



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΣΗ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΑΠΟΔΟΜΗΤΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ  
ΜΕ ΥΛΙΚΑ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ»**

**ΔΡΥΓΙΑΝΝΑΚΗ ΗΛΕΚΤΡΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

**ΠΑΣΑΔΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΧΑΝΙΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2015**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διαρροές πετρελαίου εξακολουθούν να αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για το θαλάσσιο περιβάλλον, παρά τους αυστηρότερους περιβαλλοντικούς κανονισμούς, που έχουν υιοθετηθεί από τις περισσότερες χώρες. Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η βιοδιέγερση των ενδογενών αποδομητών με την προσθήκη ενός ή περισσοτέρων θρεπτικών συστατικών (π.χ. N, P), προκειμένου να ενισχυθεί ο ρυθμός βιοαποδόμησης. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού μέσων αποδόμησης χαμηλού κόστους.

Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν δύο πειραματικοί σχεδιασμοί. Στόχο του πρώτου πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί η μελέτη της βιοδιέγερσης με τη χρήση θρεπτικών χαμηλού κόστους, την εμπορική λεκιθίνη Bolec Zt και το χαμηλού κόστους εμπορικό λίπασμα, Basfoliar 36 Extra, και τη χαμηλού κόστους επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης, το εμπορικό λίπασμα Oil Begone Bio. Η λεκιθίνη χρησιμοποιείται ως πηγή του φωσφόρου και του ουρικού οξέος ή εμπόρευμα λίπασμα χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή αζώτου. Η αποδόμηση του πετρελαίου συγκρίνεται, επίσης, μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών θρεπτικών ουσιών με την παρουσία ή όχι της βιο-επιφανειοδραστικής ένωσης. Προκύπτει ότι η χρήση του χαμηλού κόστους βιο-επιφανειοδραστικού ενισχύει κατά 1.5 φορές την αποδόμηση των αλκανίων και τη μικροβιακή ανάπτυξη μετά από 28 ημέρες επώασης σε σύγκριση με τις άλλες δοκιμές. Συγκρίνοντας τις δοκιμές με τη διαφορετική πηγή αζώτου, το χαμηλό κόστος λίπασμα Basfoliar 36 Extra και το ουρικό οξύ, η αποδόμηση των υδρογονανθράκων προκύπτει ίδια.

Στο δεύτερο πειραματικό σχεδιασμό, μελετάται η βιοδιέγερση μεταξύ της χρήσης διαφορετικών πηγών φωσφόρου, τη χαμηλού κόστους λεκιθίνη Bolec Zt και L-a-λεκιθίνη. Η L-a-λεκιθίνη ευνόησε το ποσοστό αποδόμησης των αλκανίων κατά τη διάρκεια των πρώτων 28 ημερών παρακολούθησης περισσότερο από τη λεκιθίνη Bolec Zt. Επίσης, υπολογίζονται οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης για τις ενώσεις C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub> and C<sub>30</sub> της δοκιμής με τη χρήση της L-a-λεκιθίνης 2, 2 και 1.6 φορές υψηλότεροι, αντίστοιχα, από αυτούς της δοκιμής με τη λεκιθίνη Bolec Zt χαμηλού κόστους. Ωστόσο, η χρήση της λεκιθίνης Bolec Zt οδηγεί σε ποσοστό αποδόμησης των αλκανίων 59% σε 56 ημέρες, ενώ η L-a-λεκιθίνη σε 56%. Η καθυστέρηση της αποδόμησης της δοκιμής με τη λεκιθίνη χαμηλού κόστους οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ενδογενείς αποδομητές υδρογονανθράκων προτιμούν να χρησιμοποιήσουν πρώτα το οργανικό ελαιόφιλο θρεπτικό συστατικό, ως πηγή άνθρακα, και στη συνέχεια να αποδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου. Επιπλέον, η χρήση της λεκιθίνης Bolec Zt ενισχύει τη μικροβιακή

ανάπτυξη των ενδογενών αποδομητών υδρογονανθράκων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι περιέχει ίχνη μετάλλων, τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη της βιομάζας των κυττάρων, που οδηγεί στο σχηματισμό βιοφίλμ στην επιφάνεια του πετρελαίου. Κλείνοντας, τα μέσα βιολογικής αποδόμησης, La-λεκιθίνη και το ουρικό οξύ, μπορούν να αντικατασταθούν από τα μέσα χαμηλού κόστους, λεκιθίνη Bolec Zt και το λίπασμα Basfoliar 36 Extra. Παρόλα αυτά για να γίνει βιώσιμη η μελέτη θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν όχι μόνο το διαθέσιμο κόστος αποκατάστασης, αλλά και το απαιτούμενο χρονικό περιθώριο αποκατάστασης της θαλάσσιας ρύπανσης.

## ABSTRACT

Oil spills remain a serious risk to marine environment, despite the stricter environmental regulations that have been adopted by most countries. Oil spills are weathered by several processes using the natural cleaning action of indigenous hydrocarbon degraders, a process known as intrinsic bioremediation. The aim of this work is to enhance intrinsic bioremediation rates through biostimulation. Biostimulation involves the addition of one or more rate-limiting nutrients (e.g. N, P) in order to enhance the biodegradation rate by stimulating the indigenous hydrocarbon degraders. In this work we examined the efficiency of low cost biostimulants.

Throughout this work, two experimental setups have been implemented. In the first setup, the degradation of crude oil by indigenous hydrocarbon degraders has been tested, using the combined application of low-cost biosurfactant, Oil Begone Bio, and low-cost nutrients, Lecithin Bolec Zt and the commodity fertilizer Basfoliar 36 extra. Lecithin was used as source of phosphorus and uric acid or commodity fertilizer were used as source of nitrogen. The degradation of crude oil has been compared between different combinations of nutrients in the presence or not of the plant based biosurfactant. The degradation of crude oil has also been compared between two different sources of nitrogen, Basfoliar 36 extra and uric acid. Additionally, the specific uptake rates of the petroleum hydrocarbons have been calculated. It was found that the use of the low-cost biosurfactant enhanced by 1.5 times the degradation of n-alkanes and total microbial growth after 28 days of incubation compared to the other treatments. Comparing the treatments with the low-cost commodity fertilizer and the uric acid, the degradation of petroleum hydrocarbons was practically the same.

In the second experimental setup, the degradation of crude oil by indigenous hydrocarbon degraders has been compared between two different sources of phosphorus, low-cost Lecithin Bolec Zt and L-a-Lecithin. The L-a-Lecithin enhanced the percentage of degradation of n-alkanes during the first 28 days more than the Lecithin Bolec Zt. Also, it was estimated that the specific uptake rate  $q_s$  for  $C_{20}$ ,  $C_{25}$  and  $C_{30}$  in the treatments with the high purity lecithin is 2, 2 and 1.6 times higher, respectively, than the treatments with the low-cost lecithin. However, the use of the low-cost Lecithin Bolec Zt lead to a 59% degradation of n-alkanes in 56 days, while the L-a-Lecithin lead to 56%. The delay of degradation for the treatments with the low-cost lecithin leads to the conclusion that the indigenous hydrocarbon degraders prefer to utilize first the organic lipophilic nutrient as a carbon source and then proceed with the petroleum

hydrocarbons. Furthermore, the use of the low-cost Lecithin Bolec Zt enhanced the microbial growth of the indigenous hydrocarbon degraders, during the experiment. This is owed to the fact that the low-cost Lecithin Bolec Zt besides carbohydrates contains trace metals, which enhance the growth of the cell biomass that leads to the formation of biofilm on the oil surface. It is concluded that the bioremediation agent La-Lecithin and Uric Acid may be replaced by the low cost Lecithin Bolec Zt and the low-cost fertilizer, Basfoliar 36 Extra, respectively. The results clearly indicate that biostimulation can be achieved effectively; however it should be examined not only the available rehabilitation costs, but also the required timeframe of marine pollution remediation, in order to achieve a viable study.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε και χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Έργου FP-7 «KILL\_SPILL-Integrated biotechnological solutions for combating marine oil spills» με αρ. Σύμβασης Νο. 312139 και δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί χωρίς την καθοδήγηση και τη συμπαράσταση ανθρώπων, στους οποίους οφείλω την ευγνωμοσύνη μου.

Μεγάλες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή, κ. Νικόλαο Καλογεράκη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε το θέμα της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής, την άριστη συνεργασία που είχαμε, καθώς επίσης και για την αμέριστη βοήθειά του κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή, κ. Νικόλαο Πασαδάκη, καθώς και την Ελένη Χαμηλάκη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όσον αφορά στη διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων στο εργαστήριο Ανάλυσης Ρευστών και Πυρήνων Υπόγειων Ταμιευτήρων και για τον χρόνο που διέθεσαν για την διόρθωση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Στην Επίκουρη Καθηγήτρια, κα Δανάη Βενιέρη, για τις χρήσιμες συμβουλές της κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ. Μαρία Νικολοπούλου, για την αδιάκοπη συνεισφορά και βοήθεια και την άριστη συνεργασία που είχαμε τους μήνες εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω πολύ, την Δρ. Ελευθερία Αντωνίου για τις χρήσιμες συμβουλές της και τη συμπαράστασή της στην προσπάθειά μου, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Εύη Συρανίδου για την συνεισφορά της στα πειραματικά μου αποτελέσματα και τις χρήσιμες συμβουλές της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστηριακό προσωπικό του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) στο Ηράκλειο Κρήτης για τη διάθεση του μικροσκοπίου CLSM.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους αγαπημένους μου φίλους, Μαρία, Σήφη, Πηνελόπη, Γεωργία και Θεοδώρα για τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην οικογένειά μου και στον Γιάννη για την αγάπη και την πολύτιμη συμπαράστασή τους και να τους αφιερώσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>2.1 Γενικά για το πετρέλαιο- Χημική σύσταση και φυσικές ιδιότητες πετρελαίου.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου .....	2
2.1.2 Φυσικές ιδιότητες αργού πετρελαίου .....	4
<b>2.2 Επιπτώσεις διαρροών πετρελαίου .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Τρόποι αντιμετώπισης και μέθοδοι καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Βιοαποδόμηση πετρελαίου .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Βιοαποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου .....	16
2.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στη βιοαποδόμηση του πετρελαίου .....	17
<b>2.5 Μέθοδος βιοδιέγερσης .....</b>	<b>18</b>
2.5.1 Χρήση θρεπτικών μέσων.....	18
2.5.2 Χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (biosurfactants).....	20
2.5.3 Πλεονεκτήματα μεθόδου βιοδιέγερσης .....	21
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Επιλογή κατάλληλων αντιδραστηρίων και θρεπτικών .....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Δειγματοληψία θαλασσινού νερού .....	24
3.2.2 Προετοιμασία πετρελαίου .....	24
3.2.3 Μέσο καλλιέργειας.....	24
3.2.4 Επιλογή θρεπτικών συστατικών και επιφανειοδραστικής ένωσης χαμηλού κόστους.....	25
<b>3.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις .....</b>	<b>31</b>
3.4.1 Τεχνική του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων (MPN) .....	31
<b>3.5 Χημικές αναλύσεις .....</b>	<b>32</b>
3.5.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid extraction-LLE)-Ανάκτηση πετρελαίου...	32

3.5.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase extraction-SPE)-Κλασματοποίηση πετρελαίου.....	34
3.5.3 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).....	34
3.6 Κινητική βιοαποδόμησης .....	38
3.7 Χαρακτηρισμός βιοφίλμ- Μικροσκοπία Ομοεστιακής Δέσμης Λέιζερ (CLSM) .....	39
 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	41
4.1 Αποτελέσματα 1 <sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού.....	41
4.1.1 Δοκιμή Control .....	41
4.1.2 Δοκιμή UL.....	42
4.1.3 Δοκιμή ULB .....	44
4.1.4 Δοκιμή B36L .....	46
4.1.5 Συνδυαστικά αποτελέσματα δοκιμών Control, UL, ULB και B36L .....	48
4.1.6 Οπτική παρατήρηση .....	53
4.2 Αποτελέσματα 2 <sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού.....	55
4.2.1 Δοκιμή Control .....	55
4.2.2 Δοκιμή UL1.....	56
4.2.3 Δοκιμή UL2.....	58
4.2.4 Συνδυαστικά αποτελέσματα δοκιμών Control, UL1 και UL2 .....	60
4.2.5 Οπτική παρατήρηση- Μικροσκοπία Ομοεστιακής Δέσμης Λέιζερ (CLSM) .....	70
4.2.6 Χαρακτηρισμός μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων .....	75
 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Αριθμός πετρελαιοκηλίδων που προήλθαν από διαρροές δεξαμενόπλοιων .....	8
<b>Πίνακας 2:</b> Μέσο κόστος καθαρισμού ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας για τον αντίστοιχο μηχανισμό καθαρισμού.....	11
<b>Πίνακας 3:</b> Συμβατικές επιλογές καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων .....	12
<b>Πίνακας 4:</b> Αντιπροσωπευτικοί αποδομητές των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.....	16
<b>Πίνακας 5:</b> Προσμίξεις και ιδιότητες της λεκιθίνης Bolec Zt .....	26
<b>Πίνακας 6:</b> Μέσα βιοαποδόμησης που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.....	27
<b>Πίνακας 7:</b> Ποσότητες των συστατικών στο 1 <sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό .....	29
<b>Πίνακας 8:</b> 1 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός .....	29
<b>Πίνακας 9:</b> Ποσότητες των συστατικών στο 2 <sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό .....	30
<b>Πίνακας 10:</b> 2 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός .....	31
<b>Πίνακας 11:</b> Ιόντα για τον κάθε αναλυτή στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS.....	37
<b>Πίνακας 12:</b> Ειδικός ρυθμός αποδόμησης, $q_s$ , επιλεγμένων n-αλκανίων .....	50
<b>Πίνακας 13:</b> Ειδικός ρυθμός αποδόμησης, $q_s$ , επιλεγμένων ρητίνων και PAHs .....	50
<b>Πίνακας 14:</b> Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μικροοργανισμών, $\mu$ .....	50
<b>Πίνακας 15:</b> Ειδικός ρυθμός αποδόμησης, $q_s$ , επιλεγμένων n-αλκανίων.....	66
<b>Πίνακας 16:</b> Ειδικός ρυθμός αποδόμησης, $q_s$ , επιλεγμένων ρητίνων και PAHs .....	66
<b>Πίνακας 17:</b> Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, $\mu$ .....	66

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Αντιπροσωπευτικοί κορεσμένοι υδρογονάνθρακες που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο .....	2
<b>Σχήμα 2:</b> Αντιπροσωπευτικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες του αργού πετρελαίου .....	3
<b>Σχήμα 3:</b> Αντιπροσωπευτικές ρητίνες του αργού πετρελαίου .....	3

<b>Σχήμα 4:</b> Θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα στον κόλπο του Μεξικού .....	5
<b>Σχήμα 5:</b> Θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα στον κόλπο του Μεξικού από το ατύχημα Deepwater Horizon .....	6
<b>Σχήμα 6:</b> Παραδείγματα οικολογικής καταστροφής στην πανίδα από ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες .....	7
<b>Σχήμα 7:</b> Διάγραμμα ετήσιας διαρροής πετρελαίου (billion-ton-miles) και των προϊόντων του από διάφορους τρόπους μεταφοράς .....	8
<b>Σχήμα 8:</b> Μεγαλύτερα περιστατικά πετρελαιοκηλίδων των τελευταίων ετών .....	9
<b>Σχήμα 9:</b> Μέσο κόστος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων σε δολάρια ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας .....	10
<b>Σχήμα 10:</b> Χρήση φραγμάτων και συσκευών απομάκρυνσης πετρελαίου στον κόλπο του Μεξικού .....	12
<b>Σχήμα 11:</b> Χρήση απορροφητικών υλικών στην πετρελαιοκηλίδα .....	13
<b>Σχήμα 12:</b> Καύση πετρελαίου στον κόλπο του Μεξικού στο ατύχημα Deepwater Horizon .....	13
<b>Σχήμα 13:</b> Διαχωρισμός σταγόνas πετρελαίου από επιφανειοδραστική ένωση .....	21
<b>Σχήμα 14:</b> Απεικόνιση επωαστήρα .....	28
<b>Σχήμα 15:</b> Δέκα διαδοχικές αραιώσεις και πλάκες καλλιέργειας με 96 πηγαδάκια της μεθόδου MPN .....	32
<b>Σχήμα 16:</b> Διαδικασία εκχύλισης υγρού-υγρού-LLE .....	33
<b>Σχήμα 17:</b> Διαδικασία Εκχύλισης Στερεάς Φάσης-SPE .....	34
<b>Σχήμα 18:</b> Εσωτερική διάταξη οργάνου GC-MS .....	35
<b>Σχήμα 19:</b> Απεικόνιση οργάνου GC-MS .....	35
<b>Σχήμα 20:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή Control .....	41
<b>Σχήμα 21:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL .....	42
<b>Σχήμα 22:</b> Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητίνων και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL .....	43
<b>Σχήμα 23:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή ULB .....	44
<b>Σχήμα 24:</b> Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητίνων και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή ULB .....	45

<b>Σχήμα 25:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή B36L .....	46
<b>Σχήμα 26:</b> Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητίνων και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή B36L. ....	47
<b>Σχήμα 27:</b> Μικροβιακό προφίλ των δοκιμών Control, UL, ULB και B36L .....	48
<b>Σχήμα 28:</b> : Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης μεταξύ των δοκιμών UL, ULB και B36L μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης .....	49
<b>Σχήμα 29:</b> Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL, ULB και B36L	50
<b>Σχήμα 30:</b> Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL, ULB και B36L	51
<b>Σχήμα 31:</b> Απεικόνιση των δειγμάτων Control μετά από την επώαση 28 ημερών .....	53
<b>Σχήμα 32:</b> Απεικόνιση των δειγμάτων UL μετά από την επώαση 28 ημερών .....	53
<b>Σχήμα 33:</b> Απεικόνιση των δειγμάτων ULB και B36L μετά από επώαση 28 ημερών .....	54
<b>Σχήμα 34:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή Control .....	55
<b>Σχήμα 35:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL1 .....	56
<b>Σχήμα 36:</b> Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητίνων και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL1 .....	57
<b>Σχήμα 37:</b> Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> , μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL2 .....	58
<b>Σχήμα 38:</b> Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητίνων και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL2 .....	59
<b>Σχήμα 39:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.....	60
<b>Σχήμα 40:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C <sub>15</sub> -C <sub>20</sub> ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.....	60
<b>Σχήμα 41:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C <sub>20</sub> -C <sub>30</sub> ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.....	61
<b>Σχήμα 42:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C <sub>30</sub> -C <sub>35</sub> ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	61
<b>Σχήμα 43:</b> Μικροβιακό προφίλ των δοκιμών Control, UL1 και UL2 .....	62

<b>Σχήμα 44:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL1 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	63
<b>Σχήμα 45:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL1 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	63
<b>Σχήμα 46:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	64
<b>Σχήμα 47:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	65
<b>Σχήμα 48:</b> Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης .....	65
<b>Σχήμα 49:</b> Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL1 και UL2.....	67
<b>Σχήμα 50:</b> Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων ρητίνων και PAHs των δοκιμών UL1 και UL2.....	68
<b>Σχήμα 51:</b> Απεικόνιση των δειγμάτων Control, UL1 και UL2 μετά από επώαση 27 ημερών.....	70
<b>Σχήμα 52:</b> Απεικόνιση των δειγμάτων Control, UL1 και UL2 μετά από επώαση 56 ημερών.....	70
<b>Σχήμα 53</b> Απεικόνιση του δείγματος UL2 μετά από επώαση 56 ημερών .....	71
<b>Σχήμα 54:</b> Δομή που σχηματίζεται μεταξύ των μικροοργανισμών (πράσινο χρώμα) και του πετρελαίου (λιλά χρώμα) .....	72
<b>Σχήμα 55:</b> Δομή που σχηματίζεται μεταξύ των μικροοργανισμών (πράσινο χρώμα) και του πετρελαίου (λιλά χρώμα). .....	72
<b>Σχήμα 56:</b> Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα) .....	73
<b>Σχήμα 57:</b> Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα) .....	73
<b>Σχήμα 58:</b> Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα) .....	74
<b>Σχήμα 59:</b> Πολυδιάστατη απεικόνιση (MDS) των δειγμάτων, ULW: μη αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt, USLW: αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt, Control: μη προσθήκη λεκιθίνης Bolec Zt .....	76
<b>Σχήμα 60:</b> Δείκτες βιοποικιλότητας Fisher's alpha και H' Shannon diversity index.....	77

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι συχνές διαρροές του πετρελαίου στο περιβάλλον και η ευαισθητοποίηση του κοινού σε περιβαλλοντικά θέματα, οδηγούν στην αναζήτηση πιο αποδοτικών μεθόδων για την απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον και την αποκατάστασή του. Στην σημερινή εποχή, υπάρχουν πολλοί τρόποι αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων σε παράκτιες και θαλάσσιες περιοχές. Μια πολλά υποσχόμενη τεχνική στον τομέα αυτόν είναι η βιοαποδόμηση (bioremediation), δηλαδή ο μετασχηματισμός χημικών ενώσεων σε απλούστερες μη τοξικές ενώσεις από βακτήρια ή άλλα βιολογικά μέσα μέσω του μεταβολισμού τους. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη βιοενίσχυση (*bioaugmentation*) και τη βιοδιέγερση (*biostimulation*). Στη μελέτη αυτή εξετάζεται η διαδικασία της βιοδιέγερσης, δηλαδή η διέγερση των ενδογενών μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών ή άλλων περιοριστικών υποστρωμάτων, με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού βιοαποδόμησης (κυρίως N και P).

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε με στόχο την επίτευξη και την αξιολόγηση της μεθόδου της βιοδιέγερσης των ενδογενών αποδομητών πετρελαίου με τη χρήση υλικών χαμηλού κόστους. Αρχικά, γίνεται περιγραφή του θεωρητικού υποβάθρου του θέματος. Στα επόμενα κεφάλαια περιγράφεται το τεχνικό κομμάτι που αντιστοιχεί στα υλικά και μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Έπειτα παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις εργαστηριακές μετρήσεις – αναλύσεις. Επίσης υπολογίζονται οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης και ανάπτυξης, ώστε να συγκριθούν οι δοκιμές μεταξύ τους. Τέλος, το τελευταίο κεφάλαιο περιέχει τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη των αποτελεσμάτων, αξιολογώντας έτσι την εξεταζόμενη βιοδιέγερση των δειγμάτων.

## 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Γενικά για το πετρέλαιο- Χημική σύσταση και φυσικές ιδιότητες πετρελαίου

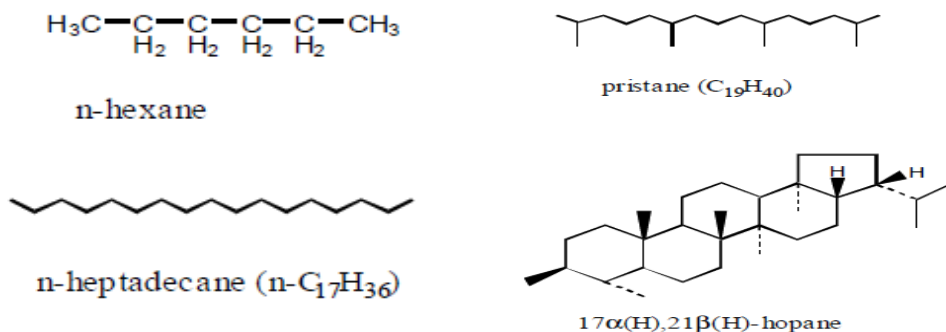
Ο «μαύρος χρυσός», δηλαδή το πετρέλαιο, εξακολουθεί μέχρι σήμερα να αποτελεί τη σπουδαιότερη φυσική πηγή ενέργειας. Το πετρέλαιο, που ετυμολογικά προέρχεται από τις λέξεις *πέτρα* και *έλαιο* και σημαίνει «λάδι της πέτρας», είναι ένα ορυκτό καύσιμο. Κατατάσσεται στους μη ανανεώσιμους φυσικούς πόρους, καθώς δεν ανανεώνεται με φυσικές ή τεχνικές διεργασίες και υπάρχει σε φυσικά κοιτάσματα που καταναλώνονται και εξαντλούνται.

