάθε αναλυτή.

Για κάθε συστατικό γίνεται υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο σύμφωνα με τη σχέση[21]:

$$RF = \frac{A_x \cdot C_{is}}{A_{is} \cdot C_x}$$

Όπου :

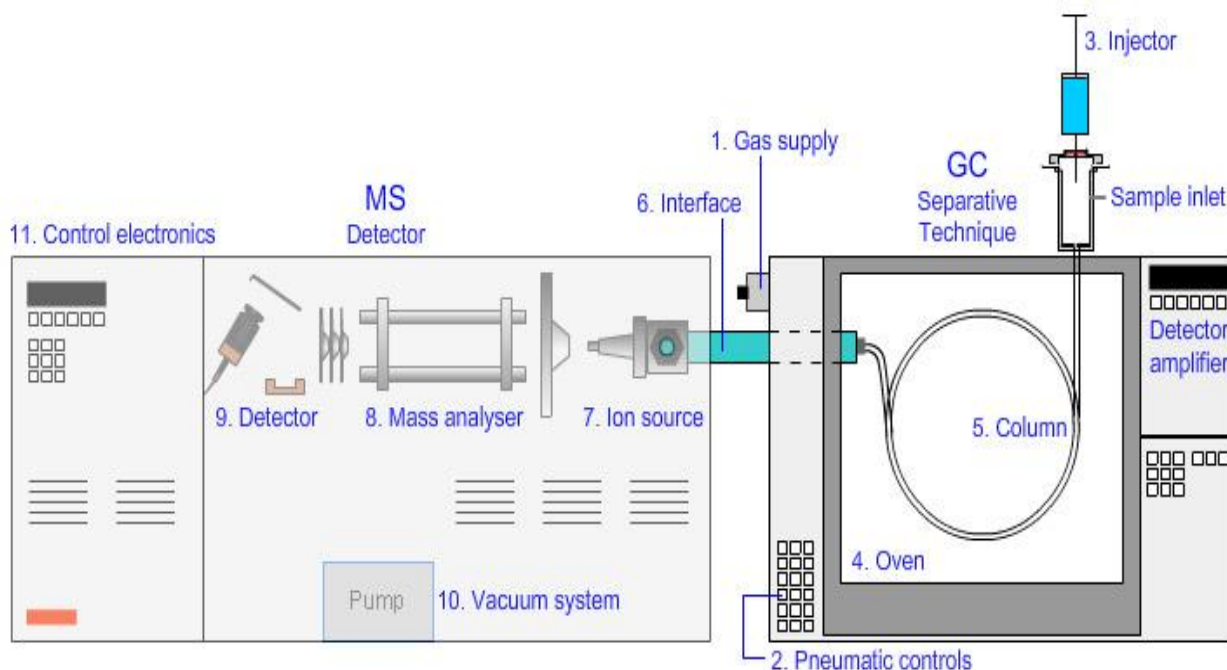
RF: Σχετικός συντελεστής απόκρισης

A_x : Εμβαδό της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται

A_{is} : Εμβαδό της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο

C_x : Συγκέντρωση (ng/μl) του συστατικού που μετράται

C_{is} : Συγκέντρωση (η οποία είναι σταθερή για την καμπύλη βαθμονόμησης και ίση με 10ng/μl) του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου



Εικόνα 3-4: Διάταξη αέριου χρωματογράφου/ φασματογράφου μάζας (GC/MS)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ ΑΝΑΛΥΤΗ:

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε αναλυτής της εταιρίας Agilent, μοντέλο HP 7890/5975c GC/MS, με χρωματογραφική στήλη HP-5,5% phenyl methyl siloxane , διαστάσεων 30m x 250μm x 0,25μm. Για τις ποσοτικές αναλύσεις το όργανο χρησιμοποιεί επιλεκτική ανίχνευση ιόντων (selective ion detection-SIM), με ρυθμό ανίχνευσης μεγαλύτερο από 1,5 ανιχνεύσεις/δευτερόλεπτο για να μεγιστοποιηθεί το εύρος της γραμμικής ποσοτικοποίησης και η ακρίβεια του οργάνου. Επίσης δεν αποκλείεται η ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan mode), για περιοχή μαζών 50-500m/z, έτσι ώστε να αξιολογηθούν ποιοτικά οι αλλαγές στο πετρέλαιο που δεν ελήφθησαν από την προσέγγιση SIM.

Η αρχική θερμοκρασία του αναλυτή ρυθμίστηκε στους 60°C με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας της τάξης των 6°C/min μέχρι την επίτευξη 300 °C τελικής θερμοκρασίας. Τα δείγματα (1μl) εμβάλλονται σε έναν split-split-less εισαγωγή (pulsed-splitless mode στους 250 °C), μέσω δειγματολήπτη (Agilent 7693A Automatic Liquid Sampler). Η θερμοκρασίες της γραμμής σύνδεσης του χρωματογράφου με το φασματογράφο, της πηγής ιόντων και του τετραπόλου ρυθμίστηκαν αντίστοιχα στους 280°C, 230 °C και 150 °C.

Η ταυτοποίηση των συστατικών πραγματοποιήθηκε βάση του χρόνου συγκράτησης και του φάσματος των μαζών. Για τον προσδιορισμό των χρόνων συγκράτησης χρησιμοποιήθηκε μίγμα k-αλκανίων και αρωματικών συστατικών (Oil analysis standard της εταιρίας Absolute Standard Inc, συγκέντρωσης 100ppm).

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων από τον αναλυτή GC/MS γίνεται με χρήση της τεχνικής εσωτερικού προτύπου (internal standard), τόσο για τα αλειφατικά, όσο και για τα αρωματικά κλάσματα των εκχυλισμάτων του πετρελαίου. Το εσωτερικό πρότυπο αποτελείται από ένα διάλυμα τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων (naphthalene-d8, phenanthrene-d10, crysene-d12 και perylene-d12) και προστίθεται στα εκχυλίσματα των

δειγμάτων, πριν από την έκχυση. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του σχετικού συντελεστή απόκρισης (Relative Response Factor- RRF).

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 -androstande		
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

Εικόνα 3-5: Ταξινόμηση Αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης.[20]

Τέλος για να διασφαλιστεί ότι η μεταβολή των συγκεντρώσεων του κάθε αναλυτή οφείλονται σε «πραγματική» βιοαποικοδόμηση του δείγματος και όχι σε κάποιου άλλου είδους σφάλματος, όπως η απώλεια δείγματος ή η αναποτελεσματική εκχύλιση, κρίνεται απαραίτητο να γίνει κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των αναλυτών στόχων μέσω εσωτερικών δεικτών (conserved internal maker). Συνηθέστεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων είναι οι C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο ή C3017_α(H), 21_β(H)-χοπάνιο, σε μια βάση βάρους πετρελαίου (mg δείκτη/kg πετρελαίου, mg αναλυτή στόχου/kg πετρελαίου). Στην παρούσα εργασία ως δείκτης για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το C₃₀17_α(H), 21_β(H)-χοπάνιο.[21]

Το ποσοστό απομάκρυνσης όλων των συστατικών υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση:

$$\% \text{ Απομάκρυνση} = \frac{\left[\frac{A_0}{H_0} - \frac{A_s}{H_s} \right]}{\frac{A_0}{H_0}} \times 100\%$$

Όπου:

A_s η συγκέντρωση του αναλυτή στόχου στο δείγμα,

A₀ η συγκέντρωση του αναλυτή στόχου στο αρχικό δείγμα,

H_s η συγκέντρωση του 17_α(H), 21_β(H) C₃₀-χοπάνιο και

H₀ η συγκέντρωση του 17_α(H), 21_β(H) C₃₀-χοπάνιο στο αρχικό δείγμα.

Στο παράρτημα Α παρατίθενται πίνακες με τα πρωτεύοντα ιόντα κάθε αναλυτή στόχου και τα συστατικά αναφοράς.[20]

3.2 Δομή του πειράματος

Οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για τρία μικροβιακά consortia. Συνολικά, για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες (0,7,14,21 και 28 ημέρες). Για κάθε δείγμα (εκτός των 0 ημερών) πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Αμέσως μετά από κάθε δειγματοληψία ακολουθούσε η προετοιμασία του δείγματος (εκχύλιση LLE και SPE) για τις χημικές αναλύσεις. Κατά το στάδιο της δειγματοληψίας αφαιρέθηκε από κάθε δείγμα 1ml το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των μικροβιολογικών αναλύσεων, ενώ το υπόλοιπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τις χημικές αναλύσεις. Όλη η προετοιμασία καθώς και οι εργασίες του πειράματος πραγματοποιήθηκαν εντός απαγωγού. Η μικροβιακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες.

Ο υπολογισμός του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε με αερόβια μέτρηση σε τριβλία (Aerobic Plate Count). Μικροβιακές απαριθμήσεις, για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των μικροβιακών πληθυσμών, πραγματοποιήθηκε σε κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιώντας έναν microtiter Most Probable Number (MPN) προσδιορισμό. Οι χημικές αναλύσεις έγιναν με χρήση συσκευής GC/MS.

3.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στον χώρο του πολυτεχνείου Κρήτης και συγκεκριμένα στα: «Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας», του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος και στο «Εργαστήριο Ανάλυσης Ρευστών & Πυρήνων Υπόγειων Ταμιευτήρων», του τμήματος Μηχανικών Ορυκτών πόρων. Ο ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας (σύμφωνα με το πρωτόκολλο της EPA), αναφέρεται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.

3.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός μικροβιολογικών αναλύσεων

1. Απιονισμένο νερό
2. Βοριοπυριτικές κωνικές φιάλες*
3. Χαρτί ζύγισης
4. Bushnell-Hass*
5. Πιπέτες Pasteur (αποστειρωμένες)
6. Πολυκάναλη πιπέτα
7. Συσκευή ανάδευσης (Vortex)
8. Tips (αποστειρωμένα)
9. Crude oil*
10. Δονούμενη τράπεζα (Shaker)
11. Microtitier MPN plates (96-well)*
12. Pans (αλουμινένια κεσεδάκια)*
13. Marine agar*
14. Σωλήνες αραίωσης και καπάκια (dilution tubes)*

15. Αποστειρωτικός κλίβανος
16. Ζυγαριά ακριβείας 0,0001g
17. Τριβλία
18. Falcons (αποστειρωμένα)
19. Βαφή INT (p-iodotetrazolium violet dye 75mg/10ml απιονισμένου νερού)
20. Απαγωγός UV

Όλα τα είδη με «*» αποστειρώθηκαν σε αποστειρωτικό κλίβανο πριν από τη χρήση τους, τα υπόλοιπα είτε βρίσκονταν σε αποστειρωμένη συσκευασία είτε αποστειρώθηκαν με ακτίνες UV εντός του απαγωγού.

3.3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός χημικών αναλύσεων

1. Διαχωριστικές χοάνες
2. Κωνικές φιάλες
3. Σφαιρικές φιάλες
4. Ογκομετρικοί κύλινδροι
5. Φιαλίδια (vials)
6. Υαλοβάμβακας
7. Θειικό νάτριο
8. Διχλωρομεθάνιο (DCM-Dichloromethane)
9. Εξάνιο (C_6H_{14})
10. Ζυγαριά ακριβείας 0,0001g
11. Πιπέτες και πουάρ
12. Αφυγραντήρας κενού
13. Παροχή αζώτου (Nitrogen Flow)
14. Απαγωγός
15. Περιστροφικός εξατμιστής (Rotorvapor)
16. Στήλες SPE
17. Συσκευή GC-MS- Αέριος Χρωματογράφος-Φασματογράφος Μάζας

3.4 Προετοιμασία- Αντιδραστήρια και μέσα καλλιέργειας

3.4.1 Προετοιμασία θαλασσινού νερού

Οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε φυσικό θαλασσινό νερό, το οποίο συλλέχθηκε από την παραλία του Αγ. Ονούφριου στην περιοχή Ακρωτηρίου (Χανιά, Κρήτη), μια περιοχή, μη επιβαρυνμένη με βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Το νερό πρέπει να χρησιμοποιείται εντός επτά ημερών και η δειγματοληψία του να πραγματοποιείται μετά το τέλος της εποχής των βροχοπτώσεων. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι το θαλασσινό νερό αποστειρώθηκε πριν από τη χρήση του.

3.4.2 Προετοιμασία πετρελαίου

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένα ελαφρύ ιρανικό αργό πετρέλαιο (crude oil), το οποίο πριν την χρήση του υποβλήθηκε σε τεχνητή γήρανση με θέρμανση στους 200 °C (392 °F) σύμφωνα με τη μέθοδο ASTM D86 (Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products), έτσι ώστε να απομακρυνθεί το ελαφρύ κλάσμα των υδρογονανθράκων (<C15). Η διαδικασία της γήρανσης πραγματοποιείται με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών, δεδομένου ότι από το πετρέλαιο που ρυπαίνει μια περιοχή, μέχρι και το 50% των πιο τοξικών ελαφρών συστατικών του θα εξατμιστούν μέσα στις πρώτες δώδεκα ώρες από την εμφάνιση της πετρελαιοκηλίδας [U.S.EPA, 1999].

IRANIAN LIGHT CRUDE OIL	
Unweathered (T= 25°C)	
Gravity	0,8232 gr/cm ³
Specific Gravity (S.G)	0,8247 gr/cm ³
Weathered (T= 25°C)	
Gravity	0,8886 gr/cm ³
Specific Gravity (S.G)	0,8902 gr/cm ³

Πίνακας 3-1: Βαρύτητα και ειδική βαρύτητα αργού πετρελαίου που χρησιμοποιήθηκε κατά τις πειραματικές δοκιμές.

3.4.3 Μικροβιακά consortia

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί (μικροβιακά κονσόρσια) που χρησιμοποιήθηκαν για την βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων απομονώθηκαν από δείγμα που συλλέχτηκε από τον κόλπο της Ελευσίνας (Αττική), μια ιδιαίτερα ρυπασμένης περιοχής από πετρελαιοειδή. Στην εικόνα 3-7 φαίνονται τα είδη των μικροοργανισμών που από τα οποία αποτελείται κάθε δείγμα.

PARTNER	SAMPLE OF ORIGIN	CONSORTIUM CODE	PHYLOGENETIC COMPOSITION	MEDIUM OF ISOLATION
TUC	Eleysina bay	E4	<i>Thalassospira lucentensis</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Shewanella frigidimarina</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	ONR7/crude oil 0.5% w/v
TUC	Eleysina bay	E8	<i>Marinomonas vaga</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Thalassospira lucentensis</i> , <i>Shewanella frigidimarina</i>	ONR7/crude oil 0.5% w/v
TUC	Eleysina bay	E9	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Halomonas marina</i> , <i>Thalassospira lucentensis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Roseovarius crassostreae</i>	ONR7/crude oil 0.5% w/v

Πίνακας 3-2 : Μικροβιακά κονσόρσια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις πειραματικές δοκιμές.