#### 2.1.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου

Το πετρέλαιο και ο ισοδύναμος όρος του, αργό πετρέλαιο (crude oil), αποτελούνται από ένα περίπλοκο μίγμα υδρογονανθράκων (50-98% της συνολικής σύστασης) και άλλων ενώσεων που περιέχουν μεταβλητές ποσότητες θείου, αζώτου, οξυγόνου και ιχνοστοιχείων. Επειδή τα συστατικά του πετρελαίου και οι αναλογίες τους είναι κυμαινόμενες, οι φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου ποικίλουν, όπως και το χρώμα του, από άχρωμο σε μαύρο (Speight, 2014).

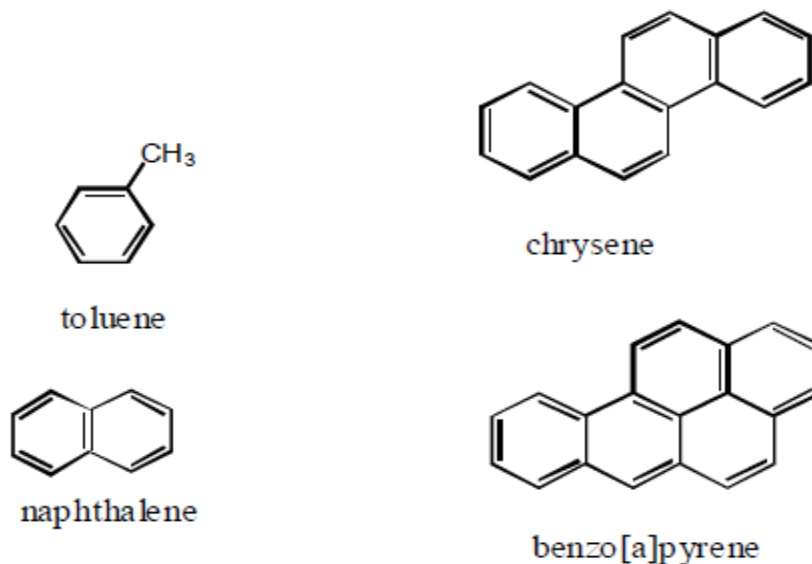
Τα συστατικά του αργού πετρελαίου με βάση την διαλυτότητά τους σε οργανικούς διαλύτες, ταξινομούνται σε:

- i. **Κορεσμένους υδρογονάνθρακες:** Περιλαμβάνουν κανονικά και διακλαδισμένα n-αλκάνια με δομή  $C_nH_{2n+2}$  (αλειφατικά) και κυκλικά n-αλκάνια με δομή  $C_nH_{2n}$  (αλεικυκλικά), τα οποία περιέχουν από έναν άνθρακα έως και πάνω από 40 άνθρακες. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες υπάρχουν σε αφθονία στο αργό πετρέλαιο.



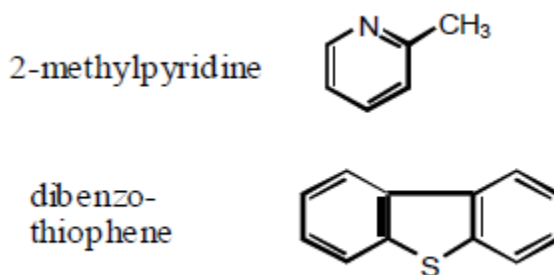
**Σχήμα 1:** Αντιπροσωπευτικοί κορεσμένοι υδρογονάνθρακες που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο (Zhu, et al., 2001).

- ii. **Αρωματικοί υδρογονάνθρακες:** Περιλαμβάνουν μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις (όπως βενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλια) και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) (όπως ναφθαλίνη, ανθρακένιο και φθενανθρένιο), οι οποίοι διαθέτουν δύο ή περισσότερους συμπυκνωμένους αρωματικούς δακτυλίους. Τα PAHs είναι ιδιαίτερης περιβαλλοντικής σημασίας επειδή είναι πιθανές καρκινογόνες ουσίες ή μπορούν να μετασχηματιστούν σε καρκινογόνες ουσίες από το μικροβιακό μεταβολισμό.



**Σχήμα 2:** Αντιπροσωπευτικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες του αργού πετρελαίου (Zhu, et al., 2001).

- iii. **Ρητίνες (ετεροενώσεις NSO):** Περιλαμβάνουν τις πολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, θείο και οξυγόνο (όπως πυριδίνες και θειοφαίνια).



**Σχήμα 3:** Αντιπροσωπευτικές ρητίνες του αργού πετρελαίου (Zhu, et al., 2001).

- iv. **Ασφαλτένια:** Αποτελούνται από ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες καθώς και άζωτο, θείο οξυγόνο (NSOs). Τα μέταλλα όπως το νικέλιο, το βανάδιο και ο σίδηρος συνδέονται επίσης με τα ασφαλτένια. Ασφαλτένιο του αργού πετρελαίου αποτελεί η ένωση με χημικό τύπο  $(C_{79}H_{92}N_2S_2O)_3$ .

### 2.1.2 Φυσικές ιδιότητες αργού πετρελαίου

Σημαντικές φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του στο περιβάλλον και τους τρόπους καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων περιλαμβάνουν τα εξής:

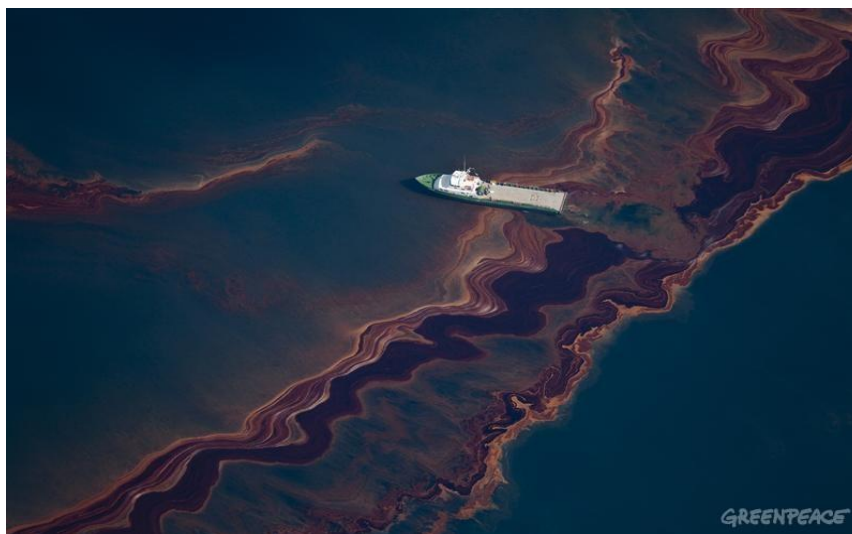
- i. **Πυκνότητα:** Στο αργό πετρέλαιο η ειδική πυκνότητα κυμαίνεται από 0.79 έως 1.00 (ισοδύναμη American Petroleum Institute API πυκνότητα από 10 έως 48). Η πυκνότητα του πετρελαίου είναι ένας σημαντικός δείκτης της σύνθεσης του πετρελαίου που λαμβάνεται υπόψιν για τη μελέτη της συμπεριφοράς του στο νερό.
- ii. **Ιξώδες:** Η τιμή ιξώδους του πετρελαίου εξαρτάται από τη σύνθεσή του και τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποτελεί σημαντικό δείκτη για τον ρυθμό εξάπλωσης μιας πετρελαιοκηλίδας.
- iii. **Σημείο Ροής:** Το σημείο ροής του πετρελαίου είναι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται ημιστερεό ή σταματά να ρέει και αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τον καθαρισμό του πετρελαίου. Το σημείο ροής του αργού πετρελαίου κυμαίνεται από  $-57^{\circ}\text{C}$  έως  $32^{\circ}\text{C}$ .
- iv. **Διαλυτότητα στο νερό:** Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι εξαιρετικά χαμηλή και εξαρτάται από τη χημική σύνθεσή και τη θερμοκρασία. Η φυσική αυτή ιδιότητα σχετίζεται με την τοξικότητα του πετρελαίου και τις διεργασίες βιοεξυγίανσης. Η τιμή της διαλυτότητας κυμαίνεται στα 30 mg/L (Zhu, et al., 2001). Να σημειωθεί ότι οι χαμηλού μοριακού βάρους αρωματικές ουσίες όπως το βενζόλιο, το τολουόλιο και το ξυλόλιο είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό.

Άλλες σημαντικές φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου είναι το σημείο ανάφλεξης, η τάση ατμών, η επιφανειακή τάση και η προσρόφηση.

## 2.2 Επιπτώσεις διαρροών πετρελαίου

Το πετρέλαιο εξορύσσεται από την γη ή αντλείται από την θάλασσα. Η επεξεργασία του γίνεται στο πεδίο εξόρυξης ή άντλησης, διαφορετικά μεταφέρεται με μεγάλους αγωγούς ή ειδικά πλοία στα διυλιστήρια και με τα ίδια μέσα σε σταθμούς και στην κατανάλωση. Τα ατυχήματα που συμβαίνουν κατά την παραγωγή, την μεταφορά, την αποθήκευση και την χρήση του πετρελαίου παγκοσμίως, καθώς και η σκόπιμη απόρριψη αποβλήτων κατά την επεξεργασία του, το καθιστούν μία από τις σοβαρότερες αιτίες ρύπανσης και καταστροφής της χλωρίδας και της πανίδας σε θάλασσα, έδαφος και υπόγεια νερά.

Το πετρέλαιο που διαρρέει στην θάλασσα (αργό πετρέλαιο ή διυλισμένο υλικό όπως βενζίνη ή diesel), προκαλεί ρύπανση της θάλασσας αλλά και του εδάφους δημιουργώντας τεράστιες συνέπειες στο φυσικό περιβάλλον. Το 30-40% των πετρελαιοειδών που ρυπαίνουν την επιφάνεια της θάλασσας αποτελείται από πτητικά συστατικά, τα οποία εξατμίζονται γρήγορα, ενώ τα υπόλοιπα σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα πετρελαίου το οποίο μειώνει την ανανέωση του νερού με το οξυγόνο του αέρα, εμποδίζει τις ακτίνες του ήλιου να εισχωρήσουν βαθιά στη θάλασσα για τη φωτοσύνθεση, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και υπερβολική ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν οξυγόνο (Zhu, et al., 2001).



**Σχήμα 4:** Θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα στον κόλπο του Μεξικού (Greenpeace, 2011).



**Σχήμα 5:** Θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα στον κόλπο του Μεξικού από το ατύχημα Deepwater Horizon (NOAA, 2010).

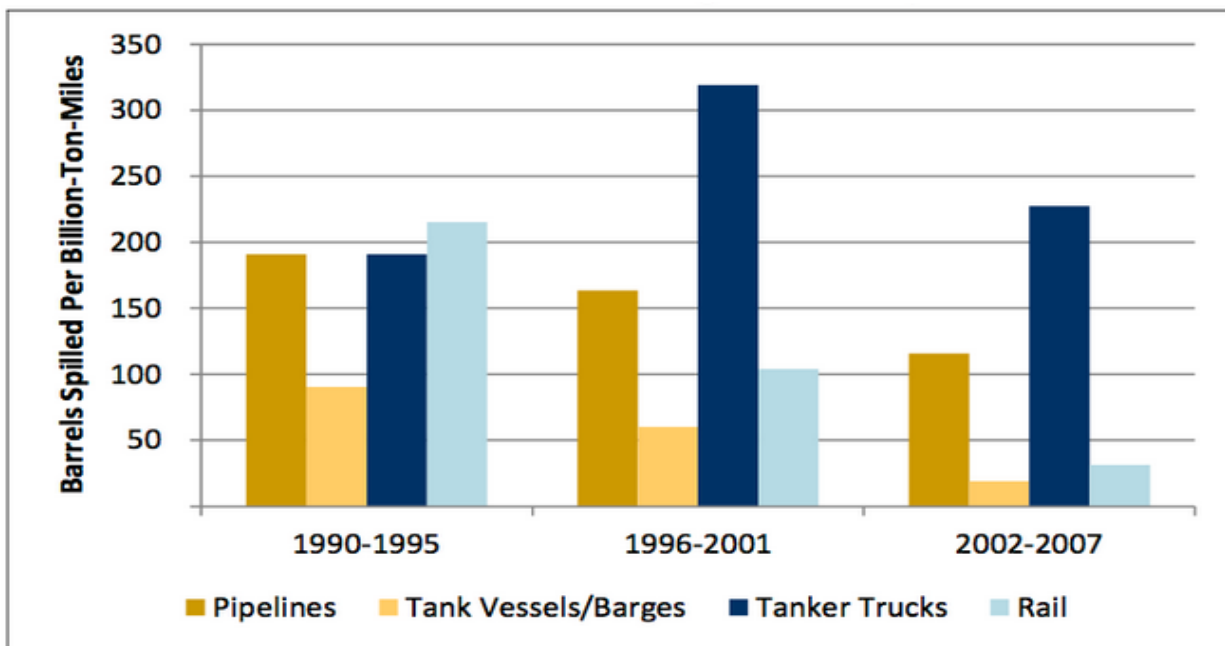
Τα μαλάκια και τα φυτά είναι ιδιαίτερα ευπαθή γιατί δηλητηριάζονται και πεθαίνουν από ασφυξία. Το ίδιο συμβαίνει και με τα ψάρια εκείνα που δεν εγκαταλείπουν έγκαιρα τη ρυπασμένη περιοχή. Η πίσσα που εκβράζεται στις παραλίες καταστρέφει τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, ενώ έχει υπολογιστεί ότι απαιτούνται 2-3 χρόνια για να αποκατασταθεί πλήρως η παράκτια χλωρίδα. Για τα πτηνά οι επιπτώσεις της ρύπανσης είναι δραματικές, καθώς τα φτερά τους καλύπτονται από το πετρέλαιο, δεν μπορούν να πετάξουν και πεθαίνουν από το κρύο διότι δεν έχουν πλέον το μονωτικό στρώμα των φτερών και των πούπουλων. Όσα πτηνά επιβιώνουν, δηλητηριάζονται και πεθαίνουν στην προσπάθειά τους να απαλλαγούν από το πετρέλαιο.



**Σχήμα 6:** Παραδείγματα οικολογικής καταστροφής στην πανίδα από ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες (Brookfield, 2008).

Η διαρροή πετρελαίου έχει επίπτωση στους υγροβιότοπους, καθώς μειώνει την παραγωγικότητα αυτών, και στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς που βρίσκονται τόσο στην επιφάνεια της θάλασσας όσο και στον βυθό που αποτελούν σημαντική παράμετρο στην τροφική αλυσίδα των θαλάσσιων οργανισμών. Τέλος, προκύπτει ότι και οι ίδιοι θαλάσσιοι οργανισμοί επηρεάζονται, είτε άμεσα λόγω προβλημάτων υγείας που δημιουργούν οι πετρελαιοκηλίδες, είτε έμμεσα εξαιτίας της καταστροφής της τροφικής τους αλυσίδας (NOAA, 2011).

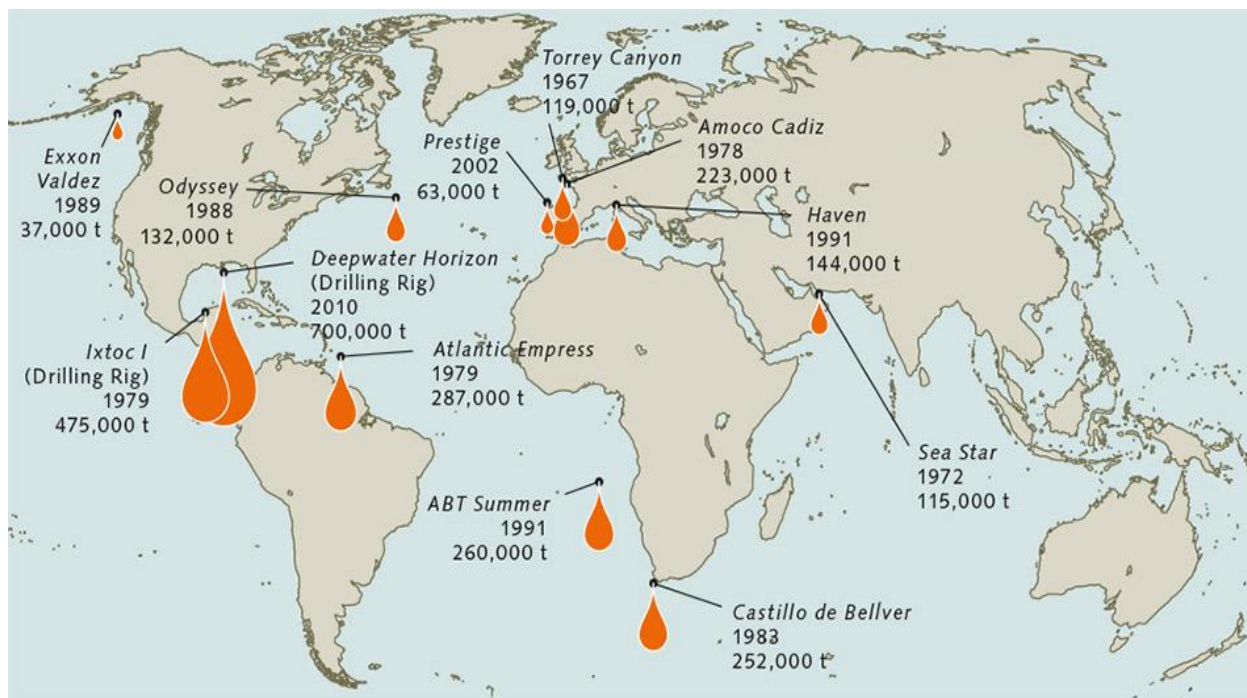
Στο σχήμα 7 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ετήσια διαρροή πετρελαίου (billion-ton-miles) και των προϊόντων του από διάφορους τρόπους μεταφοράς. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό διαρροών οφείλεται σε βυτιοφόρα φορτηγά, ενώ ακολουθούν οι σιδηροδρομικές γραμμές, οι αγωγοί μεταφοράς και τέλος τα δεξαμενόπλοια. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται με βάση στατιστικά δεδομένα οι τόνοι πετρελαίου που έχουν διαρρεύσει από δεξαμενόπλοια την τελευταία δεκαετία.



**Σχήμα 7:** Διάγραμμα ετήσιας διαρροής πετρελαίου (billion-ton-miles) και των προϊόντων του από διάφορους τρόπους μεταφοράς (Congressional Research Service, 2015).

**Πίνακας 1:** Αριθμός πετρελαιοκηλίδων που προήλθαν από διαρροές δεξαμενόπλοιων (ITOPF, 2015).

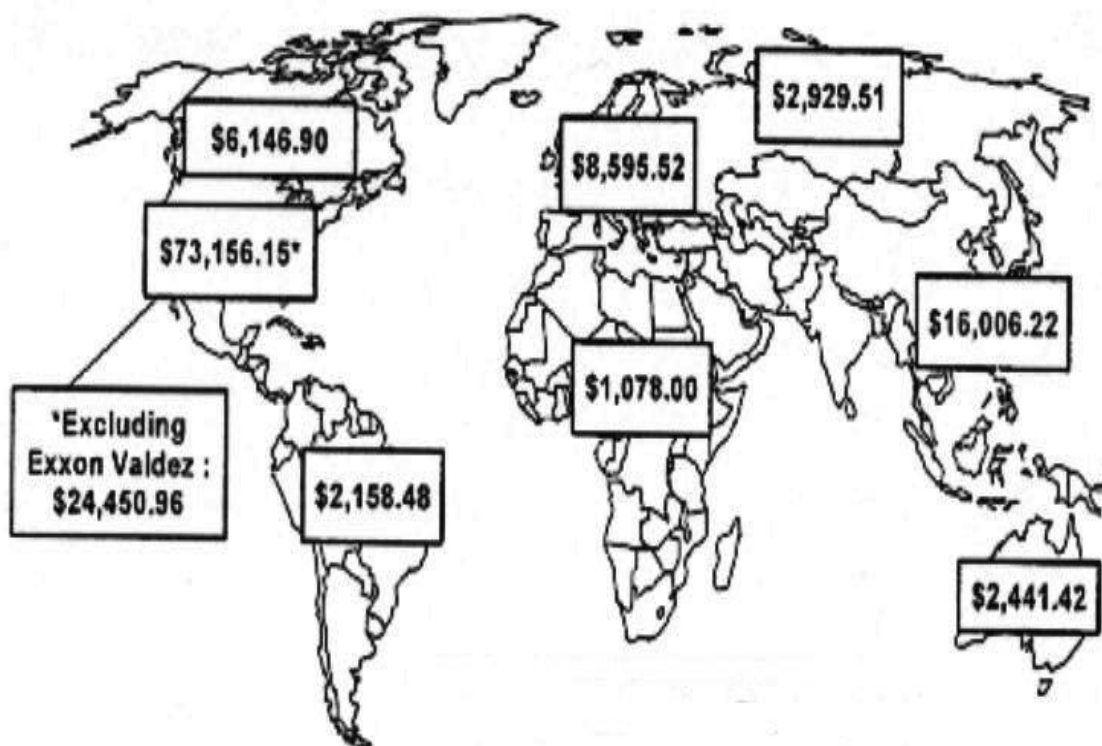
Έτος	7-700 τόνοι	>700 τόνοι
2004	19	5
2005	21	4
2006	11	5
2007	12	3
2008	7	1
2009	7	2
2010	5	4
2011	5	1
2012	7	0
2013	5	3
2014	4	1



**Σχήμα 8:** Μεγαλύτερα περιστατικά πετρελαιοκηλίδων των τελευταίων ετών (World Ocean Review, 2015).

Στο σχήμα 8 απεικονίζονται τα κυριότερα ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων των τελευταίων ετών με κύριες αιτίες ατυχήματα στους αγωγούς μεταφοράς και φόρτωσης του πετρελαίου, εκρήξεις και βλάβες στα δεξαμενόπλοια. Με αφορμή το ατύχημα του Exxon Valdez το 1989, το οποίο θεωρήθηκε από τα πιο καταστροφικά ατυχήματα από περιβαλλοντικής άποψης στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ξεκίνησαν να εφαρμόζονται τακτικές βιοδιέγερσης (biostimulation) με την χρήση λιπασμάτων τα οποία περιείχαν θρεπτικά συστατικά με στόχο την βιοαποδόμηση του πετρελαίου. Επίσης, το ατύχημα της Deepwater Horizon Oil στον κόλπο του Μεξικού το 2010, αποτελεί τη μεγαλύτερη θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα που έχει δημιουργηθεί ποτέ στην ιστορία. Στο συγκεκριμένο ατύχημα χρησιμοποιήθηκαν μέσα απομάκρυνσης του πετρελαίου όπως η καύση, πλωτά φράγματα, η χρήση χημικών ουσιών διασποράς καθώς και η χρήση της μεθόδου της βιοδιέγερσης.

Επιπρόσθετα, τα μέσα και οι μέθοδοι απομάκρυνσης των πετρελαιοκηλίδων προϋποθέτουν τη διάθεση μεγάλων χρηματικών ποσών, γι' αυτό γίνονται προσπάθειες μείωσης του κόστους αποκατάστασης. Στο σχήμα 9 που ακολουθεί σημειώνονται το μέσο κόστος καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας σε δολάρια από μετρήσεις του 1997 της υπηρεσίας International Oil Spill Database (Etkin, 1999).



**Σχήμα 9:** Μέσο κόστος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων σε δολάρια ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας (Etkin, 1999).

Τα έξοδα καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων επηρεάζονται από το μέγεθος της πετρελαιοκηλίδας, την περιοχή του ατυχήματος, το είδος του πετρελαίου που δημιούργησε την πετρελαιοκηλίδα, αλλά κυρίως τον μηχανισμό καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε (Etkin, 1999). Στο πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μέσα κόστη καθαρισμού ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας για τον αντίστοιχο μηχανισμό καθαρισμού.

**Πίνακας 2:** Μέσο κόστος καθαρισμού ανά τόνο πετρελαιοκηλίδας για τον αντίστοιχο μηχανισμό καθαρισμού (Etkin, 1999).

<b>Στρατηγική καθαρισμού</b>	<b>Μέσο κόστος καθαρισμού (\$/tone)</b>
Μηχανική / Χειροκίνητη ανάκτηση	<b>12,500</b>
Χρήση μέσων διασποράς συνδυαστικά με άλλες μεθόδους	<b>14,000</b>
Χρήση μέσων διασποράς ως κύρια μέθοδος	<b>2,500</b>

Τα καταστροφικά ατυχήματα που αναφέρθηκαν, τόσο για τον οικονομικό όσο και για τον περιβαλλοντικό τους αντίκτυπο, έχουν αυξήσει τη δημόσια ευαισθητοποίηση για τους κινδύνους που περιλαμβάνονται κατά την αποθήκευση και μεταφορά του πετρελαίου και έχουν οδηγήσει σε αυστηρούς κανονισμούς. Οι πετρελαιοκηλίδες και οι διαρροές θα συνεχίσουν να εμφανίζονται, εφόσον το πετρέλαιο χρησιμοποιείται ευρέως παρά τις προφυλάξεις. Κατά συνέπεια, είναι ουσιαστικό να μελετηθούν αποτελεσματικά φυσικά μέτρα χαμηλού κόστους για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

### **2.3 Τρόποι αντιμετώπισης και μέθοδοι καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων**

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2.2 οι στρατηγικές για τον καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, όπως του τύπου του πετρελαίου και των γεωγραφικών χαρακτηριστικών της περιοχής. Γι' αυτόν τον λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές και τεχνολογίες αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Στον πίνακα 3 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συμβατικές μέθοδοι καθαρισμού των ακτών από τις πετρελαιοκηλίδες.

**Πίνακας 3:** Συμβατικές επιλογές καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων (Zhu, et al., 2001).

Επιλογές απόκρισης πετρελαιοκηλίδων	Παράδειγμα τεχνολογίας
Φυσικές μέθοδοι	Εξάτμιση
	Φωτο-οξειδωση
	<b>Βιοαποδόμηση</b>
Μη χημικές μέθοδοι	Πλωτό φράγμα
	Συσκευή απομάκρυνσης πετρελαίου (Skimmer)
	Χρήση απορροφητικών υλικών για συλλογή από την μολυσμένη επιφάνεια
	Μηχανική απομάκρυνση
	Έκπλυση με νερό
	Καύση
Χημικές μέθοδοι	Χρήση μέσων διασποράς (dispersants), απογαλακτωματοποιητών (demulsifiers) και στερεοποιητικών (solidifiers)

Η φυσική βιοεξυγίανση (natural attenuation) ή η φυσική αποκατάσταση είναι βασικά η επιλογή όπου δεν λαμβάνεται κάποιο μέτρο έτσι το πετρέλαιο αφήνεται να απομακρυνθεί ή να αποδομηθεί με φυσικά μέσα. Πιο αναλυτικά:

- *Εξάτμιση* καλείται η σημαντικότερη φυσική διαδικασία καθαρισμού κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της πετρελαιοκηλίδας και έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ελαφρύτερων συστατικών του πετρελαίου τις πρώτες ώρες της διαρροής.
- *Φωτο-οξείδωση* ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο το οξυγόνο υπό το φως του ήλιου αντιδρά με τα συστατικά του πετρελαίου και μετασχηματίζει τις πολύπλοκες ενώσεις του πετρελαίου σε απλούστερες.
- *Βιοαποδόμηση* καλείται ένας ιδιαίτερα σημαντικός μηχανισμός κατά τον οποίο απομακρύνονται οι υδρογονάνθρακες του πετρελαίου με τη χρήση μικροοργανισμών.

Όσον αφορά στις μη χημικές μεθόδους γίνεται χρήση των εξής:

- *Πλωτό φράγμα και συσκευή απομάκρυνσης πετρελαίου (booming and skimming), με την βοήθεια των οποίων το πετρέλαιο της επιφάνειας συγκρατείται και απομακρύνεται ελεγχόμενα.*



**Σχήμα 10:** Χρήση φραγμάτων και συσκευών απομάκρυνσης πετρελαίου στον κόλπο του Μεξικού (USCG, 2010).

- *Χρήση απορροφητικών υλικών (Wiping with absorbent materials) με τα οποία απομακρύνεται το πετρέλαιο από την μολυσμένη επιφάνεια.*



**Σχήμα 11:** Χρήση απορροφητικών υλικών στην πετρελαιοκηλίδα Deepwater Horizon (USCG, 2010).

- *Μηχανική απομάκρυνση (mechanical removal), δηλαδή η συλλογή και απομάκρυνση των ιζημάτων πετρελαίου με μηχανολογικό εξοπλισμό.*
- *Έκπλυση με νερό (Washing), το οποίο περιλαμβάνει την έκπλυση του πετρελαίου με την χρήση νερού χαμηλής ή υψηλής πίεσης ανάλογα την τοποθεσία.*

- *Καύση (In-situ burning)* που περιλαμβάνει καύση πετρελαίου όταν αυτό βρεθεί σε υπόστρωμα που ευνοεί την καύση. Η μέθοδος αυτή όμως προκαλεί σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή της χλωρίδας και της πανίδας.



**Σχήμα 12:** Καύση πετρελαίου στον κόλπο του Μεξικού στο ατύχημα Deepwater Horizon (NOAA, 2010).

Η χρήση χημικών ενώσεων διασποράς (dispersants) δημιουργεί διαφωνία σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και ανησυχία λόγω της τοξικότητας καθώς και των μακροπρόθεσμων περιβαλλοντικών επιπτώσεων των χημικών αυτών ενώσεων. Πιο αναλυτικά:

- *Χημικές ενώσεις διασποράς (dispersants)* καλούνται οι ενώσεις που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες και χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια. Ακόμα, έχουν την ικανότητα να διασκορπίζουν το πετρέλαιο με σκοπό τη μείωση των τοξικών συγκεντρώσεων του πετρελαίου και να αυξάνουν την επιφάνεια αντίδρασης με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού βιοδιάσπασης.
- *Απογαλακτωματοποιητές (demulsifiers) και στερεοποιητικά (solidifiers)* καλούνται οι ενώσεις που ενισχύουν την φυσική διασπορά του πετρελαίου (Zhu et al., 2001).

## 2.4 Βιοαποδόμηση πετρελαίου

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια οι πετρελαιοκηλίδες αποτελούν μέχρι και σήμερα σοβαρό κίνδυνο των θαλάσσιων οικοσυστημάτων φέροντας ανυπολόγιστες οικονομικές και οικολογικές καταστροφές στην περιοχή που πλήττουν. Αν και οι συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης, όπως οι μη χημικές (πλωτά φράγματα, απορροφητικά υλικά κ.ά.), είναι η πρώτη επιλογή σε περίπτωση ατυχήματος, σπάνια επιτυγχάνουν πλήρη καθαρισμό και μετά την χρήση τους εμφανίζεται ξανά η διαρροή. Οι χημικές μέθοδοι, όπως τα χημικά μέσα διασποράς και οι επιφανειοδραστικές ενώσεις, επιτρέπονται μόνο όταν το μήκος ρύπανσης από την ακτογραμμή είναι πάνω από 15 μέτρα. Παρόλο που αυτές οι χημικές ενώσεις επιτρέπουν την άμεση διασπορά του πετρελαίου στην θάλασσα, είναι τοξικές για τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Γι' αυτόν τον λόγο χρειάζονται αρκετές δοκιμές και μελέτες πριν την χρήση τους. Γενικότερα, οι επιφανειοδραστικές ουσίες ευνοούν τη διασπορά του πετρελαίου σε σταγονίδια, συνεπώς και τη βιοδιαθεσιμότητα των μικροοργανισμών. Η χρήση των επιφανειοδραστικών ενισχύει τα ποσοστά βιοαποδόμησης στις περιπτώσεις που υπάρχουν στο υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα όπως άζωτο, N, φώσφορο, P, και οξυγόνο, O<sub>2</sub>. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η βιοαποδόμηση έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την καταπολέμηση των θαλάσσιων πετρελαιοκηλίδων μετά από τις πρώτες ενέργειες αντιμετώπισης που αναλύθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η βιοαποδόμηση (*intrinsic bioremediation*) αποτελεί μια φυσική μέθοδο καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων και επιτυγχάνεται με τη χρήση ενδογενών αποδομητών υδρογονανθράκων. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη βιοενίσχυση (*bioaugmentation*) και τη βιοδιέγερση (*biostimulation*). Πιο αναλυτικά:

- ✓ Με τον όρο *βιοενίσχυση* καλείται η προσθήκη βακτηρίων που έχουν την ιδιότητα να αποδομούν το πετρέλαιο στη ρυπασμένη περιοχή με σκοπό την αύξηση των ποσοστών βιοαποδόμησης και την ενίσχυση του ήδη υπάρχοντα μικροβιακού πληθυσμού.
- ✓ Με τον όρο *βιοδιέγερση* καλείται η διέγερση των ενδογενών μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων που επιτυγχάνεται με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών ή άλλων

περιοριστικών υποστρωμάτων, με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού βιοαποδόμησης (κυρίως N και P) (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2011).

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου είναι ευρέως διαδεδομένοι στο θαλάσσιο περιβάλλον. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποδομούν τους υδρογονάνθρακες από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα. Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κυρίαρχοι αποδομητές υδρογονανθράκων, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι ένα γένος βακτηρίου μπορεί να αποδομήσει όλα τα συστατικά του αργού πετρελαίου. Μερικοί από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που αποδομούν τους υδρογονάνθρακες στο θαλάσσιο περιβάλλον παρατίθενται στον πίνακα 4 (Leahy and Colwell, 1990).

**Πίνακας 4:** Αντιπροσωπευτικοί αποδομητές των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων (Zhu, et al., 2001).

<b>Bacteria</b>	<b>Yeast and Fungi</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Cornybacterium</i>	<i>Candida</i>

#### **2.4.1 Βιοαποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου**

Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες: κορεσμένα, αρωματικές ενώσεις, ρητίνες και ασφαλτένια. Η επιδεκτικότητα των υδρογονανθράκων πετρελαίου στη μικροβιακή αποδόμηση ακολουθεί την εξής σειρά (Saadoun, 2002):

**n-αλκάνια > διακλαδισμένα n-αλκάνια > μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις > κυκλικά n-αλκάνια.**

Ωστόσο, αυτή η ακολουθία δεν είναι καθολική. Ο ρυθμός αποικοδόμησης για τα ίδια συστατικά πετρελαίου ποικίλει σημαντικά για τα διαφορετικά είδη πετρελαίου (Zhu, et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, η βιοαποδόμηση ακολουθεί, συνήθως το μοτίβο:

**C15 > C20 > C25 > C30 > Πριστάνιο > Φυτάνιο > C35 > PAHs.**

Τα n-αλκάνια διασπώνται ευκολότερα από τα PAHs και τα n-αλκάνια με μεγάλο μήκος αλυσίδας ή διακλαδώσεις αυξάνουν την αντίσταση των υδρογονανθράκων στους μικροβιακούς αποδομητές (Saadoun, 2002).

#### **2.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στη βιοαποδόμηση του πετρελαίου**

Ο ρυθμός βιοαποδόμησης του πετρελαίου επηρεάζεται πολύ από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος, όπως οι διεργασίες γήρανσης, η θερμοκρασία, η βιοδιαθεσιμότητα και η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, η διαθεσιμότητα, η συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH.

Με τον όρο διεργασίες γήρανσης καλείται το σύνολο των φυσικοχημικών και βιολογικών διεργασιών που υποβάλλεται το πετρέλαιο με την πάροδο του χρόνου, όπως η εξάπλωση, η εξάτμιση, η γαλακτωματοποίηση, η βιοαποδόμηση, ο σχηματισμός πίσσας κτλ (Atlas, 1988). Οι διεργασίες γήρανσης επηρεάζουν άμεσα την βιοαποδόμηση του πετρελαίου, καθώς η εξάτμιση των πτητικών συστατικών του πετρελαίου οδηγεί στην απομάκρυνση των τοξικότερων μικρού μοριακού βάρους συστατικών όπως το βενζόλιο και των μικρότερων n-αλκανίων και οδηγεί σε μικρότερα ποσοστά βιοαποδόμησης του πετρελαίου (Atlas, 1981). Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός γαλακτωμάτων και πίσσας οδηγεί σε μειωμένη επιφάνεια επαφής και συνεπώς σε μειωμένη πρόσβαση των μικροοργανισμών και ελάττωση της βιοδιάσπασης.

Σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τόσο τις ιδιότητες του πετρελαίου όσο και τη δραστηριότητα του πληθυσμού των μικροοργανισμών συνεπώς και τη βιοδιάσπαση είναι η θερμοκρασία. Ο ρυθμός βιοδιάσπασης μειώνεται, γενικά, μειώνοντας τη θερμοκρασία. Έχει βρεθεί από την βιβλιογραφία ότι υψηλότεροι ρυθμοί αποικοδόμησης εμφανίζονται στην περιοχή από 15 έως 20 °C στο θαλάσσιο περιβάλλον (Bossert και Bartha, 1984).

Το οξυγόνο θεωρείται ακόμα ένας καθοριστικής σημασίας περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την βιοαποδόμηση. Οι αερόβιες συνθήκες θεωρούνται, γενικά, απαραίτητες για την εκτενή αποδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον δεδομένου ότι τα

σημαντικότερα μονοπάτια αποδόμησης και για τα κορεσμένα και για τα αρωματικά περιλαμβάνουν τις οξυγενάσεις (Atlas, 1981), (Cerniglia, 1992).

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων πετρελαίου είναι το pH και η αλατότητα. Το pH του θαλασσινού νερού είναι σταθερό και ελαφρώς αλκαλικό. Τα περισσότερα ετερότροφα βακτήρια και μύκητες ευνοούν το ουδέτερο pH, με τους μύκητες να είναι πιο ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η αποικοδόμηση του πετρελαίου αυξάνεται όταν αυξάνεται το pH και ότι η βέλτιστη αποικοδόμηση παρουσιάζεται υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες. Οι αλλαγές στην αλατότητα μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου μέσω της αλλαγής του μικροβιακού πληθυσμού (Zhu, et al., 2001).

Τέλος, τα θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο και ο φώσφορος αποτελούν σημαντικό παράγοντα, ο οποίος καθορίζει τη βιοαποδόμηση του πετρελαίου. Θεωρητικά, χρησιμοποιούνται περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε υλικό κυττάρων (Rosenberg και Ron, 1996). Όταν μια μεγάλη πετρελαιοκηλίδα εμφανίζεται στο θαλάσσιο περιβάλλον η διαθεσιμότητα σε άζωτο και σε φωσφόρο γίνεται περιοριστικός παράγοντας για την αποικοδόμηση του πετρελαίου (Leahy και Colwell, 1990).

## 2.5 Μέθοδος βιοδιέγερσης

### 2.5.1 Χρήση θρεπτικών μέσων

Στο θαλάσσιο οικοσύστημα σε περιπτώσεις διαρροής του πετρελαίου, η παρουσία του άνθρακα είναι αυξημένη (παρουσία υδρογονανθράκων), ενώ η παρουσία αζώτου και φωσφόρου είναι περιορισμένη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί με τον όρο βιοδιέγερση εννοείται η προσθήκη ενός ή περισσότερων θρεπτικών ουσιών με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού βιοαποδόμησης των υδρογονανθράκων. Επομένως, τα θρεπτικά συστατικά είναι περιοριστικοί παράγοντες στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η βέλτιστη αναλογία θρεπτικών συστατικών, δηλαδή **C:N:P**, που ενισχύει τον ρυθμό βιοαποδόμησης είναι **100:10:1** (Evers, et al., 2004). Τα είδη των θρεπτικών συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι τα εξής:

### ✓ Υδατοδιαλυτά ανόργανα συστατικά

Όσον αφορά στο άζωτο, N, έχει βρεθεί ότι εκτός από την αναλογία του, σημαντικό ρόλο στη βιοαποδόμηση παίζει και η μορφή του. Η προσθήκη  $\text{NO}_3\text{-N}$  είναι περισσότερο αποδοτική από την προσθήκη  $\text{NH}_4\text{-N}$  (Wrenn, et al., 1994). Αυτό αποδίδεται στην παραγωγή οξέος από τον μεταβολισμό της αμμωνίας, η οποία αναστέλλει τη βιοαποδόμηση του πετρελαίου. Οι πιο συνηθισμένες μορφές υδατοδιαλυτών θρεπτικών συστατικών είναι τα υδατοδιαλυτά θρεπτικά άλατα, όπως  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_3\text{NO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  και  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , και πολλά εμπορικά ανόργανα λιπάσματα με αναλογία N:P ίση με 10:1. Η χρήση των παραπάνω θρεπτικών γίνεται είτε με ψεκασμό στο πεδίο σε μορφή διαλυμάτων είτε σε μορφή κόκκων. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα τους αποτελεί το γεγονός ότι μπορούν να εκπλυθούν εύκολα από τις παλίρροιες και τα κύματα.

### ✓ Λιπάσματα βραδείας αποδέσμευσης

Η χρήση των λιπασμάτων βραδείας αποδέσμευσης προσφέρει μια συνεχή πηγή θρεπτικών συστατικών στις ρυπασμένες περιοχές. Τα λιπάσματα αυτά αποτελούνται συνήθως από ανόργανα θρεπτικά συστατικά σε στερεή μορφή, τα οποία καλύπτονται από μια υδρόφοβη ένωση, όπως παραφίνη ή φυτικό έλαιο (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2009). Τα πιο γνωστά λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα Customblen, Osmocote, Super IB και Linstar 30. Παρόλα αυτά η χρήση μόνο λιπασμάτων βραδείας αποδέσμευσης δεν αποδίδει αν δεν συνδυαστεί με τη χρήση ανόργανων υδατοδιαλυτών θρεπτικών συστατικών.

### ✓ Ολεοφιλικά θρεπτικά

Μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση στο πρόβλημα της αραίωσης και της έκπλυσης των θρεπτικών συστατικών από τα κύματα και τις παλίρροιες αποτελούν τα ολεοφιλικά θρεπτικά, τα οποία αποτελούνται από ενώσεις που εμμένουν στην ελαιώδη φάση. Επομένως, τα θρεπτικά αυτά συστατικά παραμένουν στη διεπιφάνεια του πετρελαίου με το νερό και ενισχύουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στο σημείο αυτό (Santas και Santas, 2000). Γνωστά ολεοφιλικά θρεπτικά συστατικά που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά της ρύπανσης από πετρελαιοκηλίδες είναι

το Inipol EAP22, το S200 και το F1. Παρόλα τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν, μειονέκτημα αποτελεί το αυξημένο κόστος τους και το γεγονός ότι περιέχουν οργανικό άνθρακα, ο οποίος καθυστερεί την αποδόμηση των υδρογονανθράκων και οδηγεί σε ανεπιθύμητες ανοξικές συνθήκες (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2011).

### **2.5.2 Χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (biosurfactants)**

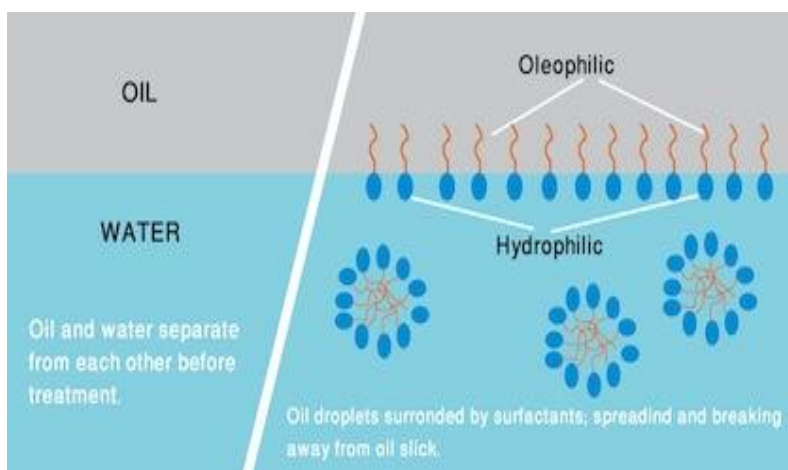
Ένας σημαντικός παράγοντας που ενισχύει τη βιοαποδόμηση του πετρελαίου, εκτός από την προσθήκη θρεπτικών συστατικών που έχουν σαν στόχο τη διάσπαση του πετρελαίου με τη βοήθεια των μικροοργανισμών, είναι η διασπορά του πετρελαίου και η διαθεσιμότητα της διεπιφάνειας της υδάτινης φάσης με το πετρέλαιο που επιτρέπει τη δημιουργία αποικιών.

Η διασπορά αυτή στην υδάτινη φάση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των επιφανειοδραστικών ενώσεων. Επιφανειοδραστικές ονομάζονται οι ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια των συστατικών και είναι ικανές να αυξήσουν την επιφάνεια και να μειώσουν την επιφανειακή τάση στις διεπιφάνειες των υγρών, στερεών και αερίων (Banat, et al., 2000). Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να αναμιχθούν ή να διασκορπιστούν εύκολα ως γαλακτώματα στο νερό ή σε άλλα υγρά. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι συνθετικές, χημικά επιφανειοδραστικά ή βιολογικές, επιφανειοδραστικά βιολογικής προέλευσης. Τα χημικά επιφανειοδραστικά είναι συνήθως τοξικά για το περιβάλλον και μη-βιοδιασπώμενα. Λόγω του ότι οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται πιο αυστηροί και η ανάγκη να προστατευθεί το οικοσύστημα αυξάνεται, η χρήση των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης εδραιώνεται.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφυλες ενώσεις μικροβιακής προέλευσης με ιδιαίτερη δυνατότητα σε εμπορικές εφαρμογές μέσα στις διάφορες βιομηχανίες (Banat, et al., 2000). Οι ενώσεις αυτές είναι μη τοξικές, μη επικίνδυνες, βιοδιασπώμενες και φιλικές προς το περιβάλλον. Ακόμα, μπορούν να παραχθούν επικερδώς υπό *ex situ* συνθήκες, να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν (Moran, et al., 2000).

Όσον αφορά στη μοριακή τους δομή αποτελούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα και/ή υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες, αντιστοίχως και από ένα υδρόφιλο τμήμα αποτελούμενο από μονο-, ολιγο- ή πολυσακχαρίτες, πεπτίδια ή πρωτεΐνες.

Ο ρόλος των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης είναι η προσάρτηση στην επιφάνεια του κυττάρου ώστε να ενισχύσουν την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο πετρέλαιο και έπειτα η έκκριση στο μέσο για να ενισχύσουν τη «ψευδοδιαλυτοποίηση» (Prince, 1993).



**Σχήμα 13:** Διαχωρισμός σταγόνας πετρελαίου από επιφανειοδραστική ένωση (EMEC, 2015).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή των επιφανειοδραστικών αυτών ουσιών σε ρυπασμένες ακτές, έχουν ενισχύσει τη βιοδιαθεσιμότητα των υδρογονανθράκων στο μικροβιακό πληθυσμό. Επίσης, ο συνδυασμός της προσθήκης ανόργανων θρεπτικών με επιφανειοδραστικά έχει επιφέρει θετικά αποτελέσματα κατά τη βιοαποδόμηση (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2008). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση λεκιθίνης που έχει την ιδιότητα της λιπόφιλης πηγής φωσφόρου και παράλληλα επιφανειοδραστικής ένωσης βιολογικής προέλευσης.

### 2.5.3 Πλεονεκτήματα μεθόδου βιοδιέγερσης

Στο προηγούμενο κεφάλαιο συζητήθηκε η έννοια της βιοαποδόμησης, ως μία φυσική μέθοδος αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων, με πολλά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων απομάκρυνσης όσον αφορά στο κόστος και στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, καθώς δεν παράγει επιπλέον απόβλητα και είναι μία φυσική διεργασία.

Σχετικά με τις δύο στρατηγικές αποδόμησης του πετρελαίου, τη βιοδιέγερση και τη βιοενίσχυση, η βιοδιέγερση φαίνεται να υπερτερεί. Αρχικά, στις περισσότερες περιπτώσεις

φαίνεται ότι οι ενδογενείς μικροβιακοί πληθυσμοί είναι ικανοί να αντιμετωπίσουν την ρύπανση του πετρελαίου, χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη μικροβιακού πληθυσμού, η οποία μπορεί να επιφέρει επιπλέον περιβαλλοντική μόλυνση. Οι μικροοργανισμοί που αποδομούν το πετρέλαιο υπάρχουν παντού και γι αυτό η μέθοδος της βιοδιέγερσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες ακτές. Επιπρόσθετα, αρκετές μελέτες σύγκρισης των δύο μηχανισμών βιοαποδόμησης έχουν δείξει ότι η προσθήκη θρεπτικών ουσιών μόνο (βιοδιέγερση), έχει καλύτερη απόδοση από τη προσθήκη μικροβιακών πληθυσμών (βιοενίσχυση). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κατά τη βιοενίσχυση μπορεί να αναπτύσσονται και να αποδίδουν στις συνθήκες του εργαστηρίου, όμως στις εφαρμογές του πεδίου δεν αποδίδουν το ίδιο (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2011).

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοαποδόμησης χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). Το πρωτόκολλο αυτό σχεδιάστηκε με σκοπό να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο, ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοαποδόμησης.

Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου σε διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια σε εξάνιο. Για να ολοκληρωθούν αποτελεσματικά οι στόχοι του πρωτοκόλλου δοκιμής, είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθεί η συγκέντρωση των διάφορων αναλυτών στο πετρέλαιο σε έναν μη-βιοδιασπώμενο δείκτη. Η μέθοδος δοκιμής στοχεύει στην διάσπαση των κανονικών αλκανίων και των ανθεκτικότερων και τοξικότερων PAHs.

Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί έναν αέριο χρωματογράφο/φασματόμετρο μάζας υψηλής ανάλυσης (GC/MS) λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Εκτελείται ταυτόχρονα με τη χημική ανάλυση που περιγράφεται ανωτέρω και μικροβιολογική ανάλυση. Η μικροβιολογική ανάλυση εκτελείται για να καθοριστεί και να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών πληθυσμών με τη χρήση της τεχνικής του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων (MPN) (EPA, 2003).

### **3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τις μικροβιολογικές αναλύσεις ήταν ο εξής: ογκομετρικοί κύλινδροι, απιονισμένο νερό, χαρτί ζύγισης, πιπέτες των 2mL, 10mL και 25mL, pans (από αλουμίνιο), αποστειρωτικός κλίβανος, επωαστικός θάλαμος, ζυγαριά ακριβείας 0.1mg, Bushnell-Haas broth, Microtitier MPN plates (96-well), τριβλία και βαφή INT (p-iodonitrotetrazolium violet dye).

Κατά τη διάρκεια των χημικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια (vials), πιπέτες Pasteur, υαλοβάμβακας, ογκομετρικές φιάλες, διαχωριστικές χοάνες, σφαιρικές φιάλες, vials των 2, 5, 20 και 40 mL, θεικό νάτριο, διχλωρομεθάνιο DCM, (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Suprasolve) και

εξάνιο (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (Suprasolve) της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany). , διάλυμα ανάκτησης (surrogate recovery standard), στήλες SPE (solid phase extraction) και GC/MS όργανο εξοπλισμένο με μια DB-5 τριχοειδή στήλη (30 m, 0.25-mm I.D., και 0.25-μm film thickness).

### **3.2 Επιλογή κατάλληλων αντιδραστηρίων και θρεπτικών**

#### **3.2.1 Δειγματοληψία θαλασσινού νερού**

Στη συγκεκριμένη μελέτη όλα τα δείγματα περιείχαν θαλασσινό νερό, το οποίο συλλέχθηκε από την περιοχή του Αγίου Ονουφρίου στα Χανιά. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η συλλογή του θαλασσινού νερού έγινε από περιοχή που δεν είναι ρυπασμένη από βιομηχανικά ή άλλα είδη αποβλήτων.

#### **3.2.2 Προετοιμασία πετρελαίου**

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα μετρίου βάρους αργό πετρέλαιο (από το Ιράν, ευγενική χορηγία των Ελληνικών Πετρελαίων Α.Ε.). Το αργό πετρέλαιο έχει υποστεί τεχνητή γήρανση με θέρμανση στους 200°C με στόχο να προσομοιώσει τη διεργασία της γήρανσης που υπόκειται το πετρέλαιο όταν εκτεθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος.

#### **3.2.3 Μέσο καλλιέργειας**

##### ***Bushnell Haas Medium (BHM)***

Το BHM χρησιμοποιείται ως μέσο καλλιέργειας κατά τη διαδικασία της δημιουργίας των σειρών αραίωσης κατά την τεχνική των MPN. Παρασκευάστηκε με διάλυση 3.27g Bushnell Haas Broth (HiMedia) σε 1000mL απιονισμένου νερού.

#### **3.2.4 Επιλογή κατάλληλων θρεπτικών συστατικών και επιφανειοδραστικής ένωσης χαμηλού κόστους**

Στόχο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού θρεπτικών συστατικών χαμηλού κόστους που να επιτυγχάνει τη βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η αποτελεσματικότητα του κάθε θρεπτικού συστατικού αξιολογείται με βάση τη μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών του πετρελαίου. Τα θρεπτικά συστατικά θα πρέπει να είναι υλικά χαμηλού κόστους, βιοδιασπώμενα, μη τοξικά για το περιβάλλον και να αυξάνουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του πετρελαίου με τους αποδομητές του.

- **Πηγή αζώτου:**

- **Uric acid**, το οποίο κατατάσσεται στα ολεοφιλικά θρεπτικά, έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στο πετρέλαιο και συνεπώς δίνει την δυνατότητα στους μικροοργανισμούς να μεγαλώνουν στην επιφάνειά του (Koren, et al, 2003). Επιπλέον, έχει καθαρότητα 99% και διατίθεται από την εταιρεία Acros Organics.
- **Basfoliar 36 Extra**, το οποίο ανήκει στις πηγές υδατοδιαλυτών ανόργανων συστατικών, με σύσταση 27-0-0+3MgO+IXN (27% total nitrogen). Διατίθεται από την εταιρεία COMPO GmbH & Co και είναι ένα εμπορικό, μη τοξικό λίπασμα.

- **Πηγή φωσφόρου:**

- **L-a-Lecithin (L-a-Phosphatidylcholine)**, που είναι ολεοφιλικό συστατικό από σογιέλαιο και έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στο πετρέλαιο παρέχοντας έτσι τα θρεπτικά στη διεπιφάνεια νερού-πετρελαίου. Έχει καθαρότητα 97% και διατίθεται από την εταιρεία Acros Organics. Δρα και ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης.
- **Lecithin Bolec Zt**, μια φυσική μορφή λεκιθίνης, η οποία παράγεται από μη γενετικά τροποποιημένη σόγια, είναι φθηνή, μη τοξική και διατίθεται από την εταιρεία Sigma Darby Unimills. Στον πίνακα 5 που ακολουθεί φαίνονται οι προσμίξεις και οι ιδιότητες της συγκεκριμένης εμπορικής λεκιθίνης. Δρα και ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης.

- **Επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης:**

- **Oil Begone Bio**, της εταιρείας Biobased Europe Ltd. Η ένωση αυτή είναι βιοδιασπώμενη, έχει πολύ μικρή επίδραση στο περιβάλλον, χαμηλή τοξικότητα και τέλος παρουσιάζει ιδιότητες γαλακτωματοποιητή.

Τα θρεπτικά συστατικά προστέθηκαν σε τέτοια ποσότητα, ώστε η τελική τους συγκέντρωση **C:N:P** να είναι ισοδύναμη γραμμομοριακά με **100:10:1**.

**Πίνακας 5:** Προσμίξεις και ιδιότητες της λεκιθίνης Bolec Zt.

Περιγραφή	Min	Max	Μονάδες	Περιγραφή	Min	Max	Μονάδες
Arsenic (As)	<	3	mg/kg	Dioxin WHO-TEQ	<	0.75	µg/kg
Cadmium (Cd)	<	1	mg/kg	Peroxide Value		5	meq/kg
Lead (Pb)	<	2	mg/kg	Colour Iodine		65	
Mercury (Hg)	<	1	mg/kg	Viscosity (25°C)		12.5	Pa·s
Zinc (Zn)	<	25	mg/kg	Toluene Insoluble matter		0.3	%
Copper (Cu)	<	3.5	mg/kg	Total Viable Count	<	1000	cfu/g
Iron (Fe)	<	100	mg/kg	Yeasts	<	100	cfu/g
Aflatoxin B1	<	2	µg/kg	Moulds	<	100	cfu/g
Aflatoxin B1+G2+G1	<	4	µg/kg	Lipolytic Bacteria	<	100	cfu/g
				Enterobacteriaceae	<	10	cfu/g

**Πίνακας 6:** Μέσα βιοαποδόμησης που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Μέσο	Εταιρεία	Κόστος
<b>1<sup>ος</sup> Πειραματικός Σχεδιασμός</b>		
Uric acid	Acros Organics	767.70 €/kg
Basfoliar 36 Extra *	COMPO GmbH & Co	5 €/L
Lecithin Bolec Zt *	Sime Darby Unimills	1.9 €/kg
Oil Begone Bio *	Biobased Europe Ltd	7.5 €/L
<b>2<sup>ος</sup> Πειραματικός Σχεδιασμός</b>		
Uric acid	Acros Organics	767.70 €/kg
L-a-Lecithin	Acros Organics	153.30 €/kg
Lecithin Bolec Zt *	Sime Darby Unimills	1.9 €/kg

\*Μέσο χαμηλού κόστους.

### 3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Η δομή του πειράματος αποτελείται από μια διάταξη φιαλών που τοποθετούνται στον επωαστήρα (σχήμα 15), δηλαδή μια διάταξη που περιλαμβάνει έναν αναδευτήρα σε ελεγχόμενες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και προσομοιάζει συνθήκες batch αντιδραστήρα. Η ανάδευση επιτυγχάνει την ύπαρξη οξυγόνου στα δείγματα, η πίεση είναι ίση με την ατμοσφαιρική και η θερμοκρασία ρυθμίζεται για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 20°C. Οι συνθήκες αυτές προσομοιάζουν τις συνθήκες περιβάλλοντος.



**Σχήμα 14:** Απεικόνιση επωαστήρα.

Κατά την προετοιμασία των πειραμάτων τα φιαλίδια καθαρίζονται και αποστειρώνονται σε κλίβανο και στην συνέχεια σε UV ακτινοβολία, όπως και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά το στήσιμο της πειραματικής διάταξης. Οι φιάλες ονομάζονται με την κατάλληλη κωδική ονομασία, η οποία φανερώνει την ημέρα της δειγματοληψίας και τα συστατικά που περιέχονται σε αυτές. Να σημειωθεί, ακόμα, ότι όλους τους πειραματικούς σχεδιασμούς περιλαμβάνουν μια δοκιμή «Control», η οποία χρησιμεύει ως έλεγχος των πειραματικών δοκιμών και στην οποία δεν προστέθηκε κανένα θρεπτικό συστατικό ή επιφανειοδραστική ένωση, παρά μόνο το θαλασσινό νερό και το πετρέλαιο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικούς σχεδιασμούς:

✓ **1<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός**

***Συστατικά πειραματικής διάταξης***

Σε αυτήν την πειραματική δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες των συστατικών:

**Πίνακας 7:** Ποσότητες των συστατικών στον 1<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό.

Συστατικό	Ποσότητα
Θαλασσινό νερό	20 mL
Αργό πετρέλαιο	115 µL
Uric acid	100 µL
Lecithin Bolec Zt	60 µL
Basfoliar 36 Extra	27.5 µL
Oil Begone Bio	50 µL

Οι ποσότητες αυτές ανάλογα με τους συνδυασμούς που έγιναν πήραν τις εξής ονομασίες:

**Πίνακας 8:** 1<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.

Δοκιμή	Θαλασσινό νερό	Αργό πετρέλαιο	Lecithin Bolec Zt	Uric acid	Basfoliar 36 Extra	Oil Begone Bio
<b>Control</b>	✓	✓				
<b>UL*</b>	✓	✓	✓	✓		
<b>ULB**</b>	✓	✓	✓	✓		✓
<b>B36L***</b>	✓	✓	✓		✓	

**\*UL:** Uric acid, Lecithin Bolec Zt, **\*\* ULB:** Uric acid, Lecithin Bolec Zt, Oil Begone Bio,

**\*\*\* B36L:** Basfoliar 36 Extra, Lecithin Bolec Zt.

### *Στόχος 1<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού*

Στόχο του 1<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί η μελέτη της βιοδιέγερσης, ως μέσο βιοαποδόμησης του αργού πετρελαίου, με μέσα χαμηλού κόστους. Επιπρόσθετα, ζητούμενο αποτελεί η σύγκριση των ποσοστών και των ρυθμών βιοαποδόμησης μεταξύ των δειγμάτων με την διαφορετική πηγή αζώτου, το λίπασμα χαμηλού κόστους Basfoliar 36 Extra και το ουρικό οξύ, καθώς και η σύγκριση των ποσοστών και των ρυθμών βιοαποδόμησης μεταξύ αυτών που

περιλαμβάνουν ή όχι την ύπαρξη της επιφανειοδραστικής ένωσης Oil Begone Bio. Η παρακολούθηση του πειράματος της βιοδιέγερσης έγινε για 0, 7, 14, 21, 28 ημέρες.

Στη συγκεκριμένη διάταξη, αρχικά, προστίθεται στο φιαλίδιο το θαλασσινό νερό. Έπειτα, τοποθετείται το αποστειρωμένο αργό πετρέλαιο με προσοχή ώστε να σχηματιστεί κηλίδα στο κέντρο της φιάλης. Τέλος, προστίθενται η αποστειρωμένη λεκιθίνη, το ουρικό οξύ, το υγρό λίπασμα Basfoliar 36 extra και το Oil Begone Bio στα αντίστοιχα φιαλίδια ανάλογα με τη δοκιμή.

#### ✓ 2<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός

##### *Συστατικά πειραματικής διάταξης*

Σε αυτήν την πειραματική δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες των συστατικών:

**Πίνακας 9:** Ποσότητες των συστατικών στο 2<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό:

Συστατικό	Ποσότητα
Θαλασσινό νερό	20 mL
Αργό πετρέλαιο	115 µL
Uric acid	30 mg
Lecithin Bolec Zt	60 µL
L-a-Lecithin	47 mg

Οι ποσότητες αυτές ανάλογα με τους συνδυασμούς που έγιναν πήραν τις εξής ονομασίες:

**Πίνακας 10:** 2<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.

Δοκιμή	Θαλασσινό νερό	Αργό πετρέλαιο	Uric Acid	Lecithin Bolec Zt	L-a-Lecithin (97% purity)
Control	✓	✓			
UL1*	✓	✓	✓		✓
UL2**	✓	✓	✓	✓	

\*UL1: Uric acid, Lecithin (L-a-Lecithin-97% purity), \*\* UL2: Uric acid, Lecithin Bolec Zt.

### *Στόχος 2<sup>ος</sup> πειραματικού σχεδιασμού*

Στόχο του 2<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί η μελέτη της βιοδιέγερσης, ως μέσο βιοαποδόμησης του αργού πετρελαίου, με τη χρήση της λεκιθίνης Bolec Zt, χαμηλού κόστους και την L-a-Lecithin με καθαρότητα 97%, υψηλού κόστους. Επιπρόσθετα, ζητούμενο αποτελεί η σύγκριση των ποσοστών και των ρυθμών βιοαποδόμησης μεταξύ των δειγμάτων αυτών. Η παρακολούθηση του πειράματος της βιοδιέγερσης έγινε για 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες.

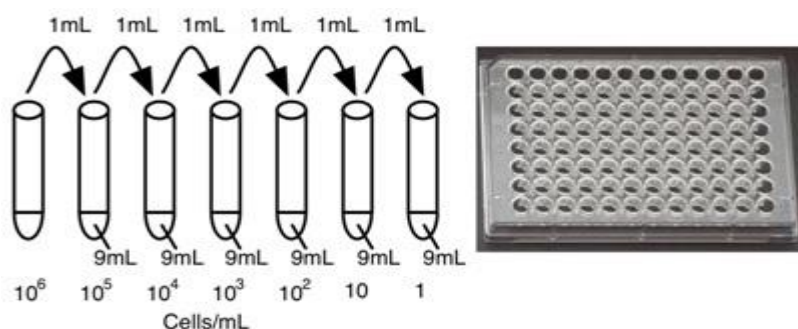
Στη συγκεκριμένη διάταξη, αρχικά, προστίθεται στο φιαλίδιο το θαλασσινό νερό. Έπειτα, τοποθετείται το αποστειρωμένο αργό πετρέλαιο με προσοχή ώστε να σχηματιστεί κηλίδα στο κέντρο της φιάλης. Τέλος, προστίθεται η αποστειρωμένη λεκιθίνη και το ουρικό οξύ στα αντίστοιχα φιαλίδια.

## **3.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις**

### **3.4.1 Τεχνική του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων (Most Probable Number, MPN)**

Ο αριθμός των αποδομητών των υδρογονανθράκων πετρελαίου στα φιαλίδια εκτιμήθηκε με την μέθοδο του πιο πιθανού αριθμού (MPN). Το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Bushnell-Haas. Αρχικά, χρησιμοποιούνται αποστειρωμένοι σωλήνες αραιώσεις που περιέχουν 9mL αποστειρωμένου θρεπτικού Bushnell-Haas. Από κάθε δείγμα των πειραματικών διατάξεων

αφαιρείται 1mL και αναμειγνύεται με τα 9mL θρεπτικού. Στη συνέχεια εκτελούνται τμηματικές αραιώσεις με στόχο την αραιώση 1:10 για κάθε δείγμα όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 15.



**Σχήμα 15:** Δέκα διαδοχικές αραιώσεις και πλάκες καλλιέργειας με 96 πηγαδάκια της μεθόδου MPN.

Στη συνέχεια, σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται 180μL Bushnell-Haas και 5μL αργού πετρελαίου. Έπειτα 20μL δείγματος από κάθε αραιώση προστίθενται στο αντίστοιχο πηγαδάκι. Τα δύο τελευταία πηγαδάκια από κάθε στήλη λειτουργούν σαν έλεγχος της μεθόδου. Έπειτα, τα πλακίδια επωάζονται στους 20°C για 15 ημέρες. Μετά το πέρας αυτών των ημερών προστίθενται 50μL p-iodotetrazolium violet dye (3g/L απιονισμένου νερού). Μετά από μία μέρα επώασης προσδιορίζεται η αλλαγή χρώματος στα πηγαδάκια. Η εμφάνιση κόκκινου ή ροζ χρώματος πιστοποιεί θετική ένδειξη, η οποία καταγράφεται (Wrenn and Venosa, 1996). Τα δεδομένα αυτά εισάγονται στο πρόγραμμα “MPN Calculator” software program του EPA Risk Reduction Engineering Laboratory και εξάγονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των μικροοργανισμών (cells/mL).

### 3.5 Χημικές αναλύσεις

#### 3.5.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid extraction-LLE)-Ανάκτηση πετρελαίου

Μετά από τις 0, 7, 14, 21, 28 και/ή 56 ημέρες επώασης στον αναδευτήρα, 1mL δείγματος της υδατικής φάσης αφαιρείται από τα φιαλίδια για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα πρότυπο διάλυμα ανάκτησης (surrogate recovery standard) στο περιεχόμενο των φιαλιδίων, που περιέχει το μίγμα

του θαλασσινού νερού, του πετρελαίου, των θρεπτικών (ουρικό οξύ, λεκιθίνη) και/ή της επιφανειοδραστικής ένωσης. Το surrogate είναι ένα διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (d10-φαινανθρένιο και 5 $\alpha$ -androstone), με τη χρήση του οποίου υπολογίζεται ο βαθμός αποτελεσματικότητας της εκχύλισης.

Πιο αναλυτικά, αρχικά, ετοιμάζεται το πρότυπο διάλυμα ανάκτησης, surrogate, συγκέντρωσης 200ppm. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 50μL surrogate πριν από κάθε εκχύλιση. Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη των 100mL. Στη συνέχεια, μετράται ένας συνολικός όγκος 50mL DCM για να χρησιμοποιηθεί για την κάθε εκχύλιση. Αυτός χωρίζεται σε δύο μέρη των 25mL έτσι ώστε να ξεπλυθεί καλά η φιάλη και να μεταφερθεί στην διαχωριστική χοάνη όσο το δυνατόν όλο το περιεχόμενο της φιάλης. Το περιεχόμενο της χοάνης αναδεύεται και στη συνέχεια αφήνεται για 5-10 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι δύο φάσεις. Παράλληλα, ενεργοποιείται το θεϊκό νάτριο στους 400°C για 4 ώρες και έπειτα τοποθετείται στη στήλη μαζί με υαλοβάμβακα και εγκλιματίζεται με DCM. Το διάλυμα DCM διαβιβάζεται μέσω της στήλης με το άνυδρο θεϊκό νάτριο στη σφαιρική φιάλη. Το μίγμα πετρελαίου και DCM που συλλέγεται, μεταφέρεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα όπου επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του διαλύτη, DCM. Τέλος, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού για 24 ώρες και η καθαρή ποσότητα πετρελαίου που ανακτάται, μεταφέρεται σε μικρότερο φιαλίδιο. Στη συνέχεια, η ποσότητα αυτή ζυγίζεται με στόχο να βρεθεί η ποσότητα του πετρελαίου που ανακτήθηκε. Στο σχήμα 16 που ακολουθεί παρουσιάζεται η διάταξη της εκχύλισης υγρού-υγρού.



**Σχήμα 16:** Διαδικασία εκχύλισης υγρού-υγρού-LLE.

### 3.5.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase extraction-SPE)-Κλασματοποίηση πετρελαίου

Η ποσότητα του πετρελαίου που ανακτήθηκε, υποβάλλεται σε εκχύλιση στερεάς φάσης, SPE, με στόχο τον διαχωρισμό του πετρελαίου σε κορεσμένα και αρωματικά κλάσματα. Ποσότητα 5-10mg του πετρελαίου για κάθε δείγμα διαλύεται σε 1mL εξάνιο και εισάγεται στην κορυφή της στήλης της SPE (Supelco). Τα κορεσμένα συστατικά του δείγματος (F1) εκκλύονται με τη βοήθεια 4mL εξανίου, ενώ τα αρωματικά (F2) με τη βοήθεια 4mL DCM. Η διάταξη της SPE όπως και της εκχύλισης LLE βρίσκονται μέσα σε απαγωγό για την αποφυγή της εξάτμισης των διαλυτών στο χώρο του εργαστηρίου. Έπειτα, η συσκευή ξεπλένεται με τον τελευταίο διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Οι διαλύτες που βρίσκονται στα διαλύματα F1 και F2 απομακρύνονται με την βοήθεια της ροής αζώτου. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων ζυγίζεται και τοποθετείται σε μικρότερα φιαλίδια για να περάσει στην επόμενη φάση, την ανάλυση GC-MS.



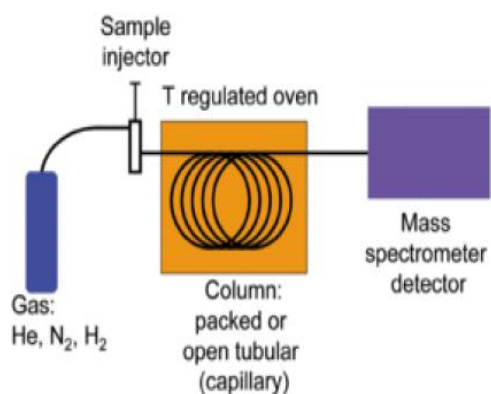
**Σχήμα 17:** Διαδικασία Εκχύλισης Στερεάς Φάσης-SPE.

### 3.5.3 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ανάλυσης προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των διαφορετικών συστατικών του πετρελαίου για κάθε δείγμα που αναλύεται, ώστε να τεκμηριωθεί η αποδόμηση του πετρελαίου. Το όργανο GC-MS αποτελείται από τον αέριο χρωματογράφο (GC) και τον φασματογράφο μάζας (MS). Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται για να πετύχουμε το

διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος πριν αυτά εισέλθουν στον φασματογράφο μάζας. Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και ο φασματογράφος μάζας για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίησή τους.

Στην παρούσα μελέτη, τα συστατικά ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους χρόνους συγκράτησης και τα φάσματα μαζών. Πιο αναλυτικά, οι ενώσεις εισάγονται στον εισαγωγέα (injector) και διασπώνται σε ηλεκτρικά φορτισμένα μέρη, ιόντα. Η πορεία διάσπασης κάθε μιας ένωσης εξαρτάται από τη χημική της δομή και παρέχει ένα και μοναδικό αποτύπωμα (ίχνος) που είναι χαρακτηριστικό γι' αυτήν (mass-to-charge ratio,  $m/z$ 's) (Sahil, et al., 2011).