Ο εγκλιματισμός και η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά σε θρεπτικό ONR7² με πετρέλαιο, έτσι ώστε να φτάσουν την επιθυμητή συγκέντρωση για χρήση. Συγκεκριμένα σε κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν 50ml ONR7, 100μl από κάθε consortium (E4/E8/E9) και 304μl πετρέλαιο. Στη συνέχεια τα αρχικά αυτά δείγματα πληθυσμών (inoculum) τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρες με ρυθμό 120rpm και θερμοκρασία 20°C για μια εβδομάδα. Τέλος για κάθε ένα από τα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις, από τις οποίες έγινε η καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμούς σε τριβλία. Η διαδικασία των αραιώσεων και της καταμέτρηση των πληθυσμών περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.5. Προετοιμασία δείγματος

Σε κωνικές φιάλες, στις οποίες επάνω σημειώθηκε το κατάλληλο κωδικό όνομα (E4/E8/E9), η μέρα δειγματοληψίας και ο χαρακτηριστικός αριθμός επανάληψης (1/2/3), τοποθετήθηκαν με χρήση πιπέτας Pasteur (διαφορετικής για κάθε δείγμα) :

² Υποκατάστατο θαλασσινού νερού.

- 47ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.
- 287μl crude oil.
- 2ml (inoculum) από τα E4 και E8 και 4ml από το E9.
- 1ml NP (nutrients: KNO_3 - KH_2PO_4) (αποστειρωμένο).

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται με προσοχή (ώστε να μην προσκολληθεί το πετρέλαιο στα τοιχώματα) σε αναδευτήρες με ρυθμό 120rpm σε θερμοκρασία 20°C έως την στιγμή της δειγματοληψίας.

3.6 Μικροβιολογική ανάλυση

3.6.1 Προετοιμασία τριβλίων με Marine agar (θρεπτικού μέσου)

Σε ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου τοποθετούνται:

- 1L απιονισμένο νερό,
- 55,25gr Marine Agar

Το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται τη φιάλη στον αποστειρωτικό κλίβανο. Αφού το βγει από τον κλίβανο αφήνεται να κρυώσει λίγο και στη συνέχεια τοποθετείται μικρή ποσότητα μίγματος στα τριβλία. Αφού κρυώσει και σταθεροποιηθεί εντελώς το μίγμα, τα τριβλία τοποθετούνται στο ψυγείο.

3.6.2 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Bushnell-Hass (B.H.)

Σε ογκομετρική φιάλη δύο λίτρων τοποθετούνται:

- 2L απιονισμένο νερό
- 3,27gr B.H.
- 20 gr NaCl (αλάτι)

Το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται στον αποστειρωτικό κλίβανο. Αφού κρυώσει το μίγμα είναι έτοιμο για χρήση.

3.6.3 Μικροβιακή απαρίθμηση

3.6.3.1 Αραιώσεις

Σε αποστειρωμένους σωλήνες αραιώσης (delution tubes) τοποθετούνται:

- 9ml B.H. και
- 1ml δείγματος τοποθετείται στον πρώτο σωλήνα και αναδεύεται (αραίωση 1:10).

Παίρνοντας πλέον 1ml από κάθε προηγούμενο σωλήνα και τοποθετώντας στον επόμενο. Η διαδικασία συνεχίστηκε διαδοχικά μέχρι την 10^{-10} αραιώση.

Για την καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμού τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 9ml ONR7 και 1ml δείγματος (inoculum) και η διαδικασία συνεχίστηκε διαδοχικά μέχρι την έβδομη αραιώση (10^{-7}).

3.6.3.2 Μέτρηση πληθυσμού μικροοργανισμών στα τριβλία (plate counts)

Από κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος (αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), έτσι ώστε ο αριθμός CFU να είναι μεταξύ 30 και 300, τοποθετούνται και απλώνονται προσεκτικά 100μl σε αποστειρωμένα τριβλία στα οποία έχει ήδη τοποθετηθεί και σταθεροποιηθεί το αποστειρωμένο Άγαρ. Στη συνέχεια τα τριβλία (αφού σταθεροποιηθούν πλήρως) αναποδογυρίζονται, ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση υγρασίας στην επιφάνεια του Άγαρ. Για κάθε αραιώση πραγματοποιούνται 2 επαναλήψεις. Τέλος τα τριβλία τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στον 20°C για μια εβδομάδα και στη συνέχεια γίνεται η καταμέτρηση του πληθυσμού.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά για κάθε δείγμα (την πρώτη μέρα του πειράματος) για την καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμού. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται η καταμέτρηση των αρχικών μικροβιακών κοινοτήτων για κάθε δείγμα. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται ο αριθμός των αποικιών που δημιούργησε κάθε ομάδα μικροοργανισμών (consortium).

Αραίωση	1/10 ⁶		AV
Επανάληψη	1	2	
E4	60	72	66
E8	32	23	26
Αραίωση	1/10 ⁵		AV
Επανάληψη	1	2	
E9	84	75	80

Πίνακας 3-2: Αριθμός μικροβιακών αποικιών αρχικού πληθυσμού κάθε δείγματος στις αντίστοιχες αραιώσεις.

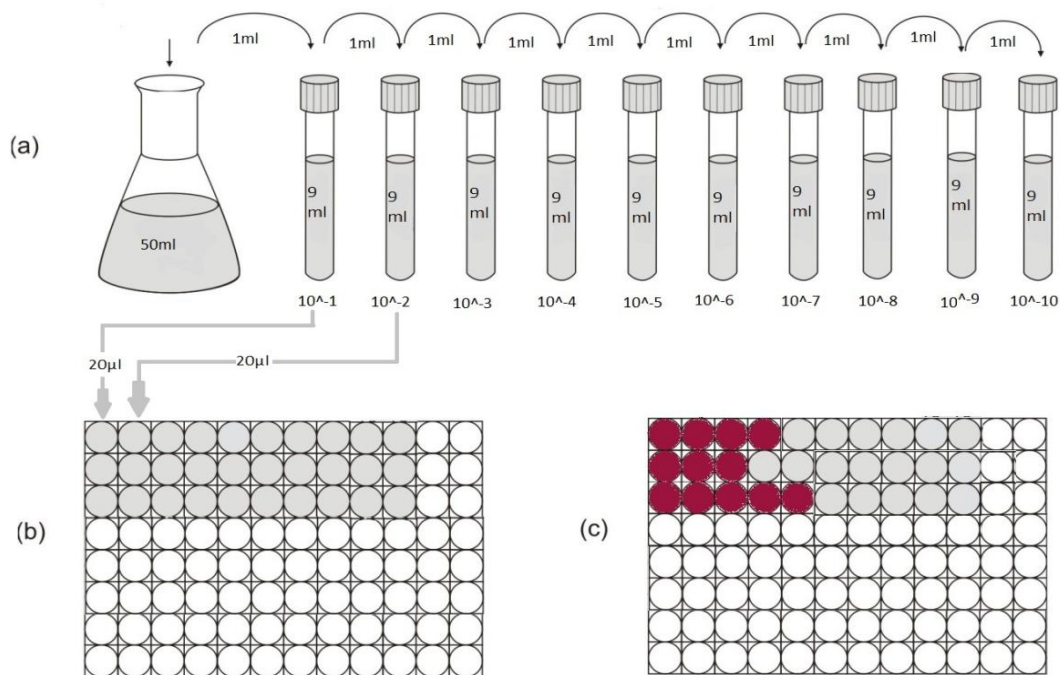
Για τον υπολογισμό του αρχικού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των αποικιών. Οι τιμές του πίνακα αναφέρονται στα 100μl. Κάνοντας αναγωγή των τιμών στο 1ml, οι αρχικοί πληθυσμοί για κάθε δείγμα θα είναι οι εξής: 660×10^9 , 260×10^9 και 800×10^8 για τα E4, E8 και E9 αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι κατά πολλές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτές των αρχικών πληθυσμών που προκύπτουν από τις MPN αναλύσεις. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι γιατί στα τριβλία μετρήθηκε η συνολική μικροβιακή κοινότητα, συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών που δεν είναι καταναλωτές υδρογονανθράκων.

3.6.3.3 Εμβολισμός 96microtiter well mpn plates- MPN

Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται:

- 180μL B.H.
- 5μL crude oil
- 20μL από κάθε μια από τις παραπάνω αραιώσεις, ξεκινώντας από το πιο πυκνό (για κάθε αραιώση πραγματοποιούνται 3 επαναλήψεις).

Τα MPN plates τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στους 20°C για δεκαπέντε (15) ημέρες. Μετά το πέρας των 15 ημερών προστίθενται στα πηγαδάκια 50μl βαφή INT (την οποία πρώτα έχει φιλτραριστεί και αποθηκευτεί σε αποστειρωμένα falcons). Μετά από ακόμα μια ημέρα επώασης γίνεται καταμέτρηση των «θετικών» πηγαδιών, τα οποία φέρουν κόκκινο ημοβ χρώμα και σημειώνεται και η αραιώση στην οποία εμφανίστηκαν. Τέλος τα παραπάνω δεδομένα εισάγονται στο πρόγραμμα.



Εικόνα 3-1: Διαδικασία μεθόδου MPN.

3.7 Προετοιμασία και μέθοδοι χημικών αναλύσεων

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας βιοαποδόμησης πετρελαιοειδών, πραγματοποιείται μέσω της ποσοτικοποίησης των μεταβολών της συγκέντρωσης των κορεσμένων και αρωματικών συστατικών των δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση των μεταβολών αυτών γίνεται μέσω των χημικών αναλύσεων με χρήση αέριου χρωματογράφου- φασματογράφου μάζας (συσκευή GC-MS). Πριν από το στάδιο των χημικών αναλύσεων, τα δείγματα υπόκεινται σε μια σειρά προκαταρκτικών διεργασιών. Οι διεργασίες αυτές περιλαμβάνουν αρχικά την **εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE)** και στη συνέχεια την **εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)**. Όλες οι επιμέρους διεργασίες των χημικών αναλύσεων περιγράφονται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.

3.7.1 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE) σε διαχωριστική χοάνη

- Προσθήκη στο προς εκχύλιση δείγμα 50ml surrogate συγκέντρωσης 200ppm σε 10-phrenanthrene και 5a-androstane. Τόσο το δείγμα όσο και το surrogate θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Τοποθέτηση του δείγματος στη διαχωριστική χοάνη (η οποία στηρίζεται σε μεταλλική βάση), αφού πρώτα ελεγχθεί πως η στρόφιγγα της χοάνης είναι κλειστή.
- Προσθήκη 50ml DCM στο δείγμα, μέρος του οποίου χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα της κωνικής φιάλης στην οποία βρισκόταν το δείγμα.
- Ανάδευση της χοάνης για περίπου ένα λεπτό και συνεχής εκτόνωση έτσι ώστε να απελευθερωθούν οι παραγόμενοι ατμοί του διαλύτη. Στη συνέχεια αφήνεται να ηρεμήσει και να γίνει διαχωρισμός των δυο φάσεων.
- Προετοιμασία στήλης από την οποία θα περάσει το εκχύλισμα, στην οποία τοποθετείται μικρής ποσότητας υαλοβάμβακα και θειικού νατρίου (Na_2SO_4 , ενεργοποιημένο στους 400°C για 4 ώρες). Τέλος γίνεται έκπλυση (conditioning) της στήλης με μικρή ποσότητα DCM.
- Αφού περάσει όλο το εκχύλισμα από τη στήλη θειικού νατρίου, μεταφέρεται και τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator), για περίπου 10 λεπτά (έως ότου εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης).
- Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη που περιέχει το εξατμισμένο δείγμα τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού για περίπου 24 ώρες.
- Τέλος το δείγμα μεταφέρεται με χρήση DCM (Supelco, suprasolve) σε ζυγισμένα vials 4ml και αφού τοποθετηθεί σε ρεύμα αζώτου για να εξατμιστεί ο διαλύτης, στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού για 24 ώρες και αποθηκεύεται.

3.7.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)- Κλασματοποίηση πετρελαίου

- Έκπλυση της στήλης με τους διαλύτες (DCM και εξάνιο).
- Ζύγιση 5-10mg δείγματος και τοποθέτηση σε προζυγισμένο φιαλίδιο και διάλυση του σε 1ml εξανίου.
- Πραγματοποίηση έκπλυσης (*preconditioning*) της στήλης με 2ml εξανίου.
- Τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη SPE.
- Αφού περάσει όλο το δείγμα από τη στήλη γίνεται τοποθέτηση 4ml (2x2) εξανίου σε κάθε στήλη για την ανάκτηση του πρώτου κλάσματος που αντιστοιχεί στους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (αλκάνια) FI.
- Στη συνέχεια γίνεται τοποθέτηση 4ml (2x2) DCM σε κάθε στήλη για την ανάκτηση του δεύτερου κλάσματος που αντιστοιχεί στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες FII.
- Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας γίνεται μεταφορά των 2 κλασμάτων σε προζυγισμένα φιαλίδια (των 2ml), τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε ξηραντήρα κενού για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα φιαλίδια ζυγίζονται ξανά.

3.7.3 Ανάλυση GC-MS

- Στα φιαλίδια που περιέχουν τα FI-αλειφατικά και FII-αρωματικά κλάσματα, προστίθεται 1ml n-C6 και 1ml DCM, αντίστοιχα.
- Στα παραπάνω διαλύματα προστίθενται 5μl από το διάλυμα των εσωτερικών προτύπων συγκέντρωσης 200 ppm. Η τελική συγκέντρωση (πριν την ένεση) των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 1ppm.
- Τα δείγματα είναι έτοιμα για ένεση στο GC/MS.
- Ένα τυφλό δείγμα και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων.
- Τα συστατικά ταυτοποιούνται με βάση τον χρόνο συγκράτησης και του φάσματος των μαζών.
- Για κάθε συστατικό υπολογίζονται οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης.
- Η ποσοτικοποίηση του κάθε αναλυτή γίνεται με βάση τους συντελεστές απόκρισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

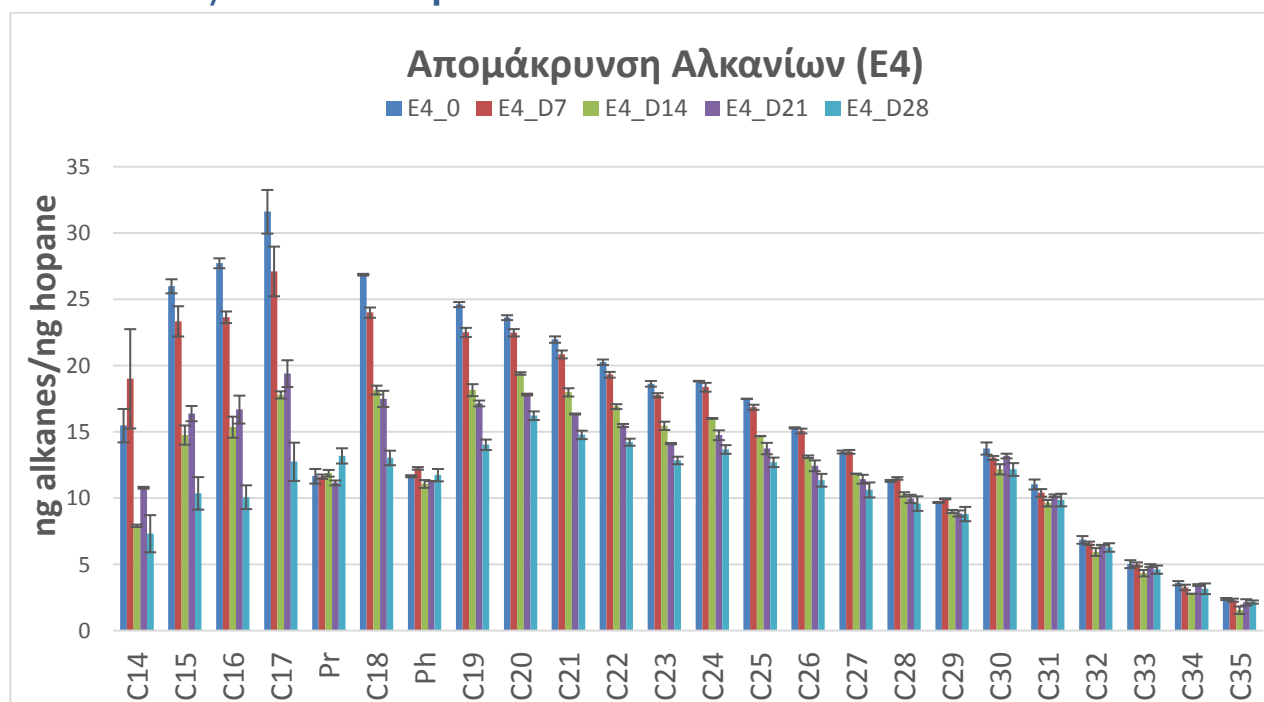
Στις παραγράφους που ακολουθούν αναφέρονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα αυτά αναφέρονται στις αναλύσεις GC/MS και MPN, καθώς επίσης και στις φυσικές παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Στο τέλος του κεφαλαίου γίνεται συγκριτική ανάλυση της αποδοτικότητας των δειγμάτων. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και τα τελικά διαγράμματα που παραθέτονται παρακάτω έγιναν σε υπολογιστικό φύλλο Excel. Αναλυτικοί πίνακες με τα αποτελέσματα όλων των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας παρατίθενται στο παράρτημα Β.