**Σχήμα 18:** Εσωτερική διάταξη οργάνου GC-MS (Sahil. Et al., 2011).



**Σχήμα 19:** Απεικόνιση οργάνου GC-MS.

Κατά την πορεία της πειραματικής διαδικασίας και της ανάλυσης στο GC-MS, προστίθεται στα δείγματα ένα πρότυπο εσωτερικό διάλυμα (internal standard) που αποτελείται από τέσσερις δευτεριωμένες ενώσεις: naphthalene-d8, φαινανθρένιο-d10, χρυσένιο-d12 και perylene-d12. Η τελική συγκέντρωση του πρότυπου εσωτερικού διαλύματος που προστίθεται σε κάθε δείγμα ακριβώς πριν από είσοδο στο GC-MS είναι 1 ppm. Τα κλάσματα F1 και F2, αφού διαλυθούν εκ νέου σε 1mL εξάνιο και 1mL DCM, αντίστοιχα, εισάγονται στο μηχάνημα GC-MS με τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη Agilent 7693A Automatic Liquid Sampler (σχήμα 19). Το μηχάνημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Agilent HP 7890/5975 GC-MS, με χρωματογραφική στήλη HP-5.5% phenal methyl siloxane και χαρακτηριστικά 30m x 250μm x 0.25μm σε SIM scan mode (50-500 m/z). Η θερμοκρασία εκκίνησης της διάταξης ήταν 60°C και ο ρυθμός ανόδου 6 °C/min μέχρι τους 300 °C. Η θερμοκρασία της γραμμής σύνδεσης του χρωματογράφου με τον φασματογράφο ήταν 280°C, η θερμοκρασία πηγής ιόντων 230°C και η θερμοκρασία του τετράπολου 150°C. Η ανάλυση έγινε σε SIM scan mode για την περιοχή μαζών 50-500amu.

Ένα τυφλό δείγμα του οργάνου και ορισμένα πρότυπα αναλύονται πριν από την ανάλυση των αγνώστων αναλυτών. Τα εσωτερικά πρότυπα συνδυάζονται με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων και εγχύονται μαζί σε κάθε ανάλυση, ώστε να ελεγχθεί η απόδοση του οργάνου κατά τη διάρκεια κάθε σειράς αναλύσεων. Έπειτα, αναγνωρίζονται οι αναλυτές/συστατικά του πετρελαίου βασιζόμενοι στο πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν του κάθε αναλυτή (πίνακας 11). Για κάθε συστατικό του δείγματος υπολογίζεται ο σχετικός συντελεστής απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο στο οποίο αντιστοιχεί. Τέλος, επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση του κάθε αναλυτή, χρησιμοποιώντας τους συντελεστές που υπολογίστηκαν κατά τη βαθμονόμηση.

**Πίνακας 11:** Ιόντα για τον κάθε αναλυτή στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS.

Συστατικό	Ιόν	Συστατικό	Ιόν
n-alkanes (C <sub>10</sub> -C <sub>35</sub> )	85	C3-φλουορένιος	208
Πριστάνιο	85	C2-φαινανθρένιος	206
Φυτάνιο	85	C2-διβενζοθειοφαίνιος	212
Naphthalene	128	C1-πυρένιος	216
d <sub>8</sub> -naphthalene	136	C3-διβενζοθειοφαίνιος	226
C1-naphthalenes	142	Χρυσένιο	228
C2-naphthalenes	156	C3-φαινανθρένιος	220
Φλουορένιο	166	C2-πυρένιος	230
C3-naphthalenes	170	d <sub>12</sub> -χρυσένιο	240
Φαινανθρένιο	178	C1-χρυσένιος	242
Anthracene	178	Benzo(e)πυρένιο	252
C1-φλουορένιος	180	Benzo(a)πυρένιο	252
C4-naphthalenes	184	Perylene	252
Διβενζοθειοφαίνιος	184	a-androstane	260
d <sub>10</sub> -anthracene	188	C2-χρυσένιος	256
d <sub>10</sub> -φαινανθρένιο	188	d <sub>12</sub> -perylene	264
C1-φαινανθρένιος	192	Benzo(1,2,3-cd)perylene	276
C2-φλουορένιος	194	Ideno(g,h,i)πυρένιο	276
C1-διβενζοθειοφαίνιος	198	Dibenzo(a,h)anthracene	278
Fluoranthene/πυρένιο	202	Benzo(1,2,3-cd)perylene	276

Επιπρόσθετα, για να διασφαλιστεί ότι η μείωση των αναλυτών προκαλείται από τη βιοαποδόμηση και όχι από φυσική απώλεια λόγω αστοχίας του οργάνου, οι συγκεντρώσεις των αναλυτών διορθώνονται με βάση τον βιοδείκτη 17α(H), 21β(H) C<sub>30</sub>-hopane που αποτελεί φυσικό συστατικό του πετρελαίου (Prince, et al., 2003). Γι' αυτόν τον λόγο το ποσοστό της αποδόμησης των αναλυτών του GC-MS δίνεται από την εξίσωση:

$$\% \text{ Αποδόμηση} = \frac{A_0/H_0 - A_s/H_s}{A_0/H_0} \times 100\% \quad (1)$$

Όπου  $A_S$  και  $H_S$  είναι οι συγκεντρώσεις των αναλυτών και του βιοδείκτη 17α(H), 21β(H) C<sub>30</sub>-hopane, αντίστοιχα στα αναλυμένα δείγματα πετρελαίου, και  $A_0$  και  $H_0$  οι αρχικές συγκεντρώσεις αυτών (δηλαδή οι συγκεντρώσεις της πρώτης ημέρας που διεξήχθη το πείραμα) (Prince, et al., 2003).

### 3.6 Κινητική βιοαποδόμησης

Με βάση τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών και χημικών αναλύσεων υπολογίζεται ο ρυθμός αποδόμησης των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο ρυθμός αυτός εξαρτάται από τη συγκέντρωση της βιομάζας και τον ειδικό ρυθμό αποδόμησης (Englezos and Kalogerakis, 2001). Είναι σημαντικό να μελετηθεί κατά πόσο η αυξημένη αποδόμηση της κάθε ένωσης του πετρελαίου οφείλεται στην αύξηση της βιομάζας ή του ειδικού ρυθμού αποδόμησης, καθώς υποδηλώνει διαφορετική μεταβολική οδό κατά την αποδόμηση. Έτσι, υπολογίστηκε η κινητική αποδόμησης αντιπροσωπευτικών ενώσεων αλκανίων και PAHs των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας την προσέγγιση «integral approach».

#### *Για τα πειράματα σε συνθήκες αντιδραστήρα τύπου batch*

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $\mu$ , δίνεται με την ακόλουθη έκφραση:

$$r_x = dX/dt = \mu \cdot X \quad (2)$$

Όπου  $X$  (cells/mL) είναι η συγκέντρωση της βιομάζας όπως αυτή προέκυψε από τις μικροβιακές αναλύσεις και  $\mu$  ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.

Ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , δίνεται με την ακόλουθη έκφραση:

$$r_s = dS/dt = - q_s \cdot X \quad (3)$$

Όπου  $S \left( \frac{\text{ng compound /mg oil}}{\text{mL}} \right)$  είναι η ποσότητα της αποδομημένης ένωσης (n-αλκάνια ή PAHs) και  $q_s \left( \frac{\frac{\text{ng compound /mg oil}}{\text{mL}}}{\frac{\text{cells}}{\text{mL}} \cdot \text{h}} \right)$  ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης (Englezos and Kalogerakis, 2001).

## Integral approach

Εξαιρώντας την φάση υστέρησης (lag phase), ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $\mu$ , εκτιμάται από το διάστημα της καμπύλης, όπου υπήρξε η φάση της εκθετικής αύξησης. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $\mu$ , υπολογίστηκε κατά την περίοδο του χρόνου όπου παρατηρείται η φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Για την αξιολόγηση του ειδικού ρυθμού αποδόμησης,  $q_s$ , υπολογίζεται το ολοκλήρωμα για χρόνο από 0 έως  $t_i$ :

$$S_{t_i} - S_0 = -\overline{q_s} \cdot \int_0^{t_i} X_v(t) dt \quad (4)$$

Το ολοκλήρωμα της σχέσης (4) υπολογίζεται αριθμητικά με τον «κανόνα του τραpezιού» από το διάγραμμα των πειραματικών δεδομένων,  $X$ , συναρτήσεως του χρόνου. Ο ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , για κάθε ένωση μπορεί να ληφθεί ως ο ρυθμός αποδόμησης της χρονικής περιόδου κατά την οποία παρατηρήθηκε η βιοαποδόμηση στην προς μελέτη ένωση (Englezos and Kalogerakis, 2001).

## 3.7 Χαρακτηρισμός βιοφίλμ- Μικροσκοπία Ομοεστιακής Δέσμης Λέιζερ (CLSM)

### Βιοφίλμ

Βιοφίλμ, κατά IUPAC, ορίζεται ως το συσσωμάτωμα των μικροοργανισμών στο οποίο τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε μια μήτρα-καλούπι από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPS) που παράγουν τα ίδια και προσκολλώνται σε μία επιφάνεια (Vert, et al., 2012). Επιπλέον, παρατηρείται όταν τα βακτήρια προσκολλώνται σε επιφάνειες σε υδάτινο περιβάλλον και ξεκινούν να παράγουν EPS. Τα EPS που αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, πολυουρονικά οξέα, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια, μοιάζουν με βλέννα και συγκρατούν τα

κύτταρα στο υπόστρωμα (Petrova και Sauer, 2012). Το βιοφίλμ μπορεί να δημιουργηθεί από ένα και μόνο βακτήριο, αλλά πολύ συχνά τα biofilm αποτελούνται από διαφορετικά βακτήρια καθώς επίσης και από μύκητες, άλγη, πρωτόζωα, κυτταρικά υπολείμματα, ακαθαρσίες και προϊόντα διάβρωσης (σκούριασμα) (Καλογεράκης, 2010).

### ***Μικροσκοπία Ομοεστιακής Δέσμης Λείζερ ή Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)***

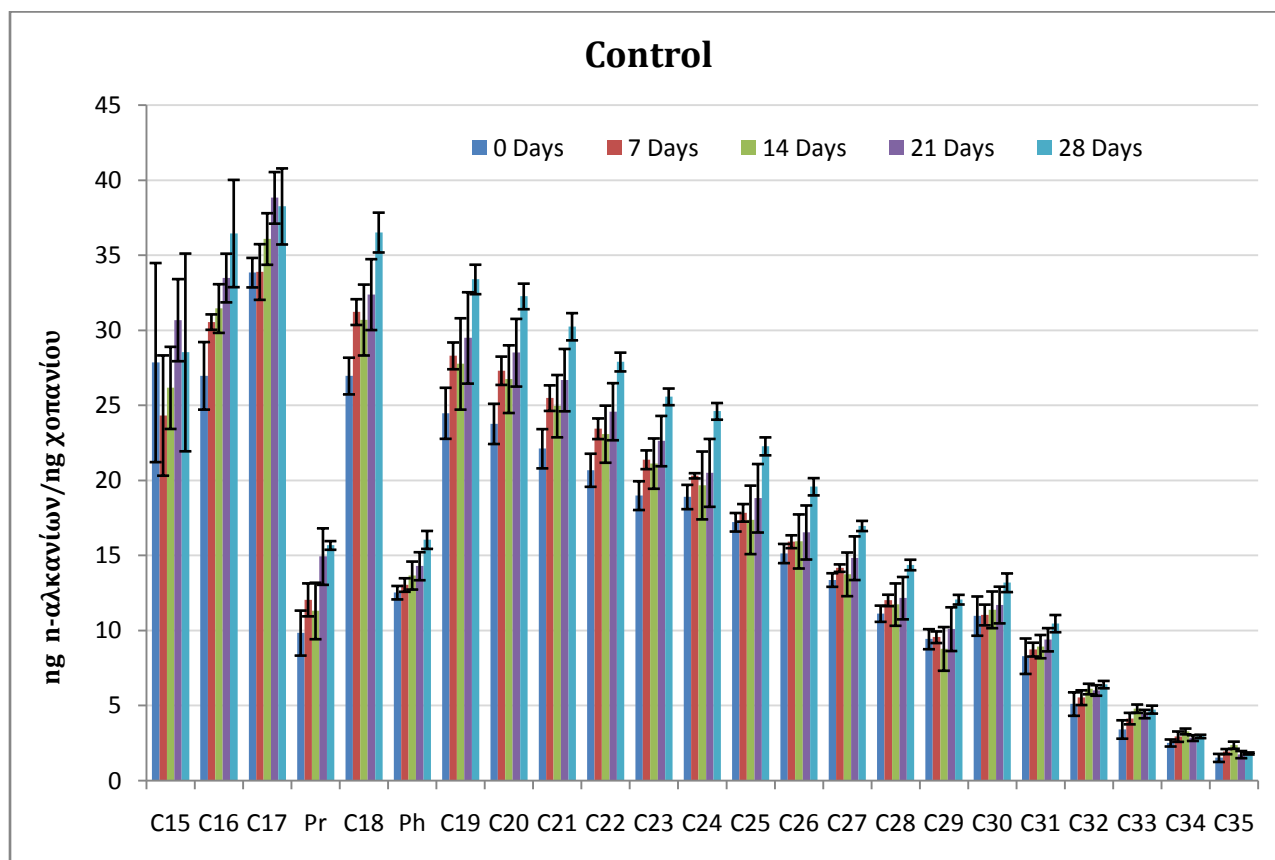
Η μικροσκοπία παίζει πρωταρχικό ρόλο στην κατανόηση οποιασδήποτε βιολογικής διεργασίας, καθώς είναι και το βασικό εργαλείο για την αξιολόγηση ζωντανών μικροβιακών πληθυσμών και βιοφίλμ. Πιο συγκεκριμένα, η μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης λείζερ (CSLM) παρέχει απεικονήσεις στις τρεις διαστάσεις (3D) καθώς και πληροφορίες για τη δομή του βιοφίλμ και των συστατικών που περιέχονται σε αυτό. Ο προσδιορισμός των συστατικών αυτών επιτυγχάνεται είτε με τη βοήθεια του αυτοφθορισμού είτε με τη χρήση ειδικών βαφών για το βακτηριακό DNA ή EPS (Denkhaus, et al., 2006).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο πολυφωτονικού φθορισμού, μοντέλο LSM 710 NLO DUO, της εταιρείας Zeiss και η βαφή που χρησιμοποιήθηκε κατά την προεργασία των δειγμάτων ήταν η Syto13. Η συγκεκριμένη βαφή έχει την ιδιότητα να χρωματίζει πράσινα τα στελέχη των βακτηρίων με στόχο την παρακολούθησή τους στο μικροσκόπιο. Τέλος, οι ιδιότητες του μικροσκοπίου ρυθμίστηκαν, ώστε να αποφευχθεί ο αυτοφθορισμός του πετρελαίου.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα 1<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού

#### 4.1.1 Δοκιμή Control

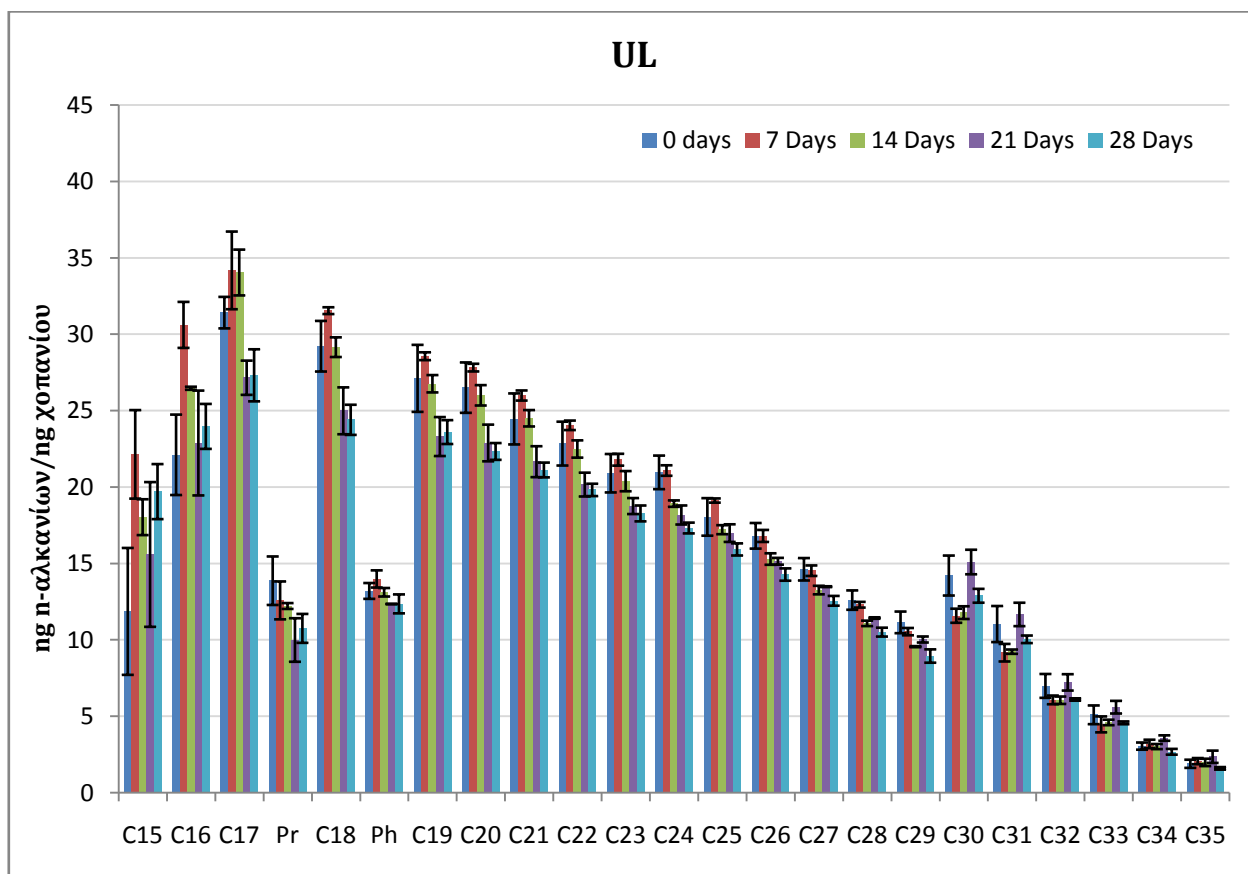


**Σχήμα 20 :** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή Control.

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 20, η δοκιμή ελέγχου “Control” παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν αποδομητές υδρογονανθράκων. Επιπρόσθετα, η απουσία θρεπτικών υλικών καθιστά ανέκγονους τους ενδογενείς αποδομητές υδρογονανθράκων να αντεπεξέλθουν στα μεγάλα φορτία οργανικού άνθρακα. Τέλος, παρατηρείται μια αυξητική τάση στη συγκέντρωση των n-αλκανίων στις 28

ημέρες, η οποία δεν εξηγείται βιβλιογραφικά και θεωρείται αποτέλεσμα σφάλματος κατά τη διαδικασία της χημικής ανάλυσης. Η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα εξάλλου δείχνει το εύρος των πειραματικών αποτελεσμάτων και προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

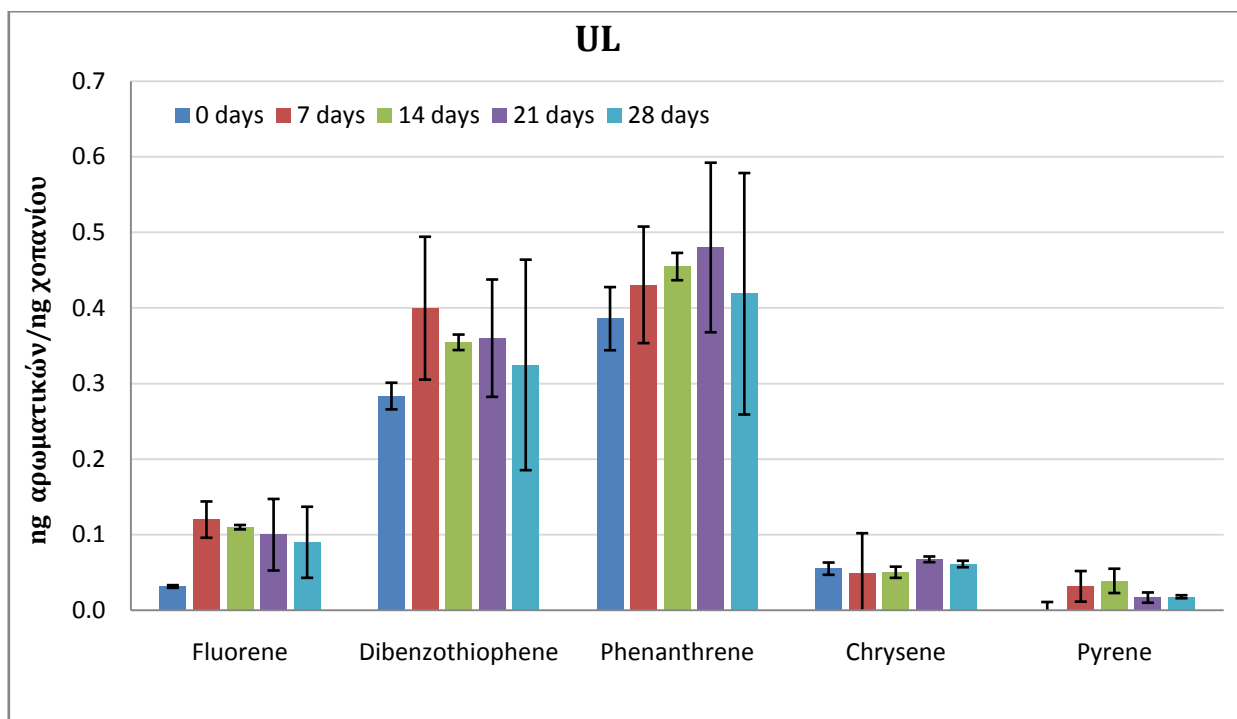
#### 4.1.2 Δοκιμή UL (Uric acid, Lecithin Bolec Zt)



**Σχήμα 21:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL.

Στο σχήμα 21 παρατηρούνται οι συγκεντρώσεις των n-αλκανίων μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης. Στη συγκεκριμένη δοκιμή παρατηρείται μείωση των υδρογονανθράκων στις 14 ημέρες παρακολούθησης για τα n-αλκάνια μεσαίας αλυσίδας (C<sub>15</sub>-C<sub>29</sub>). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση στα n-αλκάνια μακριάς αλυσίδας (C<sub>30</sub>-C<sub>35</sub>), τα οποία όπως επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία παρουσιάζουν αντίσταση κατά τη

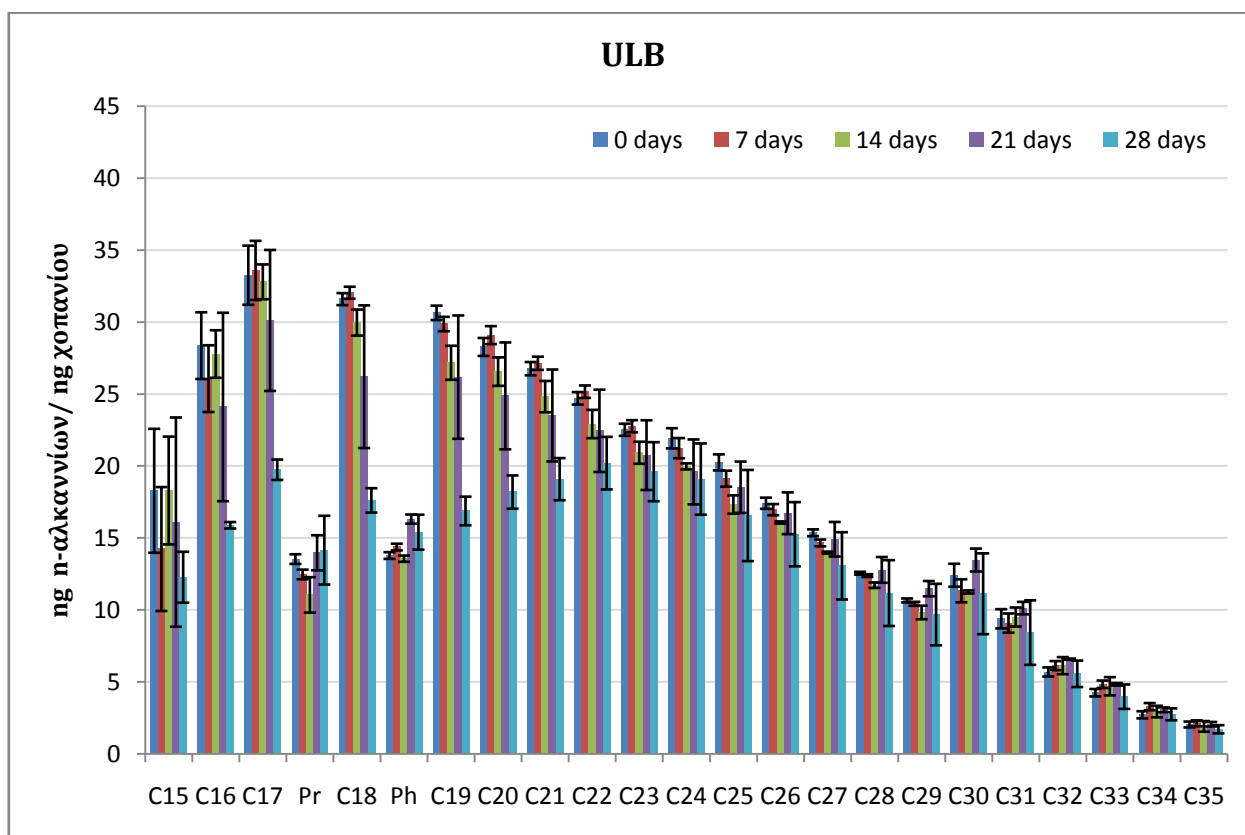
μικροβιακή αποδόμηση (Saadoun, et al., 2002). Επίσης, στο γεγονός αυτό ενδέχεται να συμβάλει και το χρονικό εύρος μελέτης της βιοδιέγερσης, καθώς φαίνεται ότι η διάσπαση αυτών των ενώσεων δεν προλαβαίνει να ξεκινήσει. Τέλος, η διακύμανση της συγκέντρωσης του C<sub>15</sub> σε σχέση με το χρόνο παρακολούθησης στο σχήμα 21, ενδεχομένως να οφείλεται στην ευαισθησία του αναλυτή GC-MS, καθώς η ένωση C<sub>15</sub> είναι το ελαφρύτερο κλάσμα πετρελαίου.



**Σχήμα 22:** Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητινών και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL.

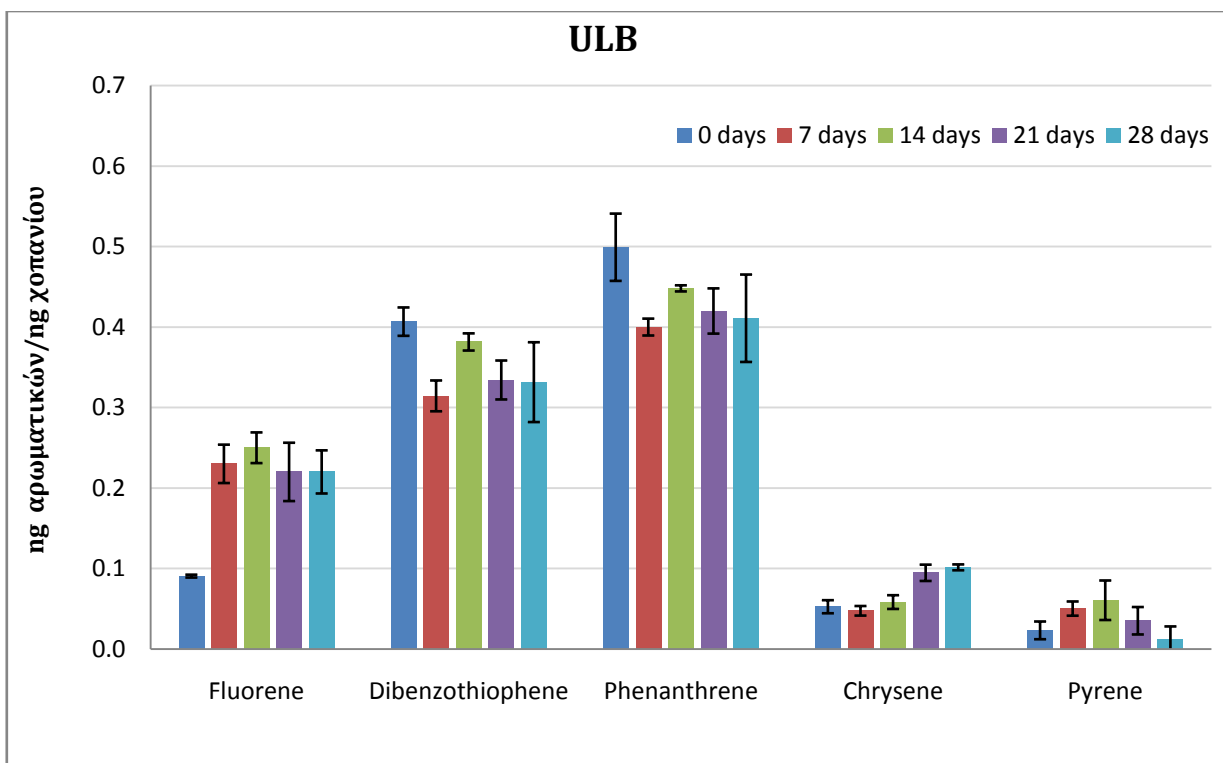
Όπως παρατηρείται στο σχήμα 22, οι συγκεντρώσεις των επιλεγμένων αρωματικών ενώσεων και ρητινών, Φλουορένιο, Διβενζοθειοφαίνιο, Φαινανθρένιο, Χρυσένιο και Πυρένιο, παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Το γεγονός αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται στη δυσκολία των μικροβιακών αποδομητών να αποδομήσουν τα διακλαδισμένα n-αλκάνια. Τέλος, η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα δείχνει το εύρος των πειραματικών αποτελεσμάτων που προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.1.3 Δοκιμή ULB (Uric acid, Lecithin Bolec Zt, Oil Begone Bio)



**Σχήμα 23:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή ULB.

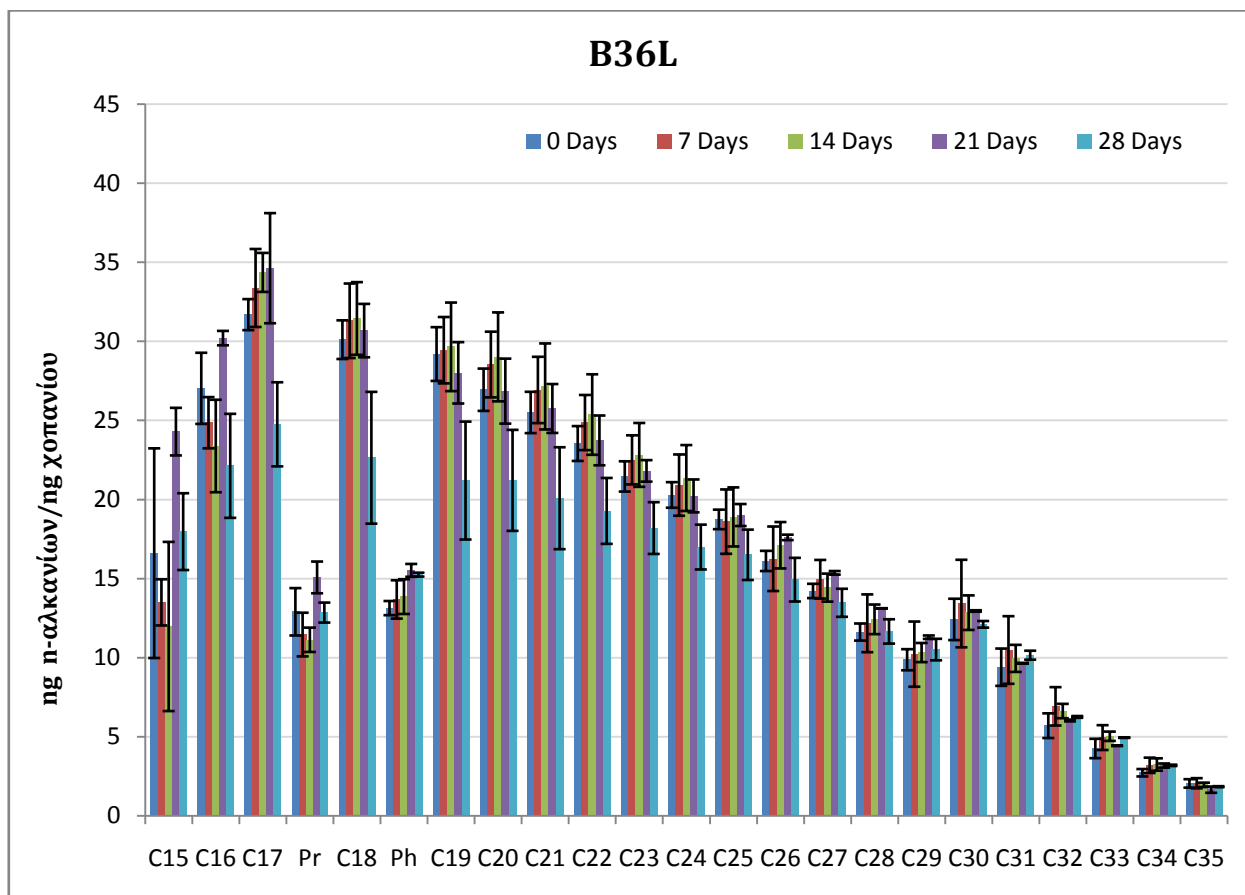
Στο σχήμα 23 παρατηρείται ότι η αποδόμηση των υδρογονανθράκων για τη δοκιμή ULB ξεκινά μετά από 14 ημέρες παρακολούθησης. Επίσης, οι υδρογονάνθρακες C<sub>15</sub>-C<sub>29</sub> υπόκεινται σε αλλαγές της συγκέντρωσής τους, αντίθετα με τα n-αλκάνια μακριάς αλυσίδας C<sub>30</sub>-C<sub>35</sub>, στα οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Τέλος, η διακύμανση των συγκεντρώσεων των C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, Πριστάνιο και Φυτάνιο σε σχέση με το χρόνο παρακολούθησης στο σχήμα 23, ενδεχομένως να οφείλεται στην ευαισθησία του αναλυτή GC-MS.



**Σχήμα 24:** Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητινών και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή ULB.

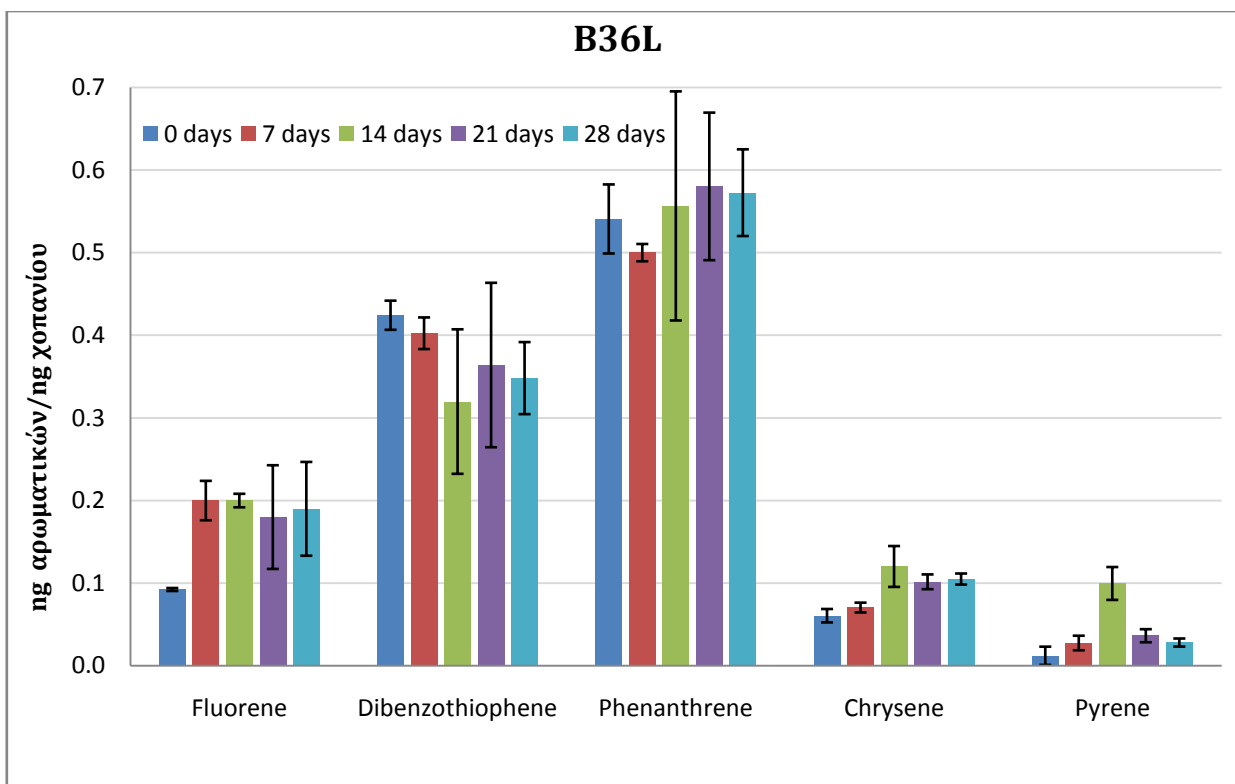
Όπως παρατηρείται στο σχήμα 24, οι συγκεντρώσεις των επιλεγμένων αρωματικών ενώσεων και ρητινών, Φλουορένιο, Χρυσένιο και Πυρένιο, παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις των ενώσεων Διβενζοθειοφαίνιο και Φαινανθρένιο παρουσιάζουν ελάχιστη μείωση μετά από 7 ημέρες παρακολούθησης. Το γεγονός αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται στη δυσκολία των μικροβιακών αποδομητών στα διακλαδισμένα n-αλκάνια. Τέλος, η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα δείχνει το εύρος των πειραματικών σφαλμάτων στις τιμές που προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.1.4 Δοκιμή B36L (Basfoliar 36 Extra, Lecithin Bolec Zt)



**Σχήμα 25:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή B36L.

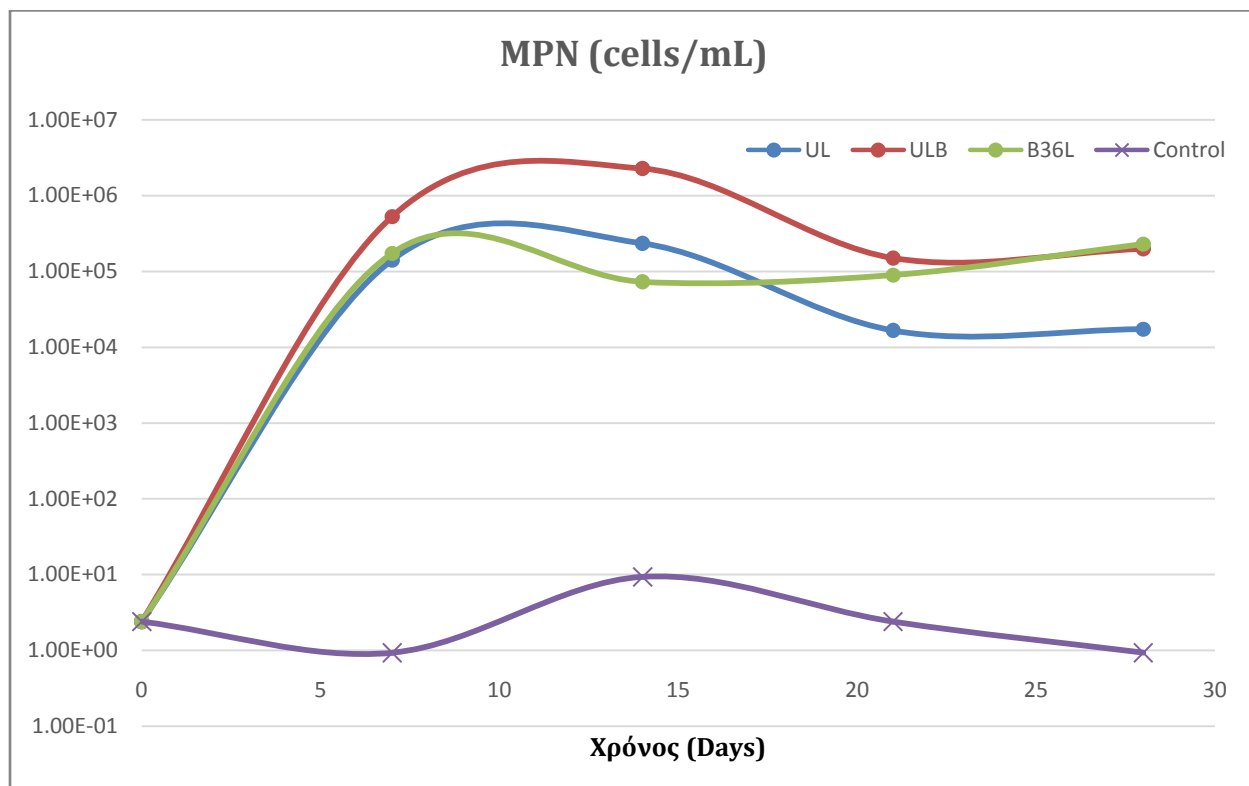
Όπως προκύπτει από το σχήμα 25, η αποδόμηση των υδρογονανθράκων κατά τη δοκιμή B36L ξεκίνησε μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης. Επίσης, οι υδρογονάνθρακες C<sub>15</sub>-C<sub>29</sub> υπόκεινται σε αλλαγές της συγκέντρωσής τους, αντίθετα με τα n-αλκάνια μακριάς αλυσίδας C<sub>30</sub>-C<sub>35</sub>, στα οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Τέλος, η διακύμανση των συγκεντρώσεων των C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, Πριστανίου και Φυτάνιου σε σχέση με το χρόνο παρακολούθησης στο σχήμα 25, ενδεχομένως να οφείλεται στην ευαισθησία του αναλυτή GC-MS.



**Σχήμα 26:** Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητινών και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή B36L.

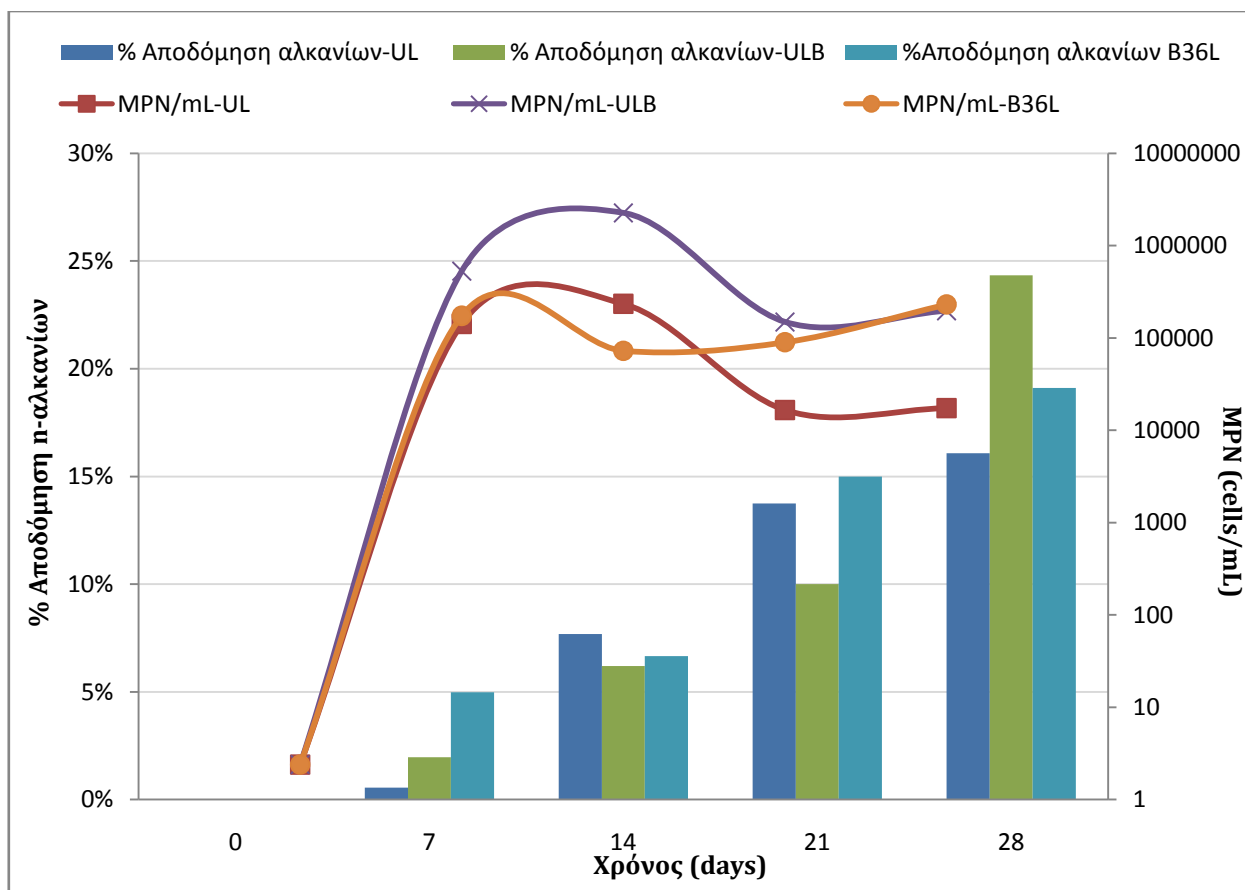
Όπως παρατηρείται στο σχήμα 26, οι συγκεντρώσεις των επιλεγμένων πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων και ρητινών, Φλουορένιο, Φαινανθρένιο, Χρυσένιο και Πυρένιο, παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Παρόλα αυτά η συγκέντρωση της ένωσης Διβενζοθειοφαίνιο παρουσιάζει ελάχιστη μείωση μετά από 14 ημέρες παρακολούθησης. Το γεγονός αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται στη δυσκολία των μικροβιακών αποδομητών στα διακλαδισμένα n-αλκάνια. Τέλος, η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα δείχνει το εύρος των πειραματικών αποτελεσμάτων που προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.1.5 Συνδυαστικά αποτελέσματα δοκιμών Control, UL, ULB και B36L



Σχήμα 27: Μικροβιακό προφίλ των δοκιμών Control, UL, ULB και B36L.

Στο σχήμα 27 παρατηρείται το μικροβιακό προφίλ των αποδομητών πετρελαίου, όπως αυτοί μετρήθηκαν με τη μέθοδο MPN, εκφρασμένοι σε cells/mL. Όπως είναι φυσικό η δοκιμή Control παρουσιάζει σχεδόν μηδενική συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου, διότι δεν περιέχει θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι ικανά να διεγείρουν τους αποδομητές πετρελαίου και να ευνοήσουν την ανάπτυξή τους. Αντίθετα στις δοκιμές UL, ULB και B36L, παρατηρείται μία αυξητική τάση στη συγκέντρωση των αποδομητών. Παρατηρείται, επίσης, ότι μέχρι τις 21 ημέρες παρακολούθησης η δοκιμή ULB παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου. Τέλος, στις 28 ημέρες παρακολούθησης παρατηρούνται παρόμοιες συγκεντρώσεις αποδομητών για τις δοκιμές ULB και B36L.



**Σχήμα 28:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης μεταξύ των δοκιμών UL, ULB και B36L μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης.

Στο σχήμα 28 παρατηρείται το ποσοστό αποδόμησης των δοκιμών UL, ULB και B36L και οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης των αποδομητών για τις ημέρες 0, 7, 14, 21 και 28. Το ποσοστό αποδόμησης της δοκιμής ULB προκύπτει 24% μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης και παρουσιάζει συγκέντρωση αποδομητών ίση με  $2 \times 10^5$  cells/mL. Επιπρόσθετα, η δοκιμή UL εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό αποδόμησης 16% στις 28 ημέρες και τη χαμηλότερη συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου,  $1.7 \times 10^4$  cells/mL. Ακόμα, η δοκιμή B36L παρουσιάζει ποσοστό αποδόμησης 19% στις 28 ημέρες και συγκέντρωση βακτηρίων,  $2.3 \times 10^5$  cells/mL. Τέλος, η δοκιμή ULB παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αποδομητές πετρελαίου σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης στις 28 ημέρες. Συνεπώς, προκύπτει ότι η επιφανειοδραστική ένωση Oil Begone Bio ευνοεί τη βιοδιέγερση.