4.1 Δείγμα Ε4

4.1.1 Φυσικές παρατηρήσεις

Κατά την πρώτη εβδομάδα εφαρμογής του πειράματος, το δείγμα Ε4 εμφάνιζε έντονο διαχωρισμό μεταξύ της φάσης ύδατος-πετρελαίου. Στην συνέχεια όμως το πετρέλαιο εμφάνιζε όλο και μεγαλύτερη διασπορά (κυρίως κατά τη δεύτερη και τρίτη εβδομάδα), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σχεδόν ομογενοποιημένου μίγματος. Η σταδιακή αυτή διασπορά του πετρελαίου αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή διάσπαση των συστατικών του.

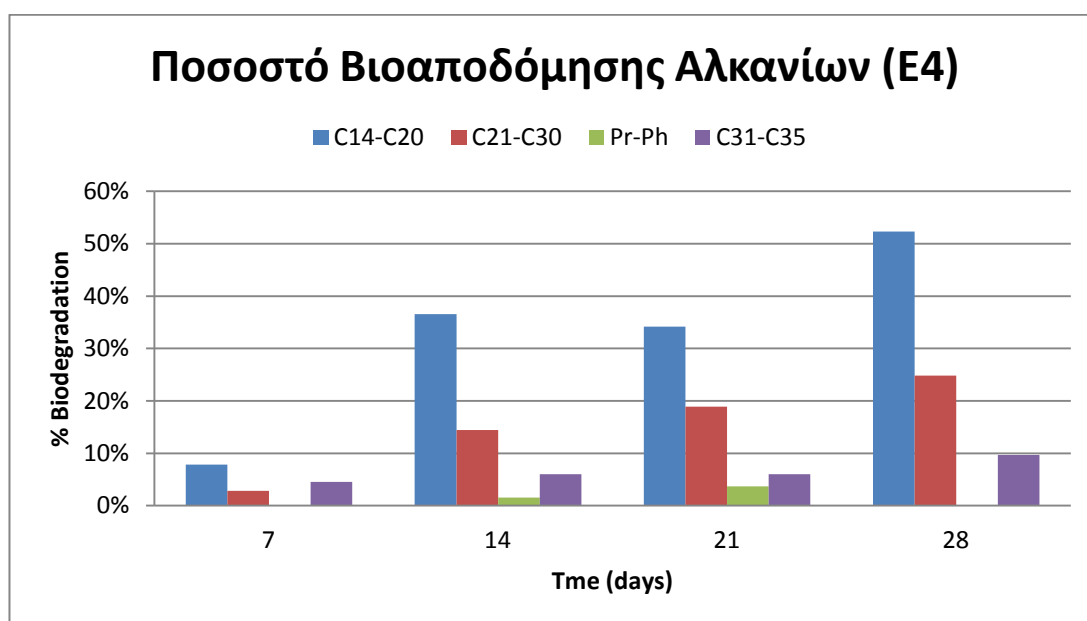
4.1.2 GC/MS Ανάλυση



Διάγραμμα 4-1: Κανονικοποιημένη μεταβολή της περιεκτικότητας κανονικών αλκανίων και ισοπρενοειδών, κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο, του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος Ε4, ανά ημέρα δειγματοληψίας

Στο διάγραμμα 4-1 φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο-άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του κορεσμένου κλάσματος (αλκάνια), για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (0,7,14, 21 και 28). Κάθε στήλη αναφέρετε στον μέσο όρο κάθε των επαναλήψεων κάθε συστατικού. Οι τυπικές αποκλίσεις αυτών των μέσων όρων ήταν σχετικά μικρές (0,002-1,87) και σημειώνονται πάνω από κάθε στήλη.

Παρατηρώντας το διάγραμμα μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό ότι η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στα μικρού μοριακού βάρους συστατικά (C14-C20), ενώ για τα μεσαίου μοριακού βάρους (C21-C30) η μείωση της ποσότητάς τους είναι αισθητά μικρότερη. Τα μεγάλου μοριακού βάρους συστατικά (C31-C35) δεν εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερη μείωση. Επίσης σταθερά παραμένουν και τα ισοπρενοειδή (πριστάνιο-φυτάνιο). Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να γίνουν πιο εύκολα κατανοητές στο επόμενο διάγραμμα.



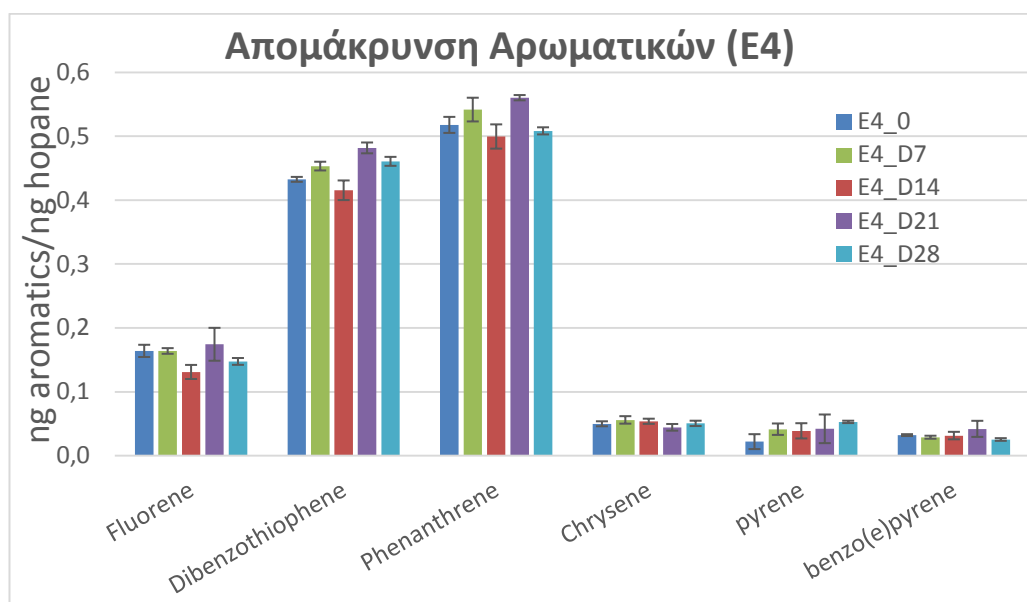
Διάγραμμα 4-2: Ποσοστό βιοαποδόμησης κατηγοριών του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος Ε4, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x) κάθε κατηγορίας συστατικών του κορεσμένου κλάσματος (ελαφριού, μέτριου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια και ισοπρενοειδή), υπολογισμένος ως προς την αρχική ποσότητα, για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).

Από το διάγραμμα φαίνεται ξεκάθαρα η μεγάλη διαφορά στην αποδόμηση των ελαφρύτερων συστατικών συγκριτικά με τα πιο βαριά. Συγκεκριμένα για τα αλκάνια C14-C20 σημειώνεται συνολικός βαθμός βιοαποδόμησης (στις 28 ημέρες) της τάξης του 52%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα αλκάνια C21-C30 και C31-C35 είναι 25% και 10% αντιστοίχως. Τα ισοπρενοειδή (Pr-Ph) εμφανίζουν αμελητέες μεταβολές (<4% αποδόμηση), παραμένοντας ουσιαστικά αμετάβλητα.

Γενικά παρατηρείται πως το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμησης πραγματοποιείται εντός των πρώτων δύο εβδομάδων (πχ τα αλκάνια C14-C20 σημειώνουν ποσοστό απομάκρυνσης ίσο με 37% μέχρι την δέκατη τέταρτη ημέρα), ενώ για τις επόμενες δυο εβδομάδες (14-28 ημέρες) σημειώνεται μείωση του ρυθμού βιοαποδόμησης. Πιο αναλυτικά κατά τη διάρκεια της τρίτης εβδομάδας (14-21 ημέρες) το ποσοστό βιοαποδόμησης

παραμένει σταθερό, ενώ κατά την τέταρτη εβδομάδα (21-28 ημέρες) παρατηρείται εκ νέου μια μικρή αύξηση του βαθμού βιοαποδόμησης.



Διάγραμμα 4-3: Μείωση ποσότητας του αρωματικού κλάσματος, του δείγματος E4, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο- άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του αρωματικού κλάσματος (PAHs), για κάθε ημέρα (0,7,14, 21 και 28)

Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην απομάκρυνση των αρωματικών. Σε γενικές γραμμές (εκτός ίσως από κάποιες αμελητέες αυξομειώσεις) το αρωματικό κλάσμα παραμένει σταθερό και αμετάβλητο καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

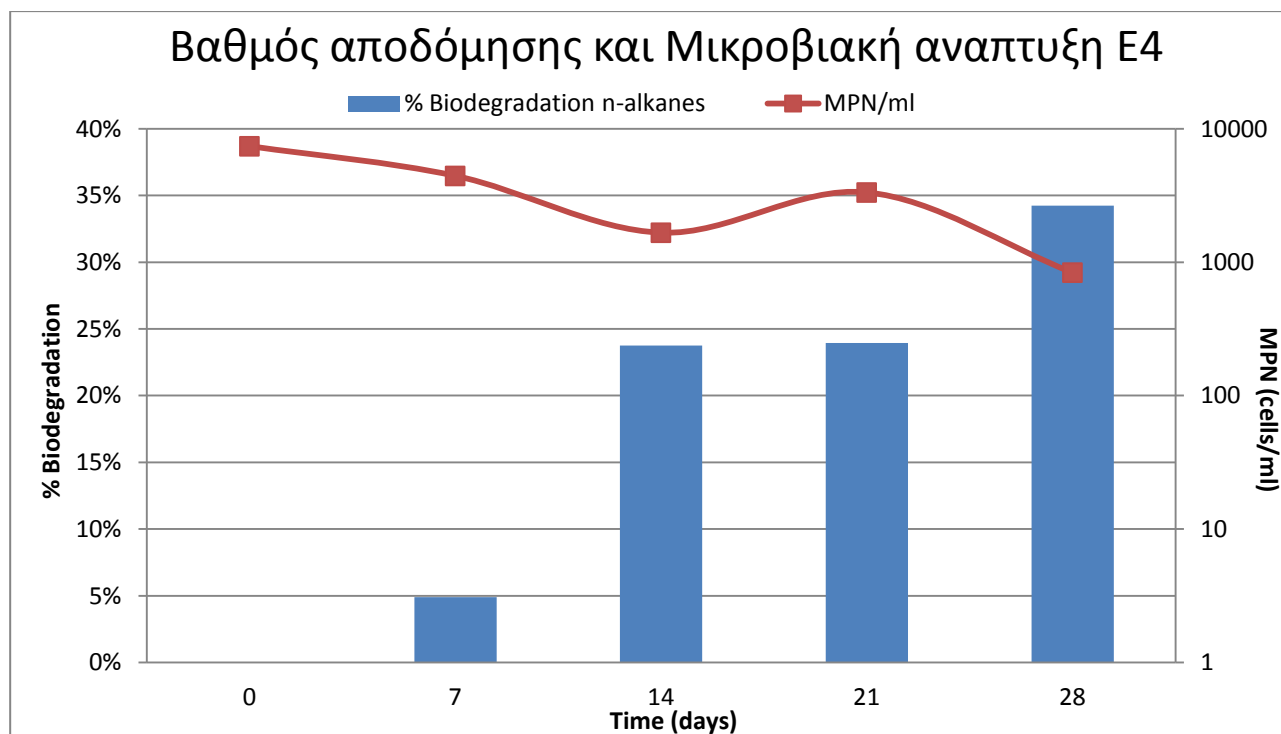
4.1.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα που έδωσε το πρόγραμμα της EPA για τον υπολογισμό MPN σύμφωνα με τα δεδομένα που εισάχθηκαν. Τα δεδομένα που παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση δεν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό του μέσου όρου κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

	MPN/ml			
	1	2	3	Avarege
Day 0	7407			7407
Day 7	427	1469	7407	4438
Day 14	427	2398	933	1665
Day 21	4273	239	2398	3335
Day 28	740	933	240	836

Πίνακας 4-1: Αποτελέσματα MPN του δείγματος E4.

Από την επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων σε υπολογιστικό φύλλο Excel και των συνδυασμό τους με τα αντίστοιχα ποσοστά απομάκρυνσης προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 4-4: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με τη μικροβιακή ανάπτυξη του δείγματος Ε4.

Στο διάγραμμα 4-4 απεικονίζεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x- αριστερά σε λογαριθμική κλίμακα), συγκριτικά με την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας (άξονας x- δεξιά), όπως αυτά καταγράφηκαν για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).

Η μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα Ε4 φαίνεται να παρουσιάζει γενική μείωση. Συγκεκριμένα για το διάστημα των πρώτων δύο εβδομάδων (0-14 ημέρες) εμφανίζει μια σχετικά μεγάλη μείωση. Στη συνέχεια σημειώνεται μια μικρή αύξηση του πληθυσμού (21 ημέρες), ενώ στη συνέχεια ακολουθεί επίσης μείωση του πληθυσμού μέχρι τις 28 ημέρες. Οι αυξομειώσεις αυτές οφείλονται πιθανόν σε περιορισμό του υποστρώματος ή στην ενεργοποίηση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών.

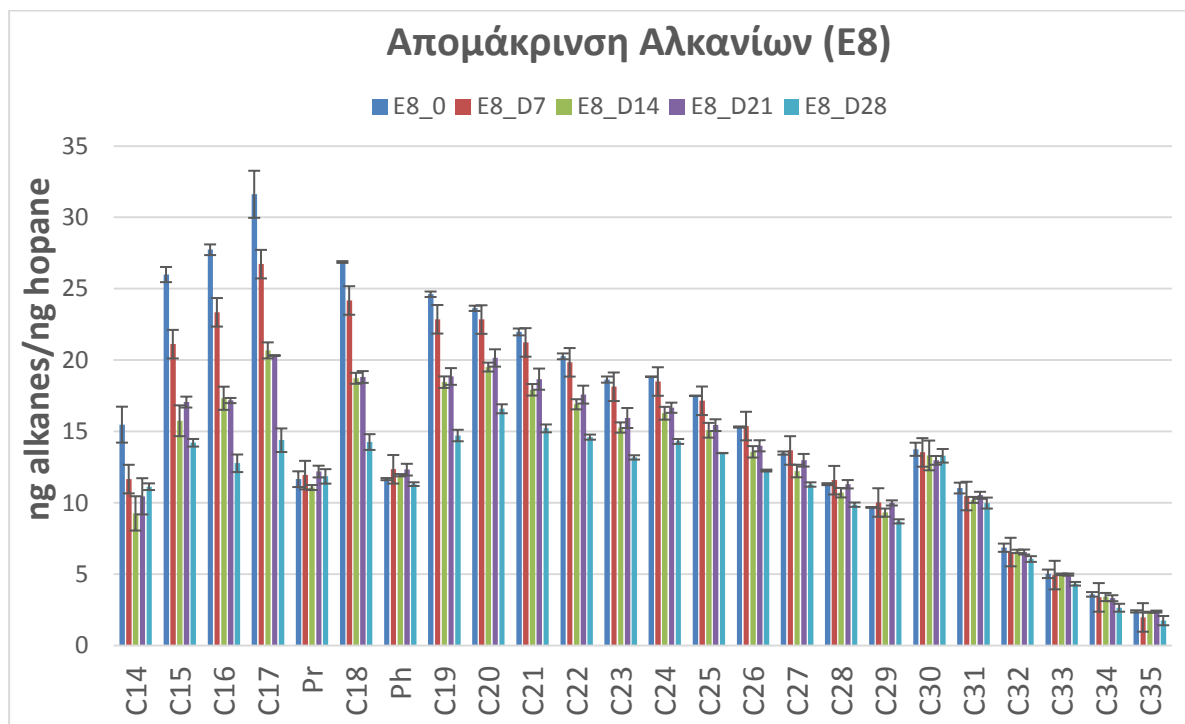
4.2 Δείγμα Ε8

4.2.1 Φυσικές παρατηρήσεις

Κατά την πρώτη εβδομάδα εφαρμογής του πειράματος, το δείγμα Ε8 εμφάνιζε έντονο διαχωρισμό μεταξύ της φάσης ύδατος-πετρελαίου. Στην συνέχεια όμως το πετρέλαιο εμφάνιζε όλο και μεγαλύτερη διασπορά (κυρίως κατά τη δεύτερη και τρίτη εβδομάδα), με

αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σχεδόν ομογενοποιημένου μίγματος. Η σταδιακή αυτή διασπορά του πετρελαίου αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή διάσπαση των συστατικών του.

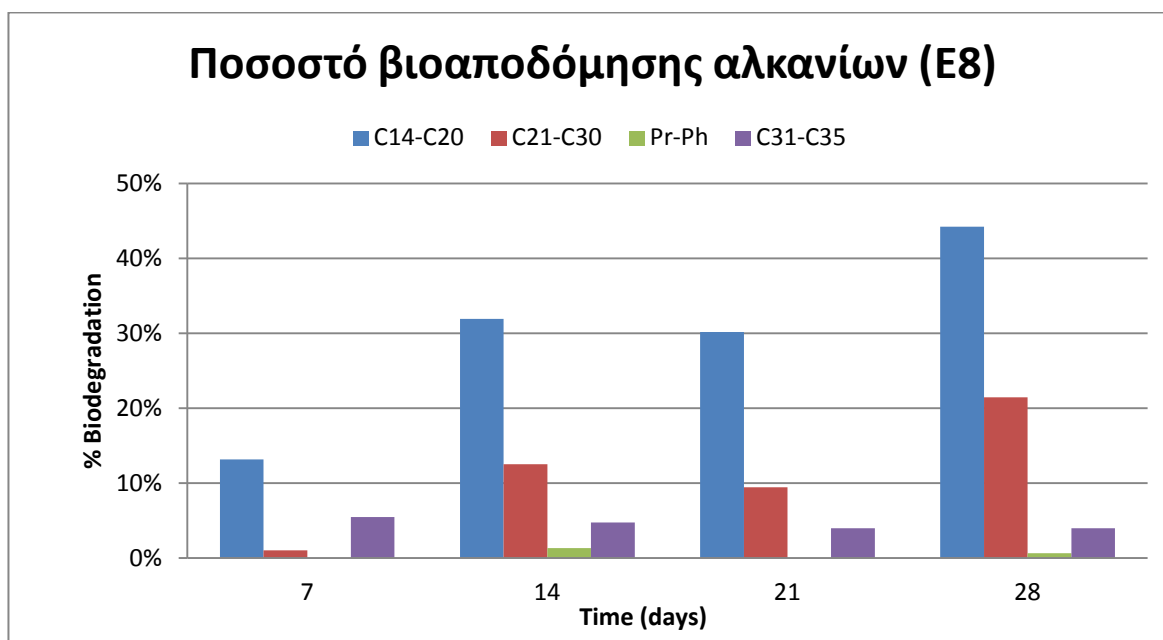
4.2.2 GC/MS Ανάλυση



Διάγραμμα 4-3: Κανονικοποιημένη μεταβολή της περιεκτικότητας κανονικών αλκανίων και ισοπρενοειδών, κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο, του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος E8, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο- άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του κορεσμένου κλάσματος (αλκάνια), για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (0,7,14, 21 και 28). Κάθε στήλη αναφέρετε στον μέσο όρο κάθε των επαναλήψεων κάθε συστατικού. Οι τυπικές αποκλίσεις αυτών των μέσων όρων ήταν σχετικά μικρές (0,01-1,55) και σημειώνονται πάνω από κάθε στήλη.

Παρατηρώντας τον πίνακα φαίνεται πως τα αλκάνια από C14-C20 εμφανίζουν μεγαλύτερη μείωση, σε σχέση με τα μέτριοι μοριακού βάρους αλκάνια (C21-C30). Τα μεγάλοι μοριακού βάρους αλκάνια (C31-C35) εμφανίζονται σχεδόν ανέπαφα από την όλη διαδικασία. Τα ισοπρενοειδή (Pr-Ph) παραμένουν σχεδόν σταθερά και για τις τέσσερις εβδομάδες. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να γίνουν πιο εύκολα κατανοητές στο επόμενο διάγραμμα.



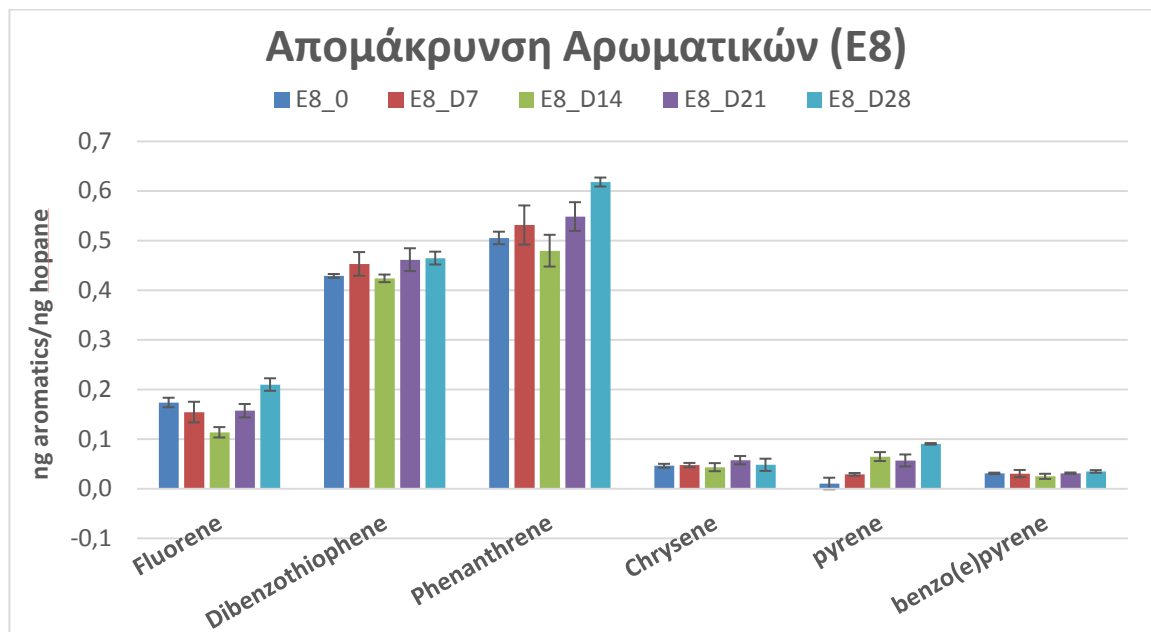
Διάγραμμα 4-6: Ποσοστό βιοαποδόμησης κατηγοριών του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος Ε8, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x) κάθε κατηγορίας συστατικών (ελαφριού, μέτριου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια και ισοπρενοειδή), υπολογισμένος ως προς την αρχική ποσότητα, για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).

Από το διάγραμμα φαίνεται ξεκάθαρα η μεγάλη διαφορά στην αποδόμηση των ελαφρύτερων συστατικών συγκριτικά με τα πιο βαριά. Συγκεκριμένα για τα αλκάνια C14-C20 σημειώνεται συνολικός βαθμός βιοαποδόμησης (στις 28 ημέρες) της τάξης του 44%. Αμέσως μετά έρχονται τα αλκάνια C21-C30 τα οποία παρουσιάζουν συνολικό ποσοστό αποδόμησης της τάξης του 21%. Τα βαριά αλκάνια (C31-C35) παρουσιάζουν ένα ελάχιστο ποσοστό βιοαποδόμησης (< 5%) το οποίο παραμένει σταθερό. Τέλος τα ισοπρενοειδή (Pr-Ph) δεν εμφανίζουν σημαντικά αποτελέσματα αποδόμησης (<3%).

Από το διάγραμμα φαίνεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμησης (για όλα σχεδόν τα αλκάνια ανεξαρτήτου μοριακού βάρους) πραγματοποιείται εντός των πρώτων δύο εβδομάδων (πχ το 32% των C14-C20 έχει βιοαποδομηθεί μέσα στο διάστημα 0-14 ημέρες), ενώ για τις επόμενες δυο εβδομάδες (14-28 ημέρες) σημειώνεται μείωση του ρυθμού βιοαποδόμησης.

Στο επόμενο διάγραμμα φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο-άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του αρωματικού κλάσματος (PAHs), για κάθε ημέρα (0,7,14, 21 και 28)



Διάγραμμα 4-7: Μείωση ποσότητας του αρωματικού κλάσματος, του δείγματος E8, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην απομάκρυνση των αρωματικών. Σε γενικές γραμμές (εκτός ίσως από κάποιες αμελητέες αυξομειώσεις το αρωματικό κλάσμα παραμένει σταθερό και αμετάβλητο καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

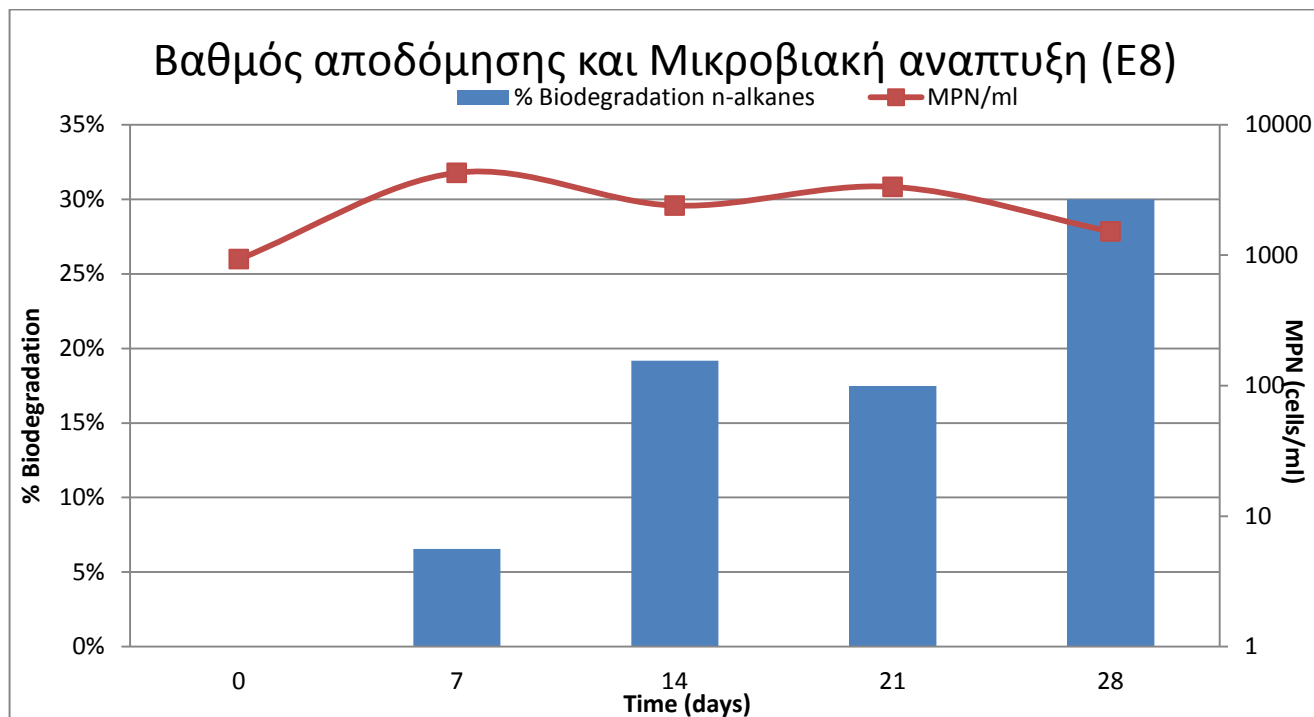
4.2.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα που έδωσε το πρόγραμμα της EPA για τον υπολογισμό MPN σύμφωνα με τα δεδομένα που εισάχθηκαν. Τα δεδομένα που παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση δεν χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

	1	2	3	Avarege
Day 0	933			933
Day 7	2398	4273	4273	4273
Day 14	427	2398	2398	2398
Day 21	2398	4273	933	3335
Day 28	933	238	2106	1520

Πίνακας 4-2: Αποτελέσματα MPN του δείγματος E8.

Από την επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων σε υπολογιστικό φύλλο Excel προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 4-8: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με τη μικροβιακή ανάπτυξη του δείγματος E8.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x- αριστερά), συγκριτικά με την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας (άξονας x- δεξιά), όπως αυτά καταγράφηκαν για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).