**Πίνακας 12:** Ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , επιλεγμένων n-αλκανίων.

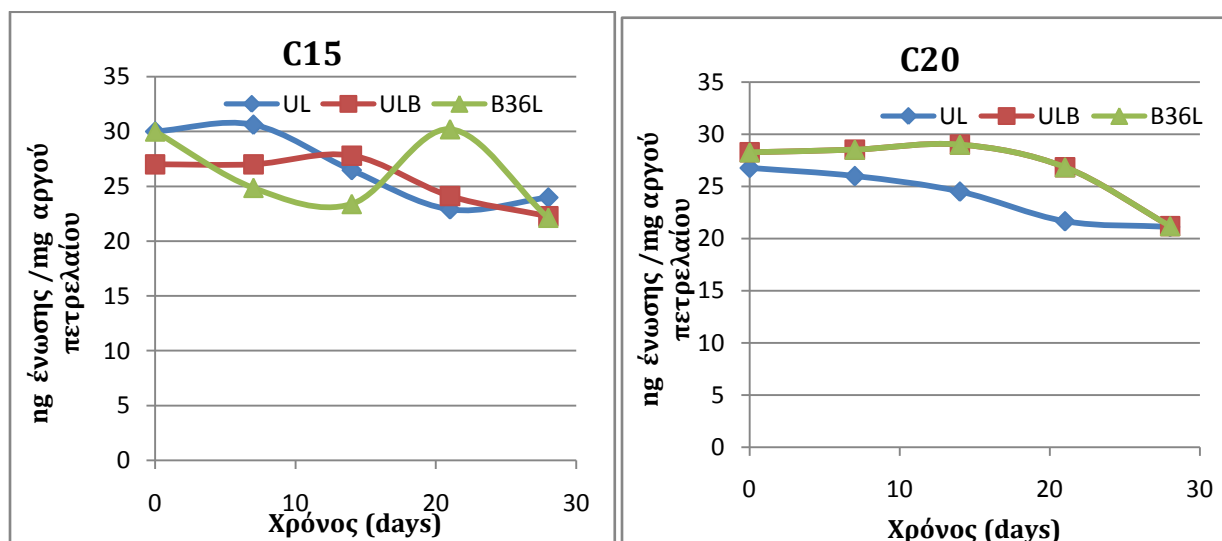
$q_s$ (ng/cells·h)	C15	C20	C25	C30	C35	Πριστάνιο	Φυτάνιο
<b>UL</b>	2.06	1.44	1.28	0.26	0.14	0.55	0.28
<b>ULB</b>	0.27	2.12	1.37	0.27	0.06	1.17	0.10
<b>B36L</b>	2.29	1.57	0.76	0.26	0.11	0.13	0.00

**Πίνακας 13:** Ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , επιλεγμένων ρητινών και PAHs.

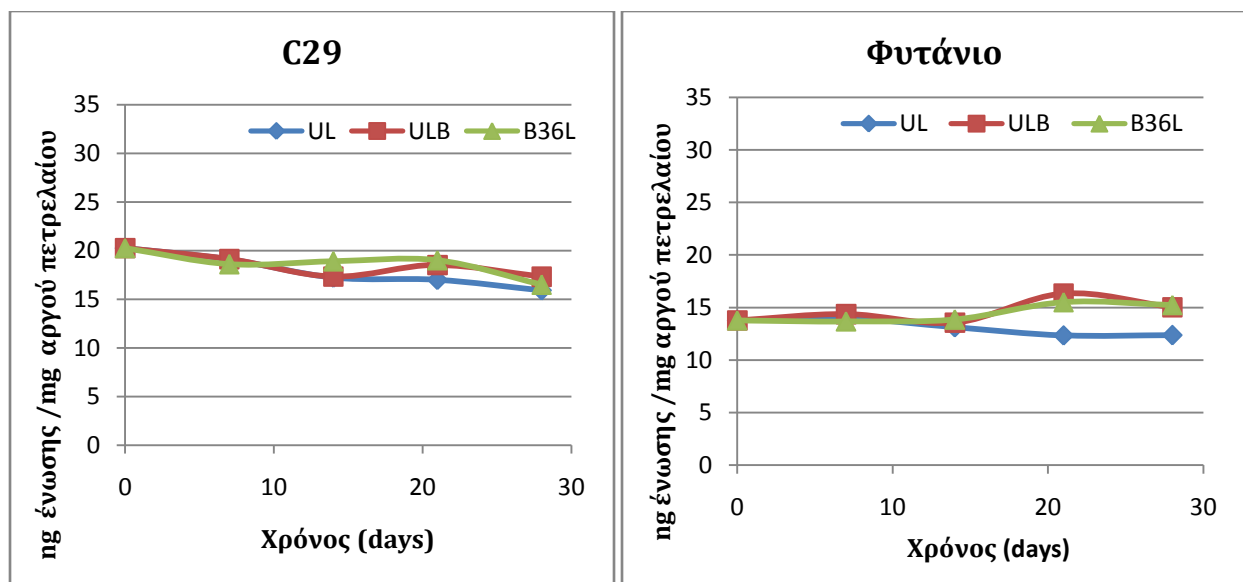
$q_s$ (ng/cells·h)	Φλουορένιο	Διβενζοθειοφαίνιο	Φαινανθρένιο
<b>UL</b>	0.02	0.04	0.00
<b>ULB</b>	0.01	0.01	0.15
<b>B36L</b>	0.01	0.02	0.02

**Πίνακας 14:** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $\mu$ .

	<b>UL</b>	<b>ULB</b>	<b>B36L</b>
$\mu$ (1/h)	0.032	0.039	0.029



**Σχήμα 29:** Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL, ULB και B36L.



**Σχήμα 30:** Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL, ULB and B36L.

Ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , υπολογίζεται για το χρονικό διάστημα που λαμβάνει χώρα η αποδόμηση των επιλεγμένων n-αλκανίων, ρητινών και PAHs, όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 12 και 13. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης για τα PAHs και ρητίνες είναι σχεδόν μηδενικός, με εξαίρεση το Φαινανθρένιο (πίνακας 13). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα πολύ μικρά έως μηδενικά ποσοστά αποδόμησης των PAHs (σχήματα 22, 24, 26). Επιπλέον, η μηδενική αποδόμηση των PAHs μετά το πέρας του πειράματος μπορεί να αποδοθεί στο μικρό αριθμό αποδομητών πετρελαίου, ο οποίος προκλήθηκε από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά προφανώς είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για την μείωση των κορεσμένων ενώσεων του πετρελαίου, όπως προκύπτει στα σχήματα 21, 23 και 25.

Όσον αφορά στη μείωση των n-αλκανίων, γίνεται χρήση των κινητικών εξισώσεων 2, 3 και 4 ώστε να συγκριθούν οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης μεταξύ των δοκιμών. Προκύπτει, λοιπόν, ότι ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , για την ένωση  $C_{15}$  στις δοκιμές UL και B36L είναι περίπου 7.6 και 8.5 φορές μεγαλύτερος από αυτόν της δοκιμής ULB (πίνακας 12). Αντιθέτως, οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης για τις ενώσεις  $C_{20}$ ,  $C_{25}$  και Πριστάνιο στη δοκιμή ULB προκύπτουν 1.5, 1 και 2.1 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς της δοκιμής UL, καθώς και 1.4, 1.8 και 9 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς της δοκιμής B36L, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης της ένωσης  $C_{30}$  προκύπτει παρόμοιος μεταξύ των δοκιμών και τα  $q_s$  για τη

βαρύτερη ένωση C<sub>35</sub> των δοκιμών UL και B36L 2.3 και 1.8 φορές μεγαλύτερα από τη δοκιμή ULB. Το q<sub>s</sub> για το ισοπρενοϊδές, Φυτάνιο, επίσης, προκύπτει για την δοκιμή UL 2.8 και 10 φορές μεγαλύτερο συγκριτικά αυτόν στις δοκιμές ULB και B36L, αντίστοιχα.

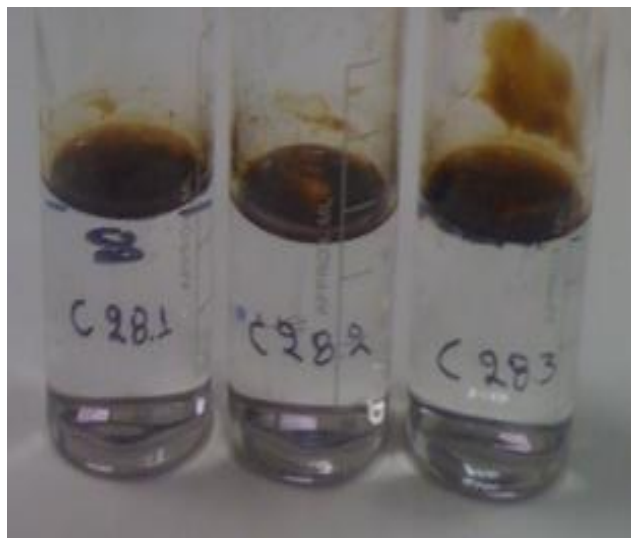
Όσον αφορά στον ειδικό ρυθμό αποδόμησης των PAHs και των ρητινών (πίνακας 13), προκύπτει ότι για την δοκιμή UL το q<sub>s</sub> της ένωσης Φλουορένιο είναι διπλάσιο των q<sub>s</sub> και των δύο δοκιμών ULB και B36L, καθώς και για την ένωση Διβενζοθειοφαίνιο είναι 4 και 2 φορές μεγαλύτερο από αυτό των δοκιμών ULB και B36L, αντίστοιχα. Αντιθέτως, για την ένωση Φαινανθρένιο το q<sub>s</sub> της δοκιμής ULB είναι 15 και 7.5 φορές μεγαλύτερο από αυτό των δοκιμών UL και B36L, αντίστοιχα.

Να σημειωθεί, ακόμα, το γεγονός ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ, για τη δοκιμή ULB (πίνακας 14) υπολογίστηκε 1.2 και 1.3 φορές μεγαλύτερος από τις δοκιμές UL και B36L, αντίστοιχα.

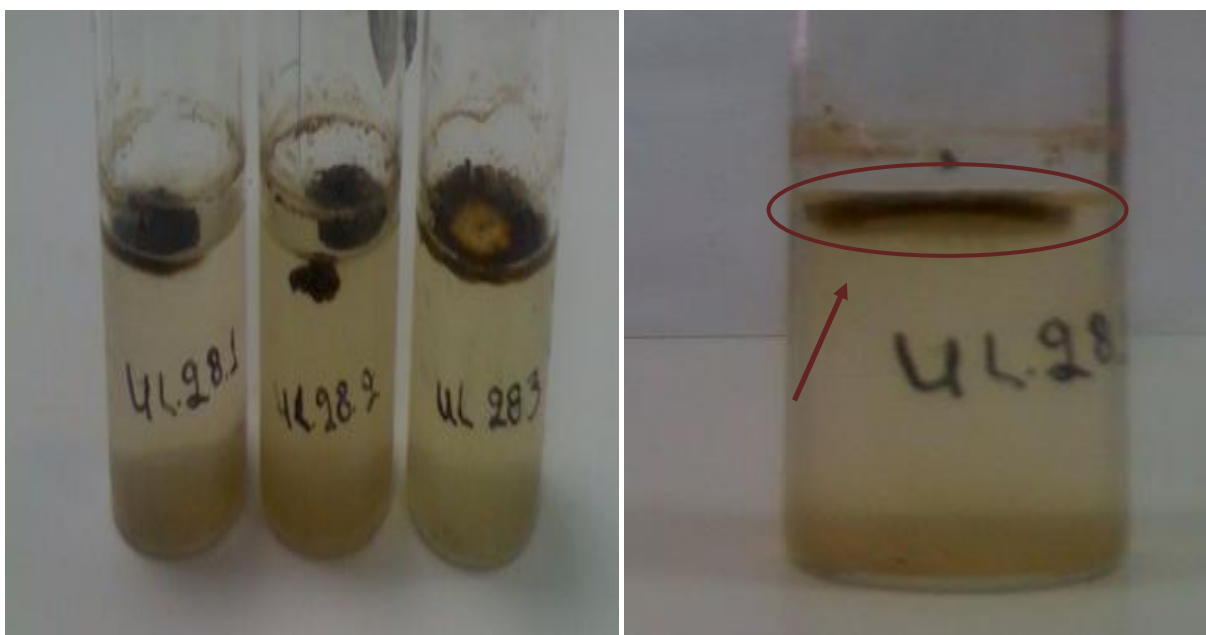
Συμπερασματικά, οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης q<sub>s</sub> της δοκιμής ULB για τις ενώσεις C<sub>15</sub>, C<sub>35</sub> και Διβενζοθειοφαίνιο είναι μικρότεροι σε σχέση με τα q<sub>s</sub> των δοκιμών UL και B36L. Παρόλα αυτά ο ειδικός ρυθμός αποδόμησης για τις ενώσεις C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>30</sub>, Φαινανθρένιο και Πριστάνιο και το ποσοστό αποδόμησης (28 ημέρες παρακολούθησης) για τη δοκιμή ULB προκύπτουν μεγαλύτερα από τις υπόλοιπες δοκιμές. Επιπλέον, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ, της δοκιμής ULB υπολογίζεται μεγαλύτερος από τις υπόλοιπες δύο δοκιμές. Αυτό εξηγείται και από το γεγονός ότι η δοκιμή ULB εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μικροβιακού πληθυσμού (σχήμα 27).

Αξίζει να σημειωθεί, επιπλέον, ότι το ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων για τις δοκιμές UL και B36L παρουσιάζεται μεγαλύτερο από τη δοκιμή ULB για τις 21 ημέρες παρακολούθησης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η επιφανειοδραστική ένωση Oil Begone Bio δρα καθυστερημένα στην αποτελεσματικότητα της αποδόμησης μέχρι τις 21 ημέρες παρακολούθησης. Παρά το γεγονός αυτό, συγκρίνοντας τους ειδικούς ρυθμούς αποδόμησης των περισσότερων ενώσεων και υπολογίζοντας τα ποσοστά αποδόμησης στις 28 ημέρες παρακολούθησης φαίνεται ξεκάθαρα ότι η επιφανειοδραστική ένωση ευνοεί την αποδόμηση των υδρογονανθράκων, καθώς και την ανάπτυξη των αποδομητών πετρελαίου (σχήμα 28, πίνακας 14).

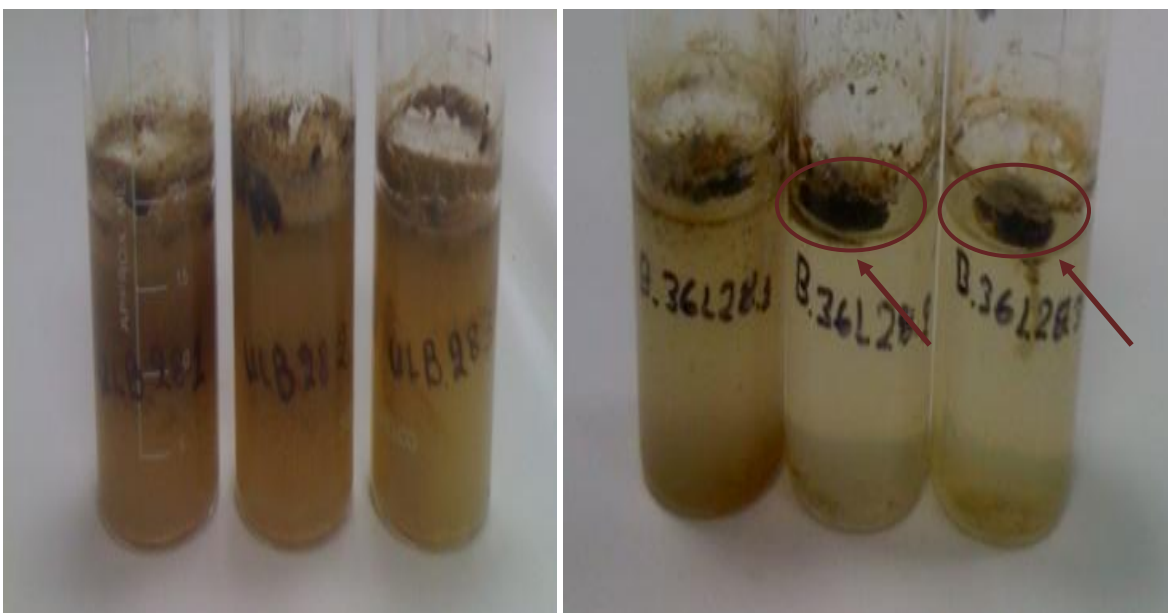
#### 4.1.6 Οπτική παρατήρηση



**Σχήμα 31:** Απεικόνιση των δειγμάτων Control μετά από την επώαση 28 ημερών.



**Σχήμα 32:** Απεικόνιση των δειγμάτων UL μετά από την επώαση 28 ημερών.

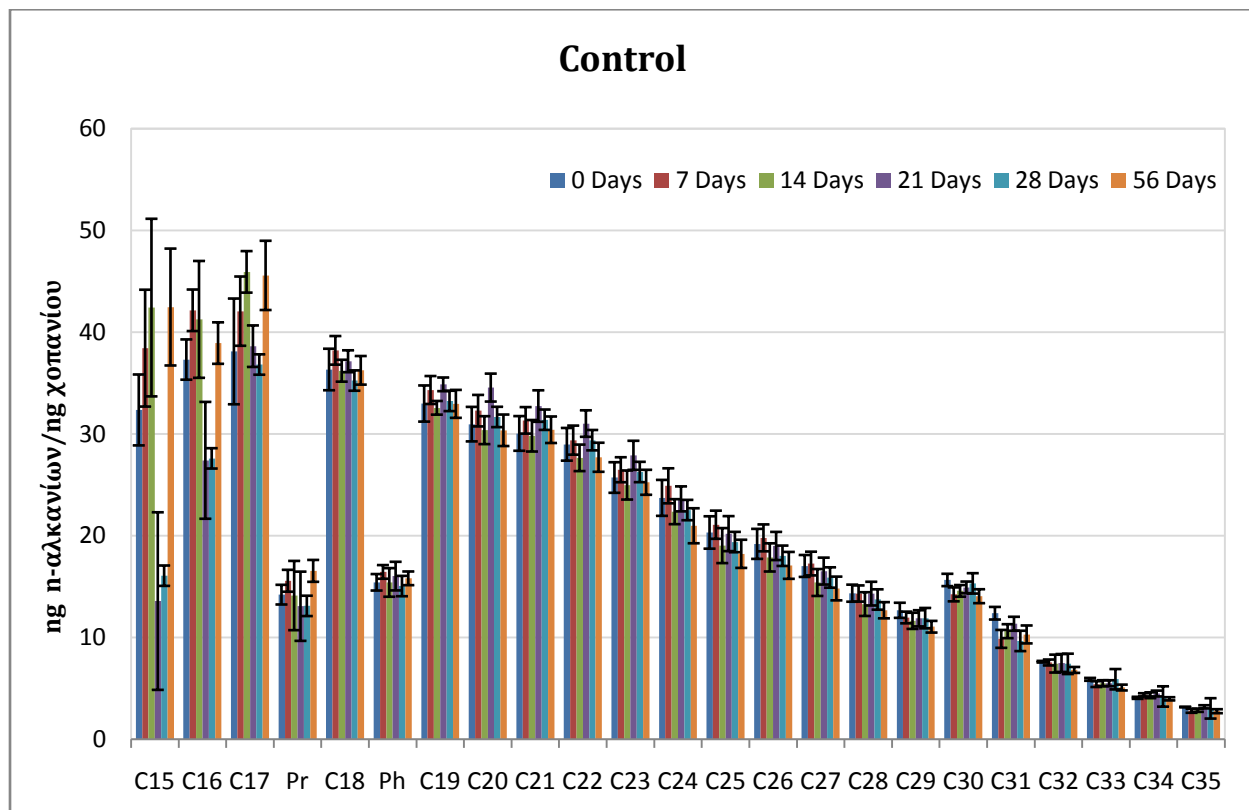


**Σχήμα 33:** Απεικόνιση των δειγμάτων ULB και B36L μετά από επώαση 28 ημερών.

Όσον αφορά στην οπτική παρατήρηση των δειγμάτων, στα δείγματα της δοκιμής ULB διακρίνεται ξεκάθαρα η θολή υγρή φάση μετά από τις 28 ημέρες επώασης που είναι αποτέλεσμα της αποδόμησης του πετρελαίου. Η εικόνα των δειγμάτων ULB είναι η λιγότερο διαυγής σε σχέση με τα δείγματα UL, B36L και Control, διότι η δοκιμή ULB εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης και πληθυσμό αποδομητών πετρελαίου στην υγρή φάση των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, παρατηρείται στο σχήμα 31 η πλήρης διαύγεια της υγρής φάσης στα δείγματα της δοκιμής Control, γεγονός που εξηγείται από τη μη αποδόμηση των δειγμάτων. Τέλος, στο σχήμα 32 και 33 απεικονίζεται ο πιθανός σχηματισμός βιοφίλμ για τις δοκιμές UL και B36L μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται φιλμ στα δείγματα της δοκιμής ULB οφείλεται στο ότι περιέχουν την επιφανειοδραστική ένωση Oil Begone Bio, η οποία αυξάνει την επιφάνεια επαφής του πετρελαίου και έτσι ευνοεί την εναπόθεση των αποδομητών στην επιφάνειά του (Al-Tahhan, et al., 2000). Η εναπόθεση αυτή ευνοεί την αποδόμηση του πετρελαίου που αποτρέπει το σχηματισμό βιοφίλμ.

## 4.2 Αποτελέσματα 2<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού

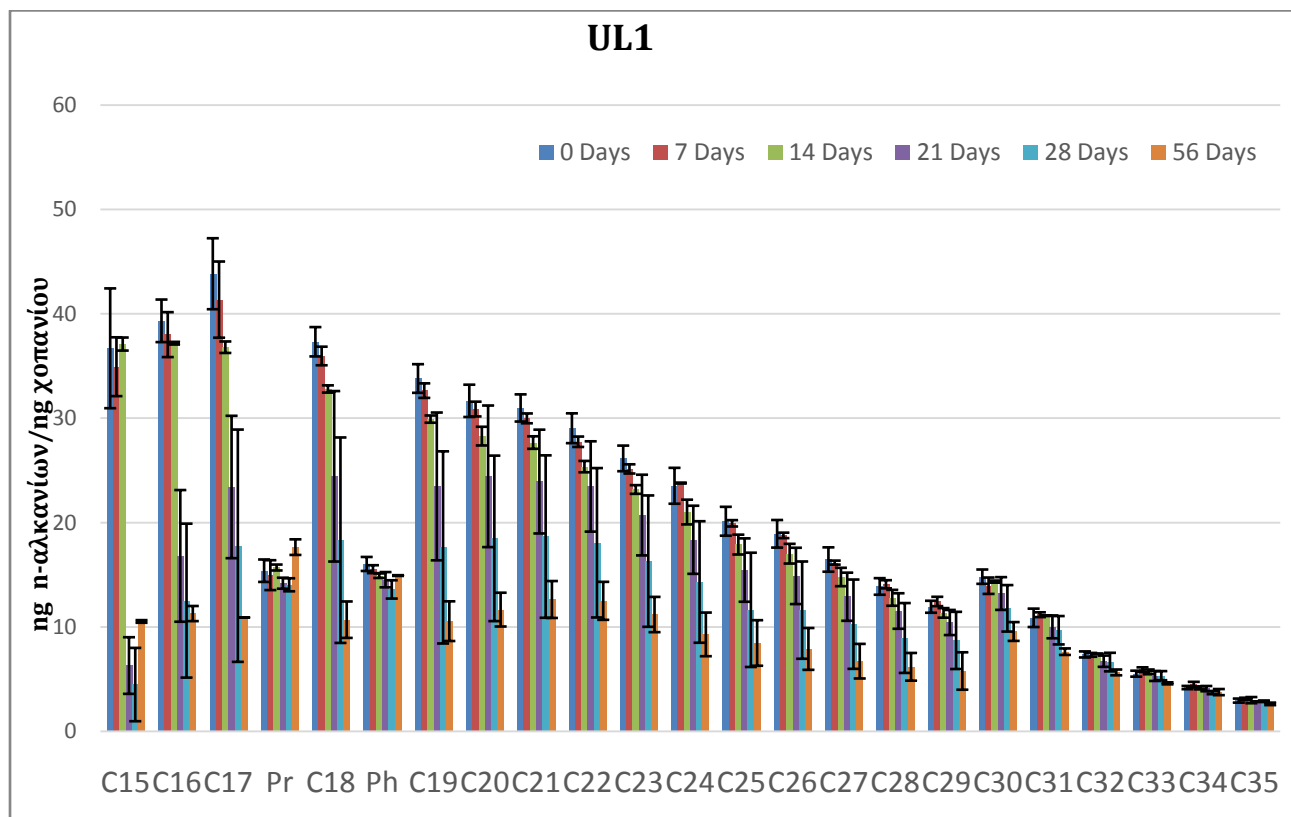
### 4.2.1 Δοκιμή Control



**Σχήμα 34:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή Control.

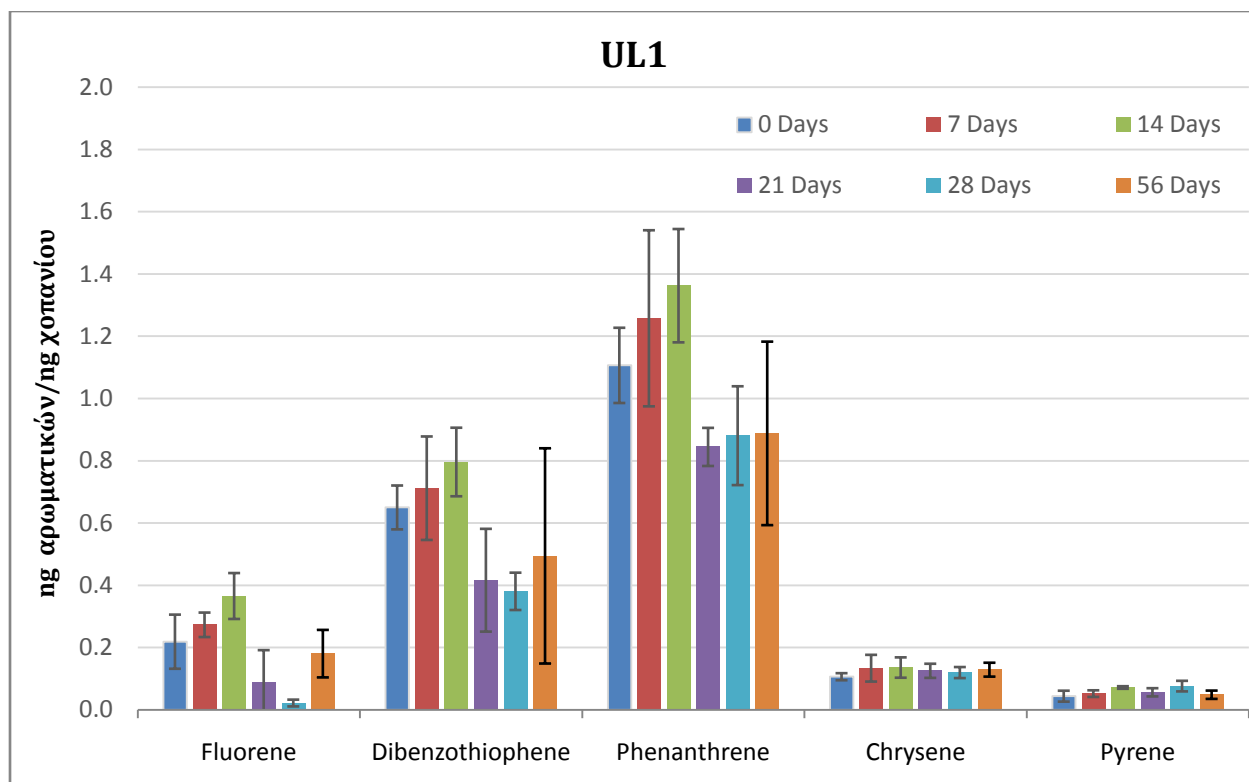
Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 34, η δοκιμή ελέγχου “Control” παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν αποδομητές υδρογονανθράκων. Επιπρόσθετα, η απουσία θρεπτικών υλικών καθιστά ανίκανους τους ενδογενείς αποδομητές υδρογονανθράκων να αντεπεξέλθουν στα μεγάλα φορτία οργανικού άνθρακα. Τέλος, παρατηρείται μια αυξομείωση των συγκεντρώσεων για τις ενώσεις C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub> η οποία δεν εξηγείται βιβλιογραφικά και θεωρείται αποτέλεσμα σφάλματος κατά τις χημικές αναλύσεις. Η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα εξάλλου δείχνει το εύρος των πειραματικών σφαλμάτων στις τιμές και προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.2.2 Δοκιμή UL1 (Uric acid, L-a-Lecithin)