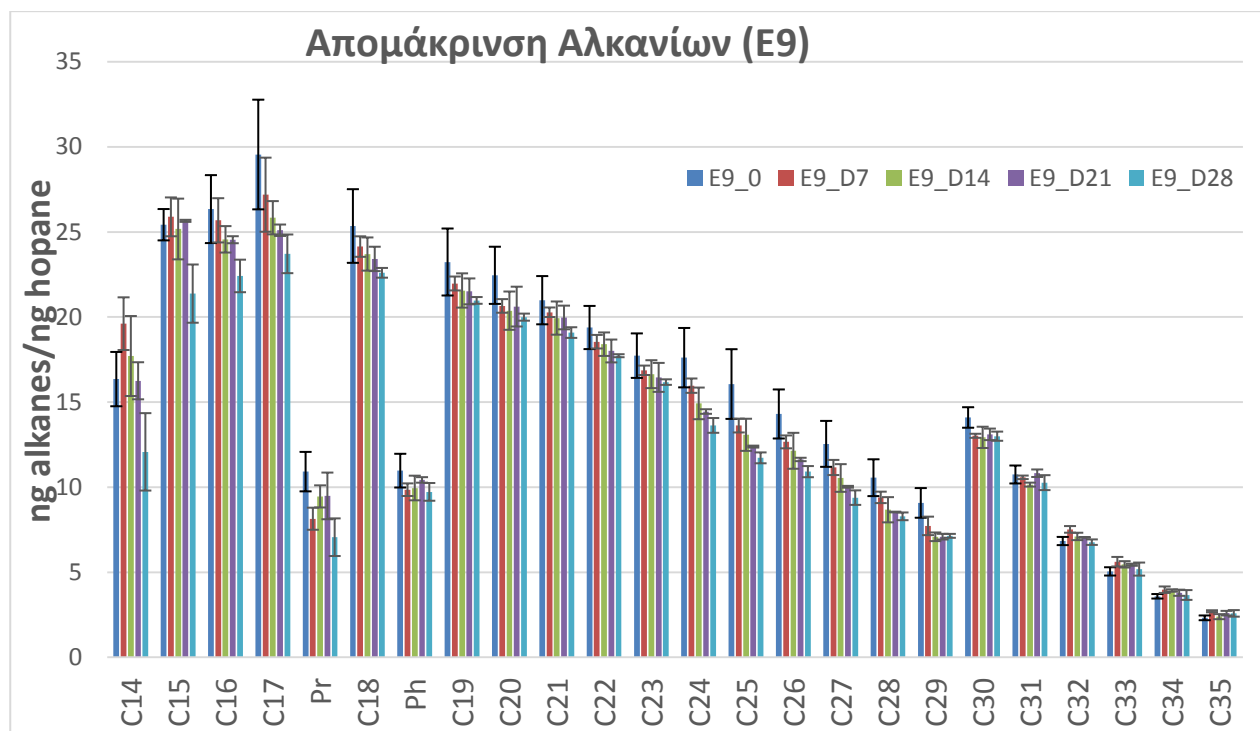
Η μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα E8 παραμένει σταθερή σε γενικές γραμμές με μια μικρή αυξητική τάση. Αναλυτικότερα το διάστημα της πρώτης εβδομάδας (0-7 ημέρες) ο πληθυσμός αυξάνεται περίπου κατά 4,5 φορές, ενώ για τις υπόλοιπες τρεις εβδομάδες παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις. Οι αυξομειώσεις αυτές πιθανόν οφείλονται σε περιορισμό του υποστρώματος και στην ενεργοποίηση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών.

4.3 Δείγμα E9

4.3.1 Φυσικές παρατηρήσεις

Το δείγμα E9 παρουσίαζε έντονο διαχωρισμό της φάσης πετρελαίου- ύδατος σε όλη σχεδόν τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Μετά την 21^η ημέρα εμφάνισε μια μικρή διασπορά πετρελαίου μέσα στο νερό. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι το δείγμα δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη διαδικασία της αποδόμησης του πετρελαίου, για το διάστημα στο οποίο εξετάστηκε.

4.3.2 GC/MS Ανάλυση

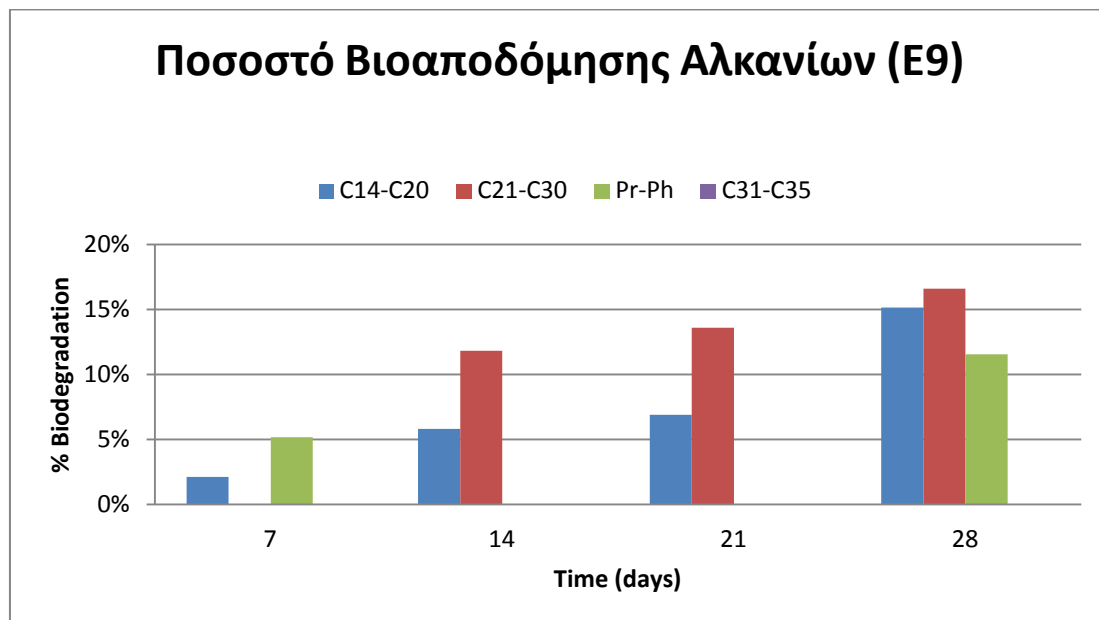


Διάγραμμα 4-9: Κανονικοποιημένη μεταβολή της περιεκτικότητας κανονικών αλκανίων και ισοπρενοειδών, κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο, του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος E8, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο- άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του κορεσμένου κλάσματος (αλκάνια), για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (0,7,14, 21 και 28). Κάθε στήλη αναφέρετε στον μέσο όρο κάθε των επαναλήψεων κάθε συστατικού. Οι τυπικές αποκλίσεις αυτών των μέσων όρων ήταν σχετικά μικρές (0,005-2,35) και σημειώνονται πάνω από κάθε στήλη.

Η υποψία που προέκυψε από τη φυσική παρατήρηση του δείγματος επιβεβαιώνεται και από το παραπάνω διάγραμμα, καθώς μείωση που παρατηρείται στην ποσότητα των συστατικών είναι αρκετά μικρή, ακόμα και για τα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια (C14-C20). Παράλληλα τα μέτριου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια (C21-C30 και C31-35 αντίστοιχα) παρουσιάζουν ελάχιστες έως μηδενικές μεταβολές. Αμελητέες μεταβολές εμφανίζουν επίσης και τα ισοπρενοειδή (Pr-Ph). Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να γίνουν πιο εύκολα κατανοητές στο επόμενο διάγραμμα.

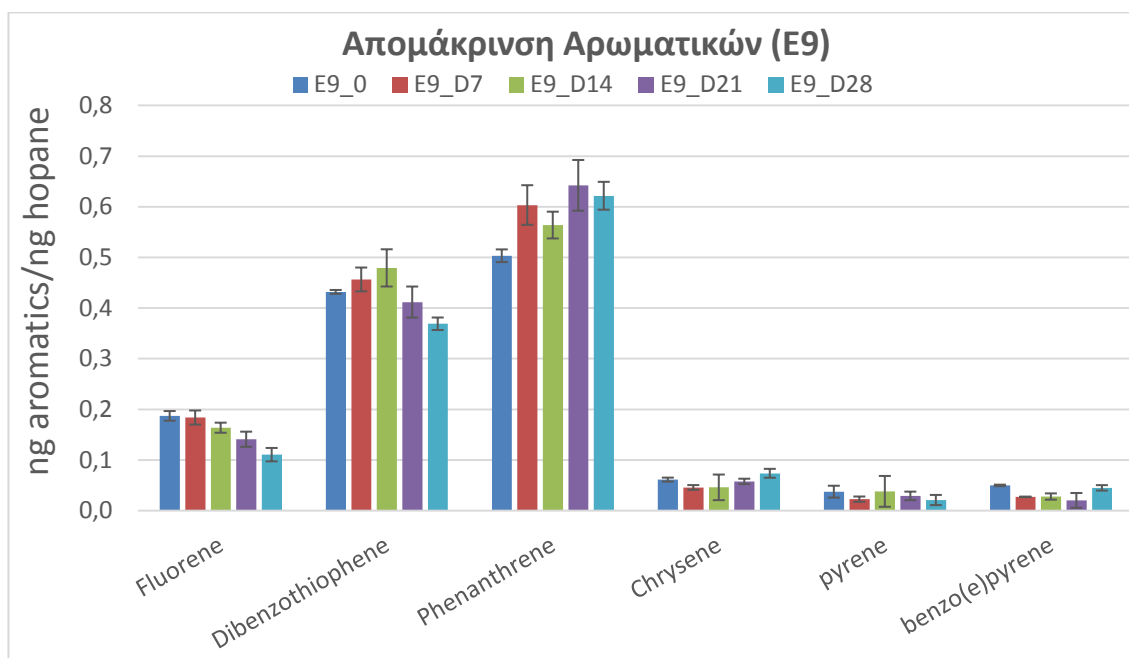
Στο επόμενο διάγραμμα φαίνεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x) κάθε κατηγορίας συστατικών (ελαφριού, μέτριου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια και ισοπρενοειδή), υπολογισμένος ως προς την αρχική ποσότητα, για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).



Διάγραμμα 4-10: Ποσοστό βιοαποδόμησης κατηγοριών του κορεσμένου κλάσματος, του δείγματος Ε9, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x) κάθε κατηγορίας συστατικών (ελαφριού, μέτριου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια και ισοπρενοειδή), υπολογισμένος ως προς την αρχική ποσότητα, για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y). Από το διάγραμμά φαίνεται πως για το δείγμα Ε9 τα ποσοστά βιοαποδόμησης του κορεσμένου κλάσματος είναι πολύ μικρά. Αναλυτικότερα, μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμησης εμφανίζουν τα μεσαίου μοριακού βάρους αλκάνια (C21-C30) με μέγιστο ποσοστό κατά την 28^η ημέρα ίσο με 16,6%. Τα ελαφριά αλκάνια (C14-C20) κατά τις πρώτες τρεις εβδομάδες εμφανίζουν πολύ μικρά ποσοστά βιοαποδόμησης (<5%), ενώ κατά την τελευταία εβδομάδα των πειραματικών δοκιμών εμφανίζουν ένα ποσοστό της τάξης του 15,5%. Τέλος τα ισοπρενοειδή (επίσης κατά την τελευταία εβδομάδα μόνο) εμφανίζουν ένα μικρό ποσοστό απομάκρυνσης της τάξης του 12%. Τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια (C30-C35) δεν εμφανίζουν κανένα ποσοστό απομάκρυνση κατά τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

Στο διάγραμμα 4-11 φαίνεται η ποσότητα (σε ng κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο-άξονας x) κάθε συστατικού (άξονας y), του αρωματικού κλάσματος (PAHs), για κάθε ημέρα (0,7,14, 21 και 28)



Διάγραμμα 4-11: Μείωση ποσότητας του αρωματικού κλάσματος, του δείγματος E9, ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην απομάκρυνση των αρωματικών. Σε γενικές γραμμές (εκτός ίσως από κάποιες αμελητέες αυξομειώσεις) το αρωματικό κλάσμα παραμένει σταθερό και αμετάβλητο καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

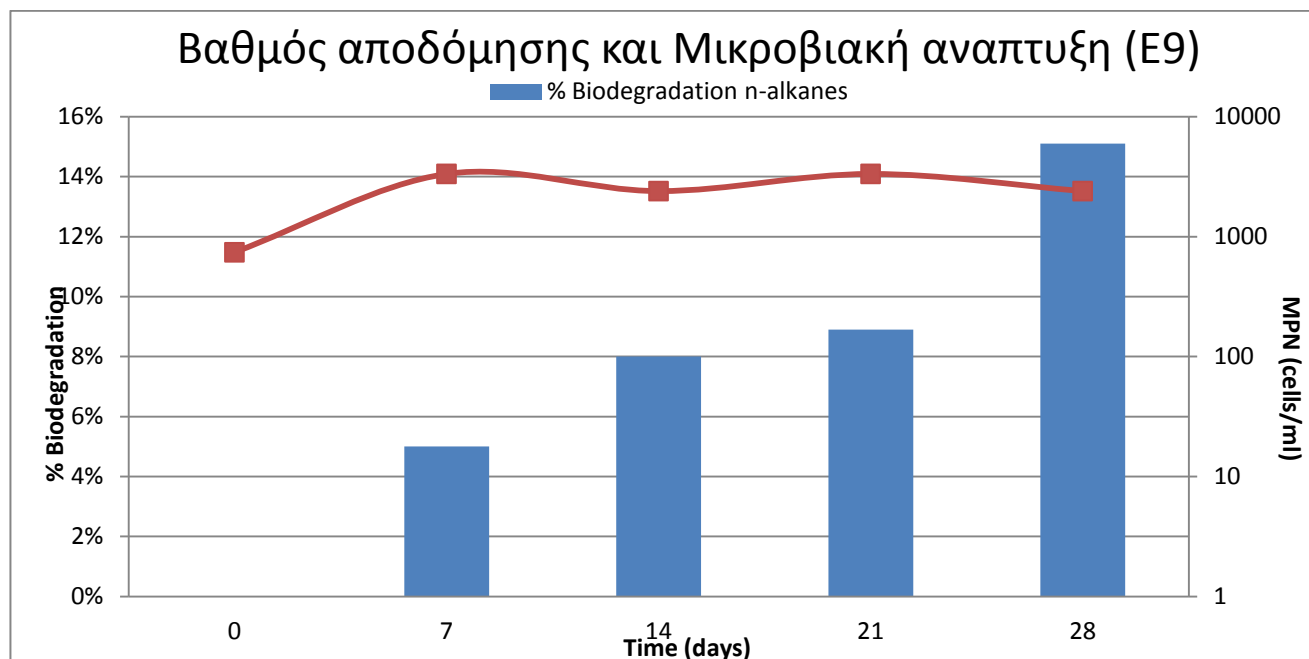
4.3.3 Συγκριτική ανάλυση βιοαποδόμησης-πληθυσμού

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα που έδωσε το πρόγραμμα της EPA για τον υπολογισμό MPN σύμφωνα με τα δεδομένα που εισάχθηκαν. Τα δεδομένα που παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση δεν χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

	1	2	3	Avarege
Day 0	740			741
Day 7	933	4273	2398	3335
Day 14	933	2398	2398	2398
Day 21	4273	2398	933	3335
Day 28	2398	2398	9177	2398

Πίνακας 4-3: Αποτελέσματα MPN του δείγματος E9.

Από την επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων σε υπολογιστικό φύλλο Excel προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 4-12: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με τη μικροβιακή ανάπτυξη του δείγματος Ε9.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x- αριστερά σε λογαριθμική κλίμακα), συγκριτικά με την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας (άξονας x- δεξιά), όπως αυτά καταγράφηκαν για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (άξονας y).

Η μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα Ε9 παραμένει σταθερή σε γενικές γραμμές με μια μικρή αυξητική τάση. Αναλυτικότερα το διάστημα της πρώτης εβδομάδας (0-7 ημέρες) ο πληθυσμός αυξάνεται περίπου κατά 4,5 φορές, ενώ για τις υπόλοιπες τρεις εβδομάδες παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις. Οι αυξομειώσεις αυτές πιθανόν οφείλονται σε περιορισμό του υποστρώματος και στην ενεργοποίηση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών.

4.4 Γενικές παρατηρήσεις- Σχόλια

Η γενική τάση για την αποδόμηση των υδρογονανθράκων με σειρά από τα πιο εύκολα αποικοδομήσιμα προς τα πιο ανθεκτικά είναι C15> C20> C25> (Pr-Ph)> C30> PAHs. Η σειρά αυτή διατηρήθηκε στα δείγματα, με εξαίρεση τα ισοπρενοειδή τα οποία μαζί με τα PAHs δεν αποδομήθηκαν καθόλου σε κανένα δείγμα.

Μια άλλη παρατήρηση που θα μπορούσε να γίνει αφορά την αυξομείωση των πληθυσμών των αποδομητών υδρογονανθράκων. Η αυξομείωση αυτή παρατηρείται (με μικρές διαφορές) και στα τρία δείγματα και σχετίζεται με την κατανάλωση των υδρογονανθράκων. Ουσιαστικά οι αποδομητές καταναλώνουν υδρογονάνθρακες έως ένα μέγιστο σημείο και στη συνέχεια λόγω έλλειψης τροφής, ο πληθυσμός τους αρχίζει να μειώνεται με αποτέλεσμα

τη σταθεροποίηση του βαθμού βιοαποδόμησης. Άλλες αιτίες που μπορεί να οδηγήσουν στη μείωση του πληθυσμού είναι η παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους από άλλα βακτήρια ή μικροοργανισμούς, η ύπαρξη άλλων ενώσεων που διασπούν το πετρέλαιο με αποτέλεσμα να μην μπορεί να καταναλωθεί από τους ίδιους τους αποικοδομητές, η ύπαρξη περιοριστικών παραγόντων, ή ακόμα και η πάροδος ενός χρονικού διαστήματος προσαρμογής στις νέες συνθήκες κ.α.

Τέλος στα διαγράμματα που παρατίθενται παραπάνω μπορεί να παρατηρηθεί και μία αυξομείωση στην ποσότητα απομάκρυνσης των συστατικών και κατ' επέκταση και του βαθμού βιοαποδόμησης. Για παράδειγμα το ποσοστό βιοαποδόμησης μπορεί να φαίνεται μεγαλύτερο κατά τη 14^η ημέρα ενώ να φαίνεται μειωμένο κατά την 21^η. Στην πραγματικότητα η αυξομείωση αυτή αμελητέα (εντός του ορίου σφάλματος της μέτρησης) και μπορεί να οφείλεται είτε στη μείωση του ρυθμού βιοαποδόμησης είτε σε κάποιο πειραματικό σφάλμα, έτσι στις περιπτώσεις που συμβαίνει αυτό ο βαθμός βιοαποδόμησης θεωρείται σταθερός. Τα σφάλματα αυτά οφείλονται κυρίως σε κακή διαχείριση ή απώλεια του δείγματος κατά τα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας (MPN, LLE, SPE, μεταφορά δείγματος κλπ)

4.5 Συγκριτικά αποτελέσματα για τα δείγματα E4, E8 και E9

Ακολουθεί συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της βιοαποδόμησης υδρογονανθράκων των δειγμάτων E4, E8 και E9.

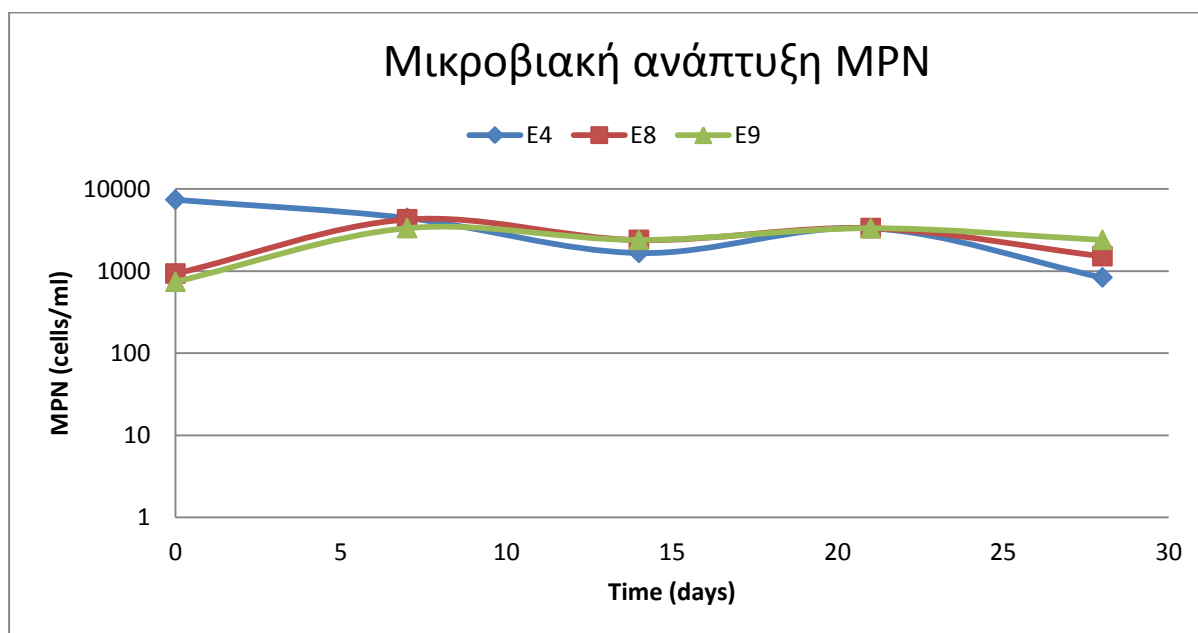
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πειραματικές δοκιμές για το E9 πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικό χρονικό διάστημα (περίπου ένα μήνα αργότερα) από τα άλλα δύο δείγματα, έτσι ενδεχομένως να υπήρχε κάποια μικρή διαφοροποίηση στις επικρατούσες συνθήκες.

4.5.1 Φυσικές παρατηρήσεις

Όπως προαναφέρθηκε τα δείγματα E4 και E8 εμφάνισαν μεγαλύτερη διαλυτότητα πετρελαίου μέσα στο νερό συγκριτικά με το δείγμα E9, το οποίο εμφάνιζε έντονο διαχωρισμό μεταξύ της φάσης ύδατος πετρελαίου μέχρι τα τελικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Αυτό αποτελεί μια πρώτη ένδειξη πως τα πρώτα δύο δείγματα είναι πιθανόν πιο αποτελεσματικά.

4.5.2 Σύγκριση πληθυσμών

Παρακάτω φαίνεται συγκριτικό διάγραμμα με τους πληθυσμούς όλων των δειγμάτων.



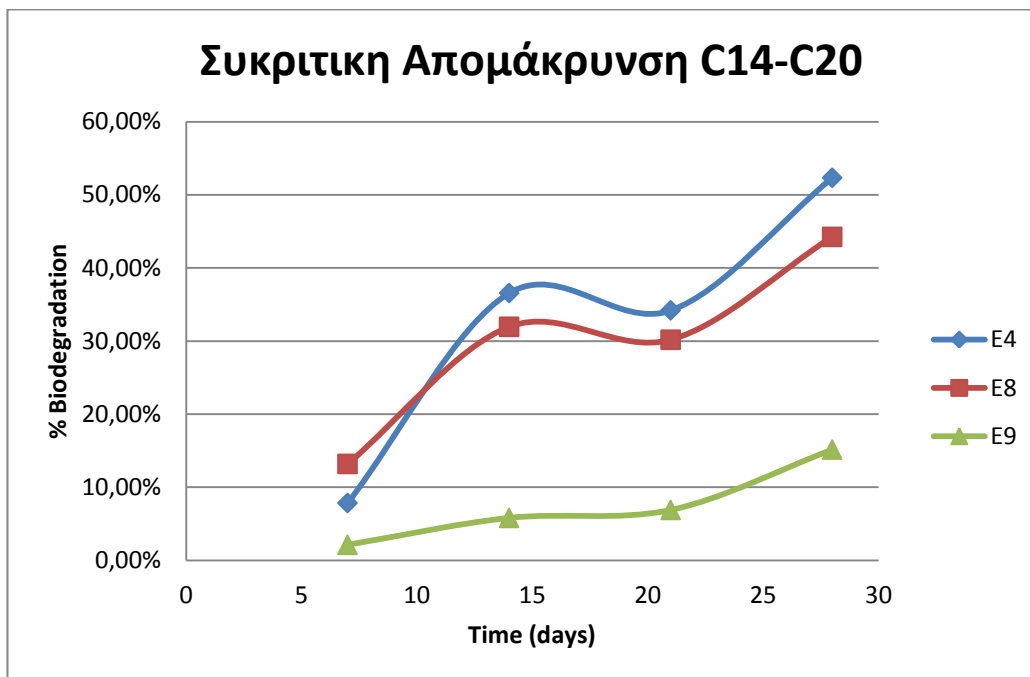
Διάγραμμα 4-13: Σύγκριση πληθυσμών όλων των δειγμάτων.

Εκτός από μια διαφοροποίηση στον αρχικό πληθυσμό του δείγματος E4, οι πληθυσμοί όλων των δειγμάτων κυμαίνονται σε γενικές γραμμές στα ίδια επίπεδα. Αναλυτικότερα ο πληθυσμός των μηδέν ημερών του δείγματος E4 είναι σχεδόν οχταπλάσιος από αυτόν του δείγματος E8 και δεκαπλάσιος από τον αντίστοιχο του δείγματος E9. Στο διάστημα της πρώτης εβδομάδας όμως όλοι οι πληθυσμοί σχεδόν ισοσταθμίζονται, ακολουθώντας παρόμοια πορεία αυξομειώσεων για το διάστημα των επόμενων τριών εβδομάδων. Η ισοστάθμιση αυτή των πληθυσμών που παρατηρείται κατά την 7^η ημέρα πιθανότατα σχετίζεται με τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος. Με άλλα λόγια ο πληθυσμός E4 (ο οποίος είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τους άλλους δύο) λόγω περιορισμού του υποστρώματος, σχεδόν υποδιπλασιάζεται σε διάστημα μιας εβδομάδας, ενώ αντίθετα οι άλλοι δύο πληθυσμοί λόγω αφθονίας τροφής διπλασιάζονται μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Σε αντίστοιχη αιτία οφείλονται και οι αυξομειώσεις που παρατηρούνται κατά τις επόμενες τρεις εβδομάδες.

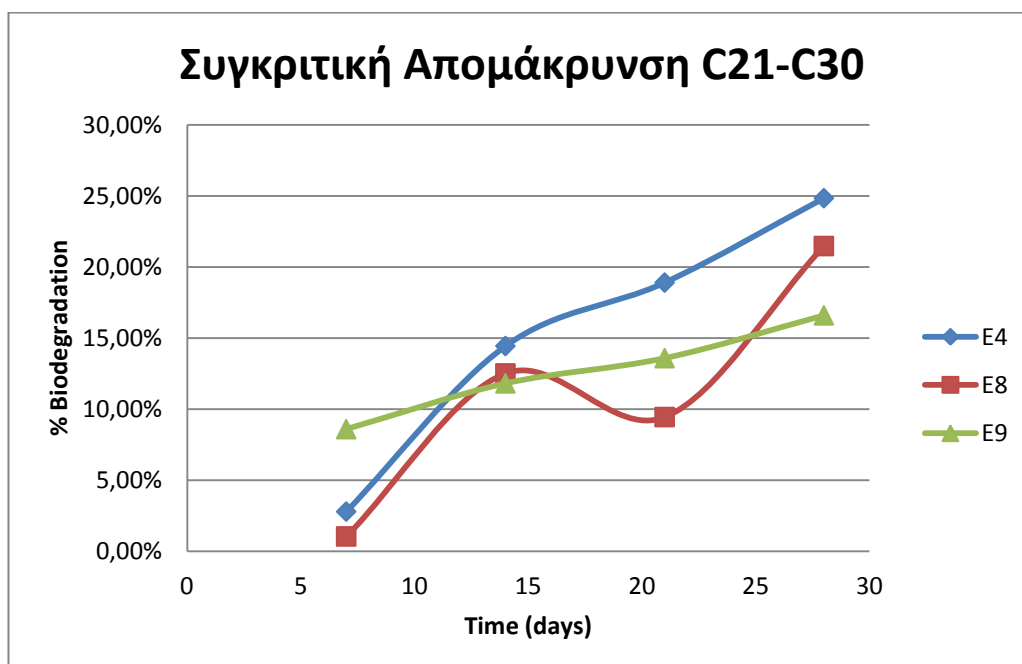
4.5.3 GC/MS Ανάλυση

Στα επόμενα τρία διαγράμματα γίνεται συγκριτική παρουσίαση του βαθμού βιοαποδόμησης των τριών δειγμάτων για τα μικρού, μέσου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια ξεχωριστά.



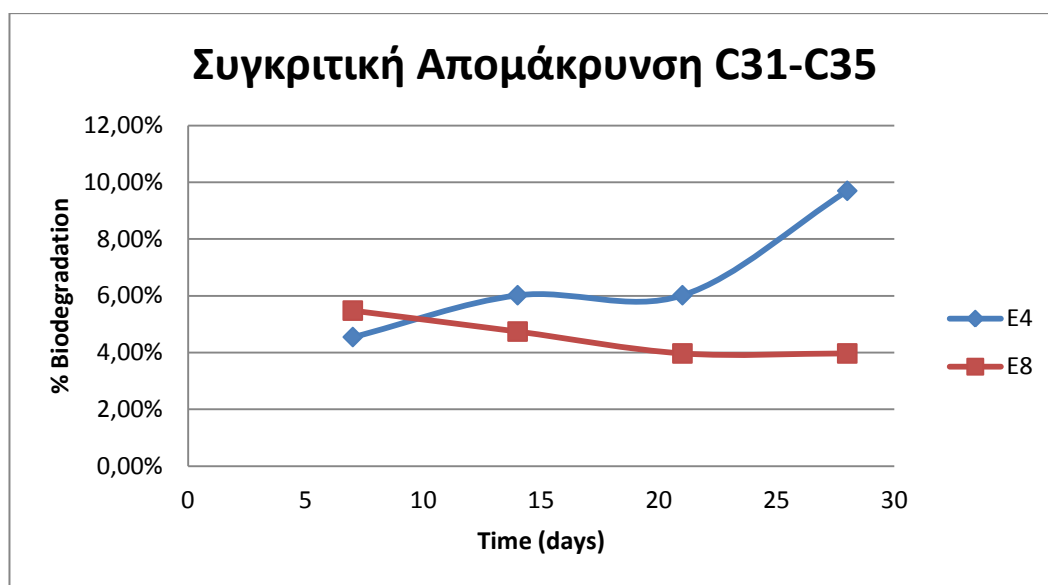
Διάγραμμα 4-14: Σύγκριση απομάκρυνση των μικρού μοριακού βάρους συστατικών του κορεσμένου κλάσματος όλων των δειγμάτων

Από το διάγραμμα φαίνεται πως για το ελαφρύ κλάσμα πιο αποδοτικό είναι το δείγμα E4, το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης σχεδόν κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής διαδικασίας. Αμέσως μετά, με σχετικά μικρή διαφορά, ακολουθεί το E8. Τέλος το δείγμα E9 παρουσιάζει πολύ μικρότερα ποσοστά αποδόμησης, σχεδόν τρεις φορές μικρότερα από αυτά των άλλων δύο δειγμάτων.



Διάγραμμα 4-15: Σύγκριση απομάκρυνση των μεσαίου μοριακού βάρους συστατικών του κορεσμένου κλάσματος όλων των δειγμάτων.

Τα ποσοστά βιοαποδόμησης για τα μεσαίου μοριακού βάρους αλκάνια είναι αρκετά κοντά και για τα τρία δείγματα. Πιο αποδοτικό βέβαια εμφανίζεται το δείγμα E4 με τα άλλα δύο να το ακολουθούν. Το E9 εμφανίζει και πάλι το μικρότερο ποσοστό, αν και τα ποσοστά αυτά είναι μεγαλύτερα από αυτά που σημειώθηκαν για την αποδόμηση των μικρού μοριακού βάρους συστατικών. Βέβαια και στις δύο περιπτώσεις τα ποσοστά αποδόμησης για το E9 είναι πολύ μικρά (<17%).



Διάγραμμα 4-16: Σύγκριση απομάκρυνση των μεγάλου μοριακού βάρους συστατικών του κορεσμένου κλάσματος όλων των δειγμάτων.

Στο τελευταίο διάγραμμα φαίνονται τα ποσοστά βιοαποδόμησης για τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια C31-C35. Στο διάγραμμα δεν συμπεριλαμβάνονται τιμές για το δείγμα E9 καθώς είχε μηδενικό ποσοστό αποδόμησης καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών. Συγκρίνοντας τα δείγματα E4 και E8, πιο αποδοτικό προκύπτει και σε αυτή την περίπτωση το E4 με συνολικό ποσοστό σχεδόν διπλάσιο από αυτό του E8. Παρά το γεγονός ότι το E4 έχει επιτύχει διπλάσιο ποσοστό αποδόμησης από το E8, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το συνολικό ποσοστό βιοαποδόμησης εξακολουθεί να είναι αρκετά μικρό (<10%).

Για τα αρωματικά (PAHs) και ισοπρενοειδή (Pr-Ph) δεν παρατίθενται συγκριτικά διαγράμματα καθώς τα ποσοστά βιοαποδόμησης τους ήταν ασήμαντα και για τα τρία δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα τριών μικροβιακών κονσόρσιων στη βιοαποδόμηση πετρελαιοειδών σε θαλάσσιο περιβάλλον. Από τις πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Πιο αποδοτική ήταν η εφαρμογή του δείγματος E4, με το μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης να σημειώνονται στα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια. Παρά το γεγονός όμως ότι η ικανότητα του στη βιοαποδόμηση των ελαφρών υδρογονανθράκων (C14-C20) έφτασε το πενήντα τρία τοις εκατό (53%) σε διάστημα ενός μήνα, η αποδοτικότητα του για τα υπόλοιπα συστατικά του πετρελαίου (στο ίδιο χρονικό διάστημα) ήταν αισθητά μικρότερη (ποσοστά <25%), με τα πιο επικίνδυνα και τοξικά αρωματικά συστατικά (PAHs) να εμφανίζουν αμελητέα έως μηδενικά ποσοστά βιοαποδόμησης. Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμηση επιτεύχθηκε εντός των πρώτων δύο εβδομάδων των πειραματικών δοκιμών, ενώ για το επόμενο διάστημα οι ρυθμοί βιοαποδόμησης ήταν εμφανώς μειωμένοι για όλα τα συστατικά.

Το δείγμα E8 ήταν λιγότερο αποδοτικό στην αποδόμηση των υδρογονανθράκων, αν και οι διαφορές του με το E4 δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντικές (μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης των ελαφριών συστατικών ήταν 44% ενώ για τα υπόλοιπα <22% σε διάστημα ενός μήνα). Το αρωματικό κλάσμα επίσης σε σημείωσε αξιόλογα ποσοστά αποδόμησης. Το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμησης επιτεύχθηκε επίσης κατά τις πρώτες δύο εβδομάδες, ενώ στη συνέχεια οι ρυθμοί βιοαποδόμησης ήταν αισθητά μειωμένοι.

Τέλος το E9 δεν παρουσίασε σημαντικά αποτελέσματα σε κανένα στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, τόσο για το κορεσμένο όσο και για το αρωματικό κλάσμα (συνολικό ποσοστό απομάκρυνσης <20% σε διάστημα ενός μήνα). Το δείγμα αυτό εμφανίζεται ιδιαίτερος **αργό** και **αδύναμο**. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκε διπλάσια ποσότητα αρχικού πληθυσμού (inoculum) σε σχέση με αυτή των άλλων δυο δειγμάτων, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια σημαντική διαφορά στον πληθυσμό. Επίσης οι μικροοργανισμοί- βιοαποδομητές φαίνεται ότι αργούν να ενεργοποιηθούν, καθώς τα συστατικά αρχίζουν να εμφανίζουν σημάδια βιοαποδόμησης κατά την τελευταία εβδομάδα των πειραματικών δοκιμών.

Σε κανένα από τα τρία δείγματα δε σημειώθηκε σημαντικό ποσοστό απομάκρυνσης των ισοπρενοειδών, θα πρέπει όμως να σημειωθεί το δείγμα E9 σημείωσε (αν και μικρό) μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης ισοπρενοειδών συγκριτικά με τα άλλα δύο. Συγκεκριμένα το E9 κατά την 28^η ημέρα σημείωσε ποσοστό της τάξης του έντεκα τοις εκατό (11%) ενώ τα υπόλοιπα δείγματα για τα αντίστοιχα συστατικά σημείωσαν μηδενικό ποσοστό απομάκρυνσης.

Τέλος το αρωματικό κλάσμα παρέμεινε σταθερό και αμετάβλητο σε όλα τα δείγματα. Τα μικρά ποσοστά που ίσως σημειώθηκαν είναι εντός του πειραματικού σφάλματος και μπορούν να θεωρηθούν αμελητέα.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, επιβεβαιώνουν την άποψη, που έχει καταδειχθεί από παρόμοιες μελέτες, ότι η εξυγίανση θαλάσσιου περιβάλλοντος μέσω βιο-ενίσχυσης (bio-augmentation) δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική από μόνη της.

Οι αυξομειώσεις των πληθυσμών υποδηλώνουν την ύπαρξη περιοριστικών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα η αδυναμία στην αποδόμηση των βαριών αλκανίων καθώς επίσης και του αρωματικού κλάσματος, υποδηλώνουν ότι οι καταναλωτές των αντίστοιχων συστατικών δεν κατάφεραν ή δεν πρόλαβαν να ενεργοποιηθούν στο διάστημα των τεσσάρων εβδομάδων των πειραματικών δοκιμών.

Τα παραπάνω προβλήματα έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επιλυθούν με χρήση θρεπτικών, για την ενίσχυση της μικροβιακής κοινότητας. Έτσι η αποτελεσματικότητα των τριών αυτών μικροβιακών κονσόρσιων θα μπορούσε να εξεταστεί εκ νέου και με χρήση της μεθόδου της βιοδιέγερσης (biostimulation).

1. ITOPF- International Tanker Owners Pollution Federation, 2013. [online] Διαθέσιμο σε: <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/> [Βρέθηκε 25/09/2014].
2. ΕΜΠ. Σχολή Χημικών Μηχανικών Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. [pdf] Διαθέσιμο σε: < www.chemeng.ntua.gr/courses/pngtech/.../webdoc_9_15_6_2007.pdf > [Βρέθηκε 03/09/2014].
3. Atlas, M.R. and Hazzen, T.C., 2011. Oil Bioremediation And Biodegradation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. Environ Sci. Technol., 45, p 6709-6715.
4. Κορρός, Κ.Β., 2010, Μοντέλο Τύχης /Γήρανσης Κηλίδων Πετρελαίου Τεύχος Α. ΕΜΠ, Σχολή Ναυπηγών Μηχανολόγων Μηχανικών. [pdf] Διαθέσιμο σε: < <http://www.dspace.lib.ntua.gr/handle/123456789/3354> > [Βρέθηκε 14/07/2014].
5. NOAA – Office of Response and Restoration. How do spills happen. [online] (2003) Διαθέσιμο σε: < <http://response.restoration.noaa.gov/training-and-education/education-students-and-teachers/how-do-spills-happen.html> > [Βρέθηκε 25/09/2014].
6. Κομματά, Π., 2008. Ανάπτυξη ενός συστήματος υποστήριξης αποφάσεων για την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων : Η εφαρμογή του μοντέλου seatrack webστην Ελλάδα.. [pdf] ΠΑ.ΠΕΙ.- Τμήμα Βιομηχανικής Διοίκησης και Τεχνολογίας. Διαθέσιμο σε: < <http://digilib.lib.unipi.gr/dspace/handle/unipi/2808> > [Βρέθηκε 28/08/2014]
7. Νικολοπούλου Μ., (2005) Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοειδών. [pdf] Π.Κ Τμήμα ΜΗ.ΠΕΡ. Διαθέσιμο σε: < <http://poseidon.library.tuc.gr/artemis/MT2005-0132/MT2005-0132.pdf> > [Βρέθηκε 02/09/2014].
8. Dave,D. and Ghaly, A. E., 2011. Remediation Tecnoligies for Marine Oil Spills: A Critical Review and Comparative Analysis. Am. J. Environ. Sci., 7: 423-440. Διαθέσιμο σε: < <http://thescpub.com/abstract/10.3844/ajessp.2011.423.440> > [Βρέθηκε 27/09/2014].
9. Καλογεράκης Ν., 2013.Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος (Τεχνική Βιο-Εξυγίανσης περιβάλλοντος) Bioremediation, Σημειώσεις Μέρος Ι. Χανιά, Π.Κ ΜΗ.ΠΕΡ.
10. Nikolopoulou M. and Kalogerakis N., 2011. Petroleum Spill Control with Biological Means, Elsevier B. V. p 263-272 [Βρέθηκε 04/04/2014].
11. Τσισκάκη Ε.,2011. Βιοαποδόμηση Πετρελαϊκών Υδρογονανθράκων σε Θαλάσσιο Περιβάλλον. Π.Κ., ΜΗ.ΧΟΠ. [pdf] διαθέσιμο σε: <<http://dias.library.tuc.gr/view/12740>> [Βρέθηκε 20/06/2014]
12. IPIECA, A guide to contingency planning for oil spills on water. Report Series, vol. 2, 2nd edition. [Βρέθηκε 25/09/2014].
13. Leahy J. and Colwell R.,1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiological Reviews, p. 305-315 Διαθέσιμο σε: <<http://mmbr.asm.org/content/54/3/305.short>> [Βρέθηκε 24/09/2014].
14. Νταγκουνάκη Β.,2009. Συγκριτική αξιολόγηση ωριμότητας μητρικών σχηματισμών υδρογονανθράκων του ελληνικού χώρου. [pdf] Π.Κ., ΜΗ.ΧΟΠ. Διαθέσιμο σε:

- <<http://poseidon.library.tuc.gr/artemis/MT2009-0120/MT2009-0120.pdf>> [Βρέθηκε 19/09/2014].
15. Nikolopoulou M., Eichenbusch P., Pasadakis N., Venieri D. and Kalogerakis N., 2013. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills. [pdf] Elsevier, New Biotechnology, vol.30, No.6. Διαθέσιμο σε: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413000745>> [Βρέθηκε 14/03/2014].
 16. ΕΜΠ. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/trbio/files/KEF3%20Microbiology.pdf>> [Βρέθηκε: 31/07/2014].
 17. ΑΠΘ. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. [pdf] Διαθέσιμο σε: <http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf> [Βρέθηκε 01/07/2014].
 18. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας. [pdf] Διαθέσιμο σε: <http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/DIAXORISMOI_10.pdf> [Βρέθηκε 20/08/2014].
 19. Scientific Testimony an online journal: An online Journal. GC/MS Analysis. [online] Διαθέσιμο σε: <www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> [Βρέθηκε 11/07/2014]
 20. EPA, 2013. Swirling Flask Dispersant Effectiveness Test, Revised, Standard Dispersant Toxicity Test, And Bioremediation Agent Effectiveness Test. Pt 300, App. C, 40 CFR Ch. I.
 21. Nikolopoulou M., Pasadakis N. and Kalogerakis N., 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. Elsevier Marine pollution bulletin, 72, 165-173. Διαθέσιμο σε: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13001896>> [Βρέθηκε 14/03/2014].
 22. ITOF, 2014. Technical Information Paper (TIPS) No.02. Fate of Marine Oil Spills. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.itopf.com/knowledge-resources/documents-guides/document/tip-2-fate-of-marine-oil-spills/>> [Βρέθηκε 27/09/2014].

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.
ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Συστατικό	Ιόν
n-alkanes (C ₁₀ -C ₃₃)	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

Εικόνα Α-1: Προτεύοντα ιόντα για τον κάθε αναλυτή στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS.

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 _a (H),21 β (H)- hopane	n-C35 C ₃₀ 17 _a (H),21 β (H)- hopane	Perylene ideno(g,h,i)pyrene	Perylene ideno(g,h,i)pyrene

Εικόνα Α-2: Αναλυτές και συστατικά αναφοράς

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.
ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ
ΔΟΚΙΜΩΝ

Liquid-Liquid extraction						
Sample	Date	Sur.std	DCM	Wvial	Wvial +S	Ws
		μl	ml	gr	gr	gr
E4		50	50			
E4_0#1	23 Απρ 2014	50	50	4,6207	4,8322	0,2115
E4_7#1	24 Απρ 2014	50	100	4,6801	4,8806	0,2005
E4_7#2	24 Απρ 2014	50	100	4,6026	4,8048	0,2022
E4_7#3	25 Μαΐ 2014	50	180	4,6424	4,8404	0,198
E4_14#1	30 Απρ 2014	50	100	4,6384	4,8293	0,1909
E4_14#2	30 Απρ 2014	50	100	4,6390	4,8370	0,198
E4_14#3	02 Μαΐ 2014	50	100	4,6325	4,8215	0,189
E4_21#1	07 Μαΐ 2014	50	100	4,6381	4,8206	0,1825
E4_21#2	07 Μαΐ 2014	50	50	4,6090	4,7989	0,1899
E4_21#3	08 Μαΐ 2014	50	50	4,6088	4,7836	0,1748
E4_28#1	14 Μαΐ 2014	50	100	4,6492	4,8281	0,1789
E4_28#2	15 Μαΐ 2014	50	50	4,7016	4,8716	0,17
E4_28#3	15 Μαΐ 2014	50	100	4,6946	4,8822	0,1876
E8						
E8_0#1	23 Απρ 2014	50	50	4,5715	4,7823	0,2108
E8_7#1	24 Απρ 2014	50	100	4,6372	4,8379	0,2007
E8_7#2	25 Απρ 2014	50	180	4,6428	4,8361	0,1933
E8_7#3	28 Απρ 2014	50	100	4,6337	4,833	0,1993
E8_14#1	30 Απρ 2014	50	100	4,6146	4,8049	0,1903
E8_14#2	30 Απρ 2014	50	100	4,6469	4,8285	0,1816
E8_14#3	02 Μαΐ 2014	50	100	4,5699	4,7606	0,1907
E8_21#1	08 Μαΐ 2014	50	100	4,603	4,7921	0,1891
E8_21#2	07 Μαΐ 2014	50	100	4,6427	4,7849	0,1422
E8_21#3	08 Μαΐ 2014	50	100	4,6273	4,8016	0,1743
E8_28#1	15 Μαΐ 2014	50	100	4,6419	4,8222	0,1803
E8_28#2	15 Μαΐ 2014	50	100	4,6792	4,8479	0,1687
E8_28#3	16 Μαΐ 2014	50	150	4,6306	4,8095	0,1789
E9						
E9_0#1	11/7/2014	50	50	4,6717	4,8753	0,2036
E9_7#1	17/7/2014	50	200	4,6504	4,8566	0,2062
E9_7#2	15/7/2014	50	200	4,6940	4,8931	0,1991
E9_7#3	17/7/2014	50	100	4,6713	4,8840	0,2127
E9_14#1	18/7/2014	50	100	4,6586	4,8754	0,2168
E9_14#2	18/7/2014	50	100	4,6468	4,7519	0,1051
E9_14#3	21/7/2014	50	50	4,6529	4,8174	0,1645
E9_21#1	25/7/2014	50	160	4,6886	4,8867	0,1981
E9_21#2	29/7/2014	50	50	4,6673	4,8775	0,2102
E9_21#3	28/7/2014	50	50	4,7018	4,8995	0,1977
E9_28#1	31/7/2014	50	50	4,6658	4,8672	0,2014
E9_28#2	31/7/2014	50	50	4,6576	4,8978	0,2402
E9_28#3	31/7/2014	50	100	4,6576	4,8490	0,1914

Πίνακας B-1: Αποτελέσματα υγρής-υγρής εκχύλισης

Sample	W oil	Wvial F1	Wvial F1+S	Wvial F2	Wvial F2+S	Walka nes	W aromatics	W alkanes	W aromatics
	mg	gr	gr	gr	gr	gr	gr	%	%
E4									
E4_0#1	7,3	2,3942	2,3987	2,3632	2,3655	0,0045	0,0023	61,64%	31,51%
E4_7#1	8,5	2,3971	2,4025	2,3821	2,3833	0,0054	0,0012	63,53%	14,12%
E4_7#2	8	2,3984	2,4034	2,3777	2,3787	0,005	0,001	62,50%	12,50%
E4_7#3	8,6	2,3913	2,3967	2,3605	2,3616	0,0054	0,0011	62,79%	12,79%
E4_14#1	8,4	2,3654	2,3706	2,3697	2,3705	0,0052	0,0008	61,90%	9,52%
E4_14#2	8,2	2,3819	2,3872	2,3827	2,384	0,0053	0,0013	64,63%	15,85%
E4_14#3	7,2	2,3878	2,3925	2,3636	2,365	0,0047	0,0014	65,28%	19,44%
E4_21#1	9,7	2,3697	2,3753	2,3762	2,3779	0,0056	0,0017	57,73%	17,53%
E4_21#2	8,7	2,3884	2,3945	2,3662	2,3674	0,0061	0,0012	70,11%	13,79%
E4_21#3	6,1	2,3565	2,3603	2,3659	2,3666	0,0038	0,0007	62,30%	11,48%
E4_28#1	7,5	2,3653	2,3703	2,3754	2,3768	0,005	0,0014	66,67%	18,67%
E4_28#2	9,5	2,377	2,3833	2,3878	2,389	0,0063	0,0012	66,32%	12,63%
E4_28#3	7,8	2,3776	2,3819	2,4029	2,4043	0,0043	0,0014	55,13%	17,95%
E8									
E8_0#1	8,3	2,3801	2,3856	2,3763	2,3774	0,0055	0,0011	66,27%	13,25%
E8_7#1	6,5	2,3745	2,3786	2,382	2,3828	0,0041	0,0008	63,08%	12,31%
E8_7#2	9,4	2,4063	2,4122	2,3763	2,3777	0,0059	0,0014	62,77%	14,89%
E8_7#3	8,2	2,365	2,3698	2,376	2,3773	0,0048	0,0013	58,54%	15,85%
E8_14#1	8,8	2,3767	2,3821	2,3805	2,3821	0,0054	0,0016	61,36%	18,18%
E8_14#2	6,4	2,3616	2,3656	2,3778	2,3787	0,004	0,0009	62,50%	14,06%
E8_14#3	7,3	2,373	2,3775	2,39	2,391	0,0045	0,001	61,64%	13,70%
E8_21#1	7,3	2,3533	2,3578	2,3969	2,3978	0,0045	0,0009	61,64%	12,33%
E8_21#2	8,8	2,3791	2,385	2,3758	2,3772	0,0059	0,0014	67,05%	15,91%
E8_21#3	9,1	2,3776	2,3835	2,3552	2,3569	0,0059	0,0017	64,84%	18,68%
E8_28#1	5,9	2,3896	2,3933	2,3618	2,3627	0,0037	0,0009	62,71%	15,25%
E8_28#2	6,9	2,3812	2,386	2,3655	2,3665	0,0048	0,001	69,57%	14,49%
E8_28#3	7	2,3699	2,3741	2,3713	2,3723	0,0042	0,001	60,00%	14,29%
E9									
E9_0#1	10	1,986	1,994	1,9806	1,9822	0,008	0,0016	80,00%	16,00%
E9_7#1	8,9	2,0017	2,0078	1,9969	1,9975	0,0061	0,0006	68,54%	6,74%
E9_7#2	9,8	2,0148	2,0215	1,9981	1,9998	0,0067	0,0017	68,37%	17,35%
E9_7#3	8,9	2,0317	2,0381	1,9864	1,9881	0,0064	0,0017	71,91%	19,10%
E9_14#1	5,9	1,9945	1,9983	1,9977	1,999	0,0038	0,0013	64,41%	22,03%
E9_14#2	9,4	2,3803	2,3866	2,3931	2,3938	0,0063	0,0007	67,02%	7,45%
E9_14#3	8	2,4113	2,4164	2,4114	2,4122	0,0051	0,0008	63,75%	10,00%
E9_21#1	8,8	2,4023	2,4075	2,3935	2,3945	0,0052	0,001	59,09%	11,36%
E9_21#2	8,1	2,4035	2,4084	2,3829	2,3838	0,0049	0,0009	60,49%	11,11%
E9_21#3	8,5	2,392	2,3974	2,3968	2,3975	0,0054	0,0007	63,53%	8,24%
E9_28#1	10	2,4104	2,4171	2,3817	2,3832	0,0067	0,0015	67,00%	15,00%
E9_28#2	9,2	2,377	2,3834	2,3986	2,3998	0,0064	0,0012	69,57%	13,04%
E9_28#3	6,6	2,392	2,3964	2,022	2,0228	0,0044	0,0008	66,67%	12,12%

Πίνακας B-2: Αποτελέσματα εκχύλισης στερεής φάσης.

ng/mg crude oil normalized	E4_0	E4_D7	E4_D14	E4_D21	E4_D28
C12	0,188	1,439	0,071	0,123	0,106
C13	2,691	8,944	0,909	2,100	1,267
C14	14,228	19,018	7,929	10,800	7,332
C15	25,470	23,353	14,775	16,395	10,376
C16	27,362	23,662	15,369	16,698	10,087
C17	29,973	27,120	17,805	19,410	12,760
Pr	11,114	11,633	11,893	11,166	13,203
C18	26,940	24,014	18,171	17,506	13,048
Ph	11,745	12,259	11,087	11,307	11,748
C19	24,812	22,521	18,163	17,161	14,043
C20	23,819	22,494	19,420	17,833	16,237
C21	22,221	20,859	17,996	16,366	14,788
C22	20,477	19,326	16,920	15,495	14,237
C23	18,859	17,781	15,472	14,128	12,857
C24	18,866	18,381	16,030	14,764	13,687
C25	17,490	16,873	14,697	13,757	12,718
C26	15,275	15,081	13,137	12,458	11,366
C27	13,383	13,509	11,853	11,442	10,635
C28	11,248	11,502	10,296	9,963	9,603
C29	9,678	9,966	9,007	8,859	8,815
C30	14,221	13,046	12,190	13,193	12,179
C31	11,423	10,413	9,637	10,197	9,875
C32	7,154	6,612	5,952	6,477	6,295
C33	5,336	5,017	4,354	4,921	4,620
C34	3,758	3,280	2,798	3,462	3,180
C35	2,483	2,315	1,561	2,153	2,176

Πίνακας Β-3: Αποτελέσματα GC/MS των αλκανίων, του δείγματος Ε4, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο. Οι στήλες αναφέρονται στους μέσους όρους των τριών επαναλήψεων

ng/mg crude oil normalized	E8_0	E8_D7	E8_D14	E8_D21	E8_D28
C12	0,367	0,118	0,089	0,112	0,165
C13	4,204	1,860	1,461	1,961	2,533
C14	16,745	11,674	9,833	11,145	11,140
C15	26,531	21,125	16,264	17,541	14,217
C16	28,112	23,356	17,566	17,876	12,780
C17	33,270	26,729	20,638	20,851	14,395
Pr	12,219	11,951	11,279	12,060	11,862
C18	26,816	24,184	18,860	18,991	14,267
Ph	11,592	12,358	11,923	12,349	11,319
C19	24,429	22,867	18,626	18,748	14,725
C20	23,449	22,847	19,662	19,942	16,598
C21	21,740	21,246	18,075	18,449	15,225
C22	20,066	19,852	17,020	17,330	14,612
C23	18,429	18,140	15,442	15,767	13,192
C24	18,821	18,507	16,434	16,485	14,310
C25	17,526	17,158	15,265	15,312	13,494
C26	15,362	15,388	13,754	13,852	12,270
C27	13,607	13,678	12,424	12,791	11,294
C28	11,388	11,597	10,825	11,186	9,881
C29	9,699	10,033	9,478	9,912	8,711
C30	13,301	13,541	13,256	13,260	13,304
C31	10,668	10,487	10,377	10,508	9,994
C32	6,577	6,563	6,642	6,619	6,074
C33	4,740	4,950	5,057	5,014	4,340
C34	3,439	3,386	3,497	3,462	2,661
C35	2,327	1,982	2,289	1,612	1,758

Πίνακας Β-4: Αποτελέσματα GC/MS των αλκανίων, του δείγματος Ε8, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο. Οι στήλες αναφέρονται στους μέσους όρους των τριών επαναλήψεων

ng/mg crude oil normalized	E9_0	E9_D7	E9_D14	E9_D21	E9_D28
C12	0,755	0,830	1,248	0,398	0,115
C13	6,943	8,005	6,551	5,004	2,654
C14	18,078	19,607	17,706	16,251	12,074
C15	24,276	25,887	25,173	25,652	21,375
C16	23,552	25,683	24,566	24,542	22,414
C17	25,408	27,189	25,835	25,099	23,714
Pr	9,401	8,143	9,454	9,484	7,057
C18	22,287	24,140	23,700	23,414	22,597
Ph	9,571	9,849	9,949	10,424	9,721
C19	20,458	21,970	21,559	21,507	20,975
C20	20,084	20,651	20,373	20,612	19,991
C21	19,002	20,279	19,937	19,972	19,086
C22	17,605	18,548	18,402	18,003	17,725
C23	15,895	16,868	16,640	16,451	16,174
C24	15,140	15,964	14,922	14,443	13,628
C25	13,161	13,620	13,076	12,383	11,721
C26	12,264	12,659	12,136	11,626	10,910
C27	10,638	11,154	10,538	10,022	9,382
C28	9,027	9,398	8,671	8,537	8,284
C29	7,840	7,721	7,081	7,088	7,137
C30	14,761	13,018	12,926	13,103	12,994
C31	10,137	10,576	10,149	10,818	10,265
C32	6,766	7,516	7,103	7,047	6,766
C33	5,066	5,616	5,461	5,438	5,183
C34	3,553	3,972	3,923	3,793	3,660
C35	2,142	2,702	2,386	2,593	2,580

Πίνακας Β-5: Αποτελέσματα GC/MS των αλκανίων, του δείγματος Ε9, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο. Οι στήλες αναφέρονται στους μέσους όρους των τριών επαναλήψεων

ng/mg crude oil normalized	E4_0	E4_D7	E4_D14	E4_D21	E4_D28
Fluorene	0,15	0,16	0,13	0,14	0,15
Dibenzothiophene	0,44	0,45	0,42	0,44	0,46
Phenanthrene	0,53	0,54	0,50	0,49	0,51
Chrysene	0,05	0,06	0,05	0,04	0,05
pyrene	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05
benzo(e)pyrene	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

Πίνακας Β-6: Αποτελέσματα GC/MS των αρωματικών, του δείγματος Ε4, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο.

ng/mg crude oil normalized	E8_0	E8_D7	E8_D14	E8_D21	E8_D28
Fluorene	0,17	0,15	0,11	0,16	0,21
Dibenzothiophene	0,43	0,45	0,42	0,46	0,46
Phenanthrene	0,51	0,53	0,48	0,55	0,62
Chrysene	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05
pyrene	0,01	0,03	0,06	0,06	0,09
benzo(e)pyrene	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03

Πίνακας Β-7: Αποτελέσματα GC/MS των αρωματικών, του δείγματος Ε8, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο.

ng/mg crude oil normalized	E9_0	E9_D7	E9_D14	E9_D21	E9_D28
Fluorene	0,19	0,18	0,16	0,14	0,11
Dibenzothiophene	0,43	0,46	0,48	0,41	0,37
Phenanthrene	0,50	0,60	0,56	0,64	0,62
Chrysene	0,06	0,05	0,05	0,06	0,07
pyrene	0,04	0,02	0,04	0,03	0,02
benzo(e)pyrene	0,05	0,03	0,03	0,02	0,04

Πίνακας Β-8: Αποτελέσματα GC/MS των αρωματικών, του δείγματος Ε9, κανονικοποιημένα ως προς το χοπάνιο.