**Σχήμα 35:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL1.

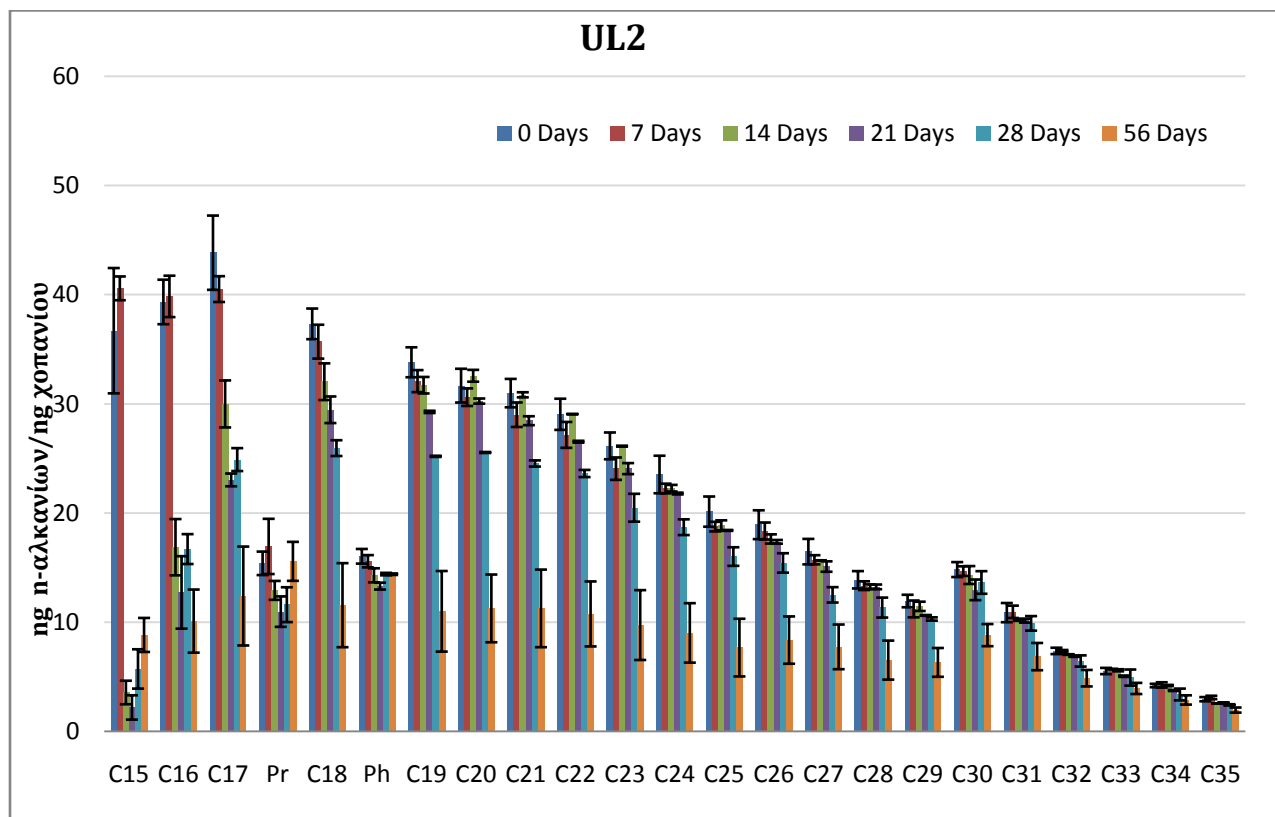
Στο σχήμα 35 παρατηρούνται οι συγκεντρώσεις των n-αλκανίων μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης. Στη συγκεκριμένη δοκιμή παρατηρείται μείωση των υδρογονανθράκων στις 14 ημέρες παρακολούθησης για τα n-αλκάνια μεσαίας αλυσίδας (C<sub>17</sub>-C<sub>28</sub>). Ακόμα, η αποδόμηση των n-αλκανίων (C<sub>29</sub>-C<sub>31</sub>) ξεκινάει μετά από 21 ημέρες παρακολούθησης. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση στα n-αλκάνια μακρινής αλυσίδας (C<sub>32</sub>-C<sub>35</sub>), τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προβάλλουν τη μεγαλύτερη αντίσταση κατά την αποδόμηση (Saadoun, 2002). Τέλος, η διακύμανση της συγκέντρωσης του C<sub>15</sub> σε σχέση με το χρόνο ενδεχομένως οφείλεται στην ευαισθησία του αναλυτή GC-MS, καθώς η ένωση C<sub>15</sub> είναι το ελαφρύτερο κλάσμα πετρελαίου.



**Σχήμα 36:** Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητινών και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL1.

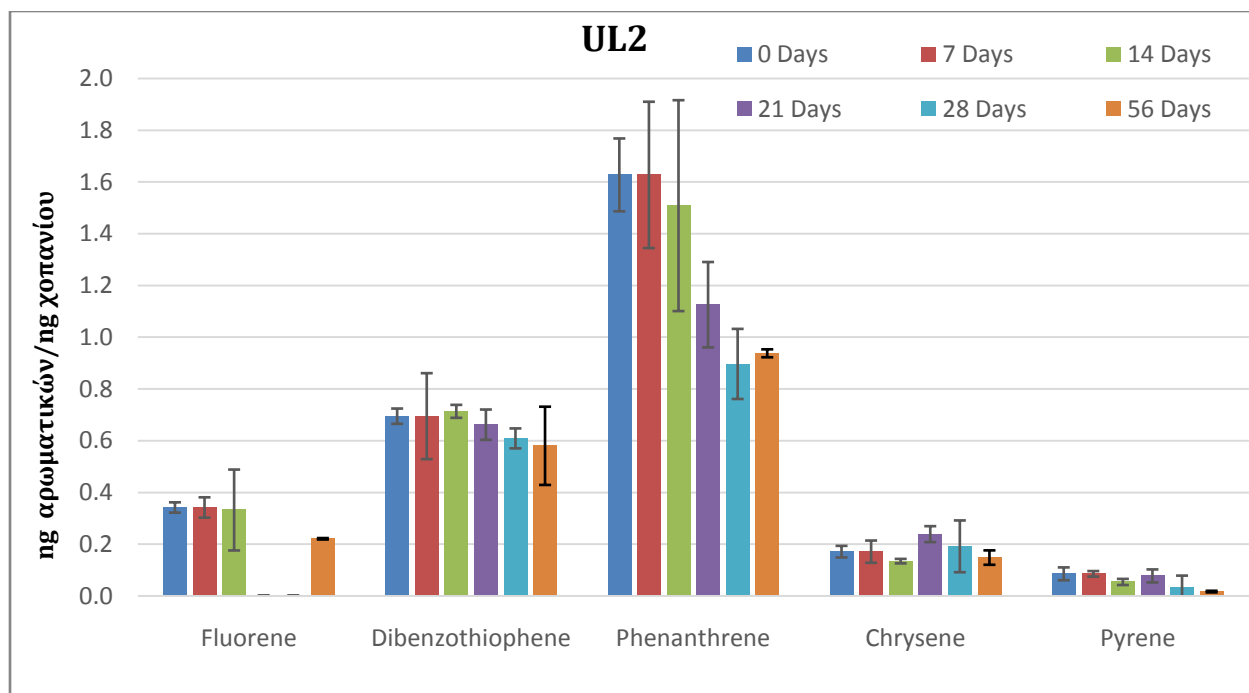
Όπως παρατηρείται στο σχήμα 36, οι συγκεντρώσεις των επιλεγμένων πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων Χρυσένιο και Πυρένιο παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Το γεγονός αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται στη δυσκολία των μικροβιακών αποδομητών να καταναλώσουν PAHs υψηλού μοριακού βάρους. Αντίθετα, οι ενώσεις Φλουορένιο, Διβενζοθειοφαίνιο και Φαινανθρένιο (PAHs χαμηλού μοριακού βάρους) αποδομούνται μετά από 21 ημέρες επώασης.. Τέλος, η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα δείχνει το εύρος των πειραματικών αποτελεσμάτων που προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.2.3 Δοκιμή UL2 (Uric acid, Lecithin Bolec Zt)



**Σχήμα 37:** Συγκέντρωση των n-αλκανίων, C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>, μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL2.

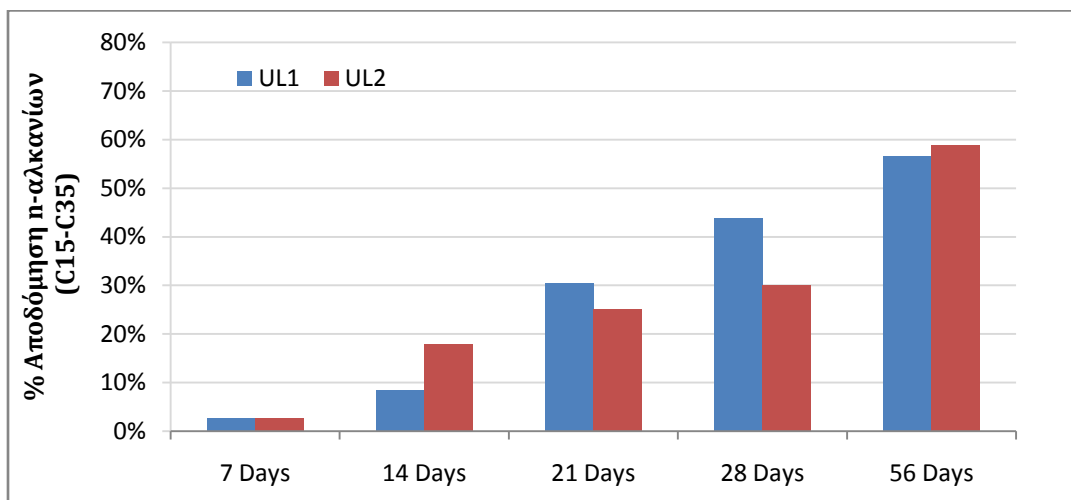
Σχετικά με την αποδόμηση της δοκιμής UL1, στο σχήμα 37 παρουσιάζεται μείωση στη συγκέντρωση των n-αλκανίων στις 14 ημέρες παρακολούθησης για τα n-αλκάνια μεσαίας αλυσίδας (C<sub>15</sub>-C<sub>18</sub>) και στις 21 ημέρες για τα n-αλκάνια (C<sub>19</sub>-C<sub>23</sub>). Ακόμα, η αποδόμηση των n-αλκανίων (C<sub>24</sub>-C<sub>28</sub>) ξεκινάει μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης, ενώ τα n-αλκάνια με μεγάλο μήκους αλυσίδα (C<sub>29</sub>-C<sub>32</sub>) μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση στα n-αλκάνια μακριάς αλυσίδας (C<sub>33</sub>-C<sub>35</sub>), τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προβάλλουν τη μεγαλύτερη αντίσταση κατά την αποδόμηση (Saadoun, 2002). Τέλος, η διακύμανση των συγκεντρώσεων των C<sub>15</sub> και C<sub>16</sub> σε σχέση με το χρόνο ενδεχομένως οφείλεται στην ευαισθησία του αναλυτή GC-MS, καθώς οι ενώσεις C<sub>15</sub> και C<sub>16</sub> είναι από τα ελαφρύτερα κλάσματα πετρελαίου.



**Σχήμα 38:** Συγκέντρωση επιλεγμένων ρητινών και PAHs μετά από 0, 7, 14, 21, 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης στη δοκιμή UL2.

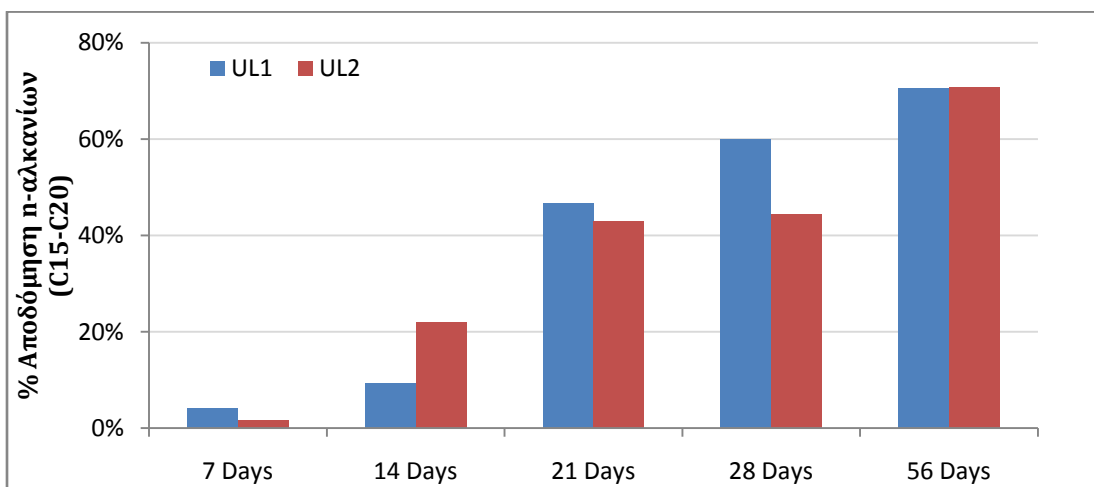
Όπως παρατηρείται στο σχήμα 38, οι συγκεντρώσεις των επιλεγμένων πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων και ρητινών Φλουορένιο, Διβενζοθειοφαίνιο, Χρυσένιο και Πυρένιο παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Το γεγονός αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται στη δυσκολία των μικροβιακών αποδομητών να καταναλώσουν PAHs υψηλού μοριακού βάρους. Αντίθετα, η ενώσεις Φαινανθρένιο (PAH χαμηλού μοριακού βάρους) αποδομείται μετά από 21 ημέρες επώασης.. Τέλος, η τυπική απόκλιση που παρουσιάζεται στο σχήμα δείχνει το εύρος των πειραματικών αποτελεσμάτων που προκύπτει από την επαναληψιμότητα των δειγμάτων.

#### 4.2.4 Συνδυαστικά αποτελέσματα δοκιμών Control, UL1 και UL2



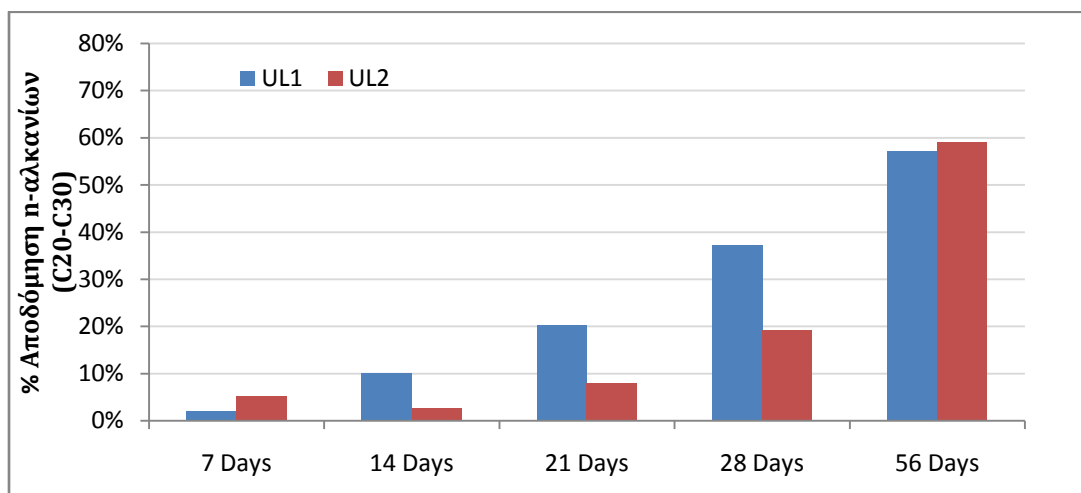
**Σχήμα 39:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Συγκρίνοντας τις δοκιμές με τους διαφορετικούς τύπους λεκιθίνης, παρατηρείται στο σχήμα 39 μέχρι τις 28 ημέρες παρακολούθησης μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C<sub>15</sub>-C<sub>35</sub>) στα δείγματα UL1 που περιέχουν την λεκιθίνη με την υψηλή καθαρότητα και το μεγαλύτερο κόστος. Όμως στις 56 ημέρες παρακολούθησης οι δύο δοκιμές παρουσιάζουν παρόμοιο ποσοστό αποδόμησης, 57% για τη δοκιμή UL1 και 59% για τη δοκιμή UL2.



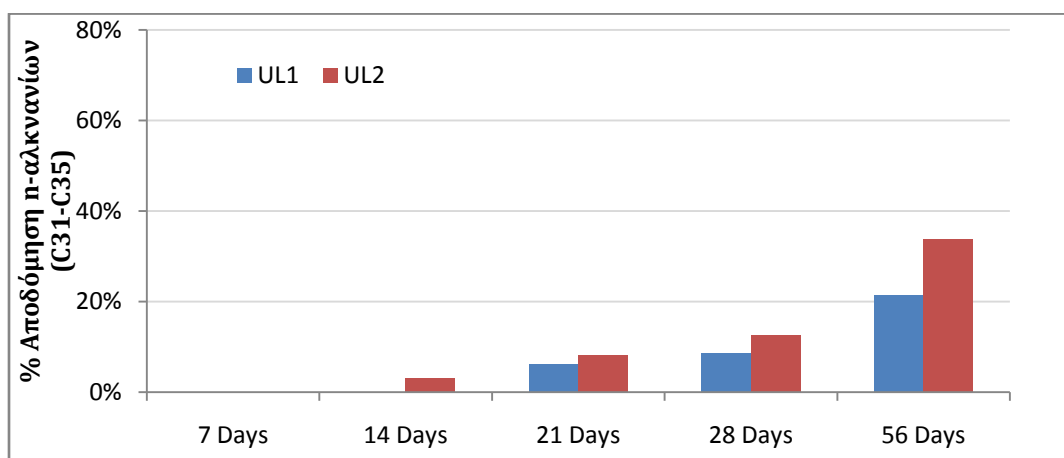
**Σχήμα 40:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Πιο αναλυτικά, για τα n-αλκάνια με αλυσίδα μικρού μήκους ( $C_{15}$ - $C_{20}$ ), προκύπτει ότι η δοκιμή UL1 παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης μέχρι τις 28 ημέρες παρακολούθησης, ενώ στις 56 ημέρες και οι δοκιμές UL1 και UL2 εμφανίζουν ποσοστό αποδόμησης 70%.



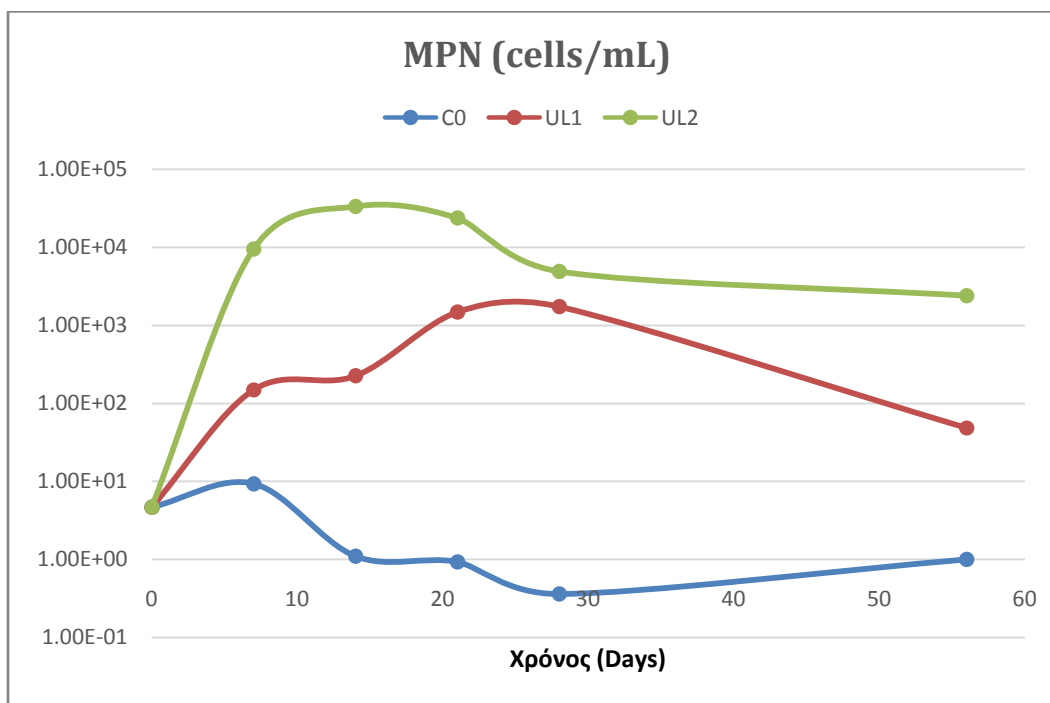
**Σχήμα 41:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων ( $C_{20}$ - $C_{30}$ ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Όσον αφορά στα n-αλκάνια με αλυσίδα μεσαίου μήκους ( $C_{20}$ - $C_{30}$ ), προκύπτει ότι η δοκιμή UL1 παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης μέχρι τις 28 ημέρες παρακολούθησης, ενώ στις 56 ημέρες οι δοκιμές UL1 και UL2 εμφανίζουν ποσοστό αποδόμησης περίπου 60%.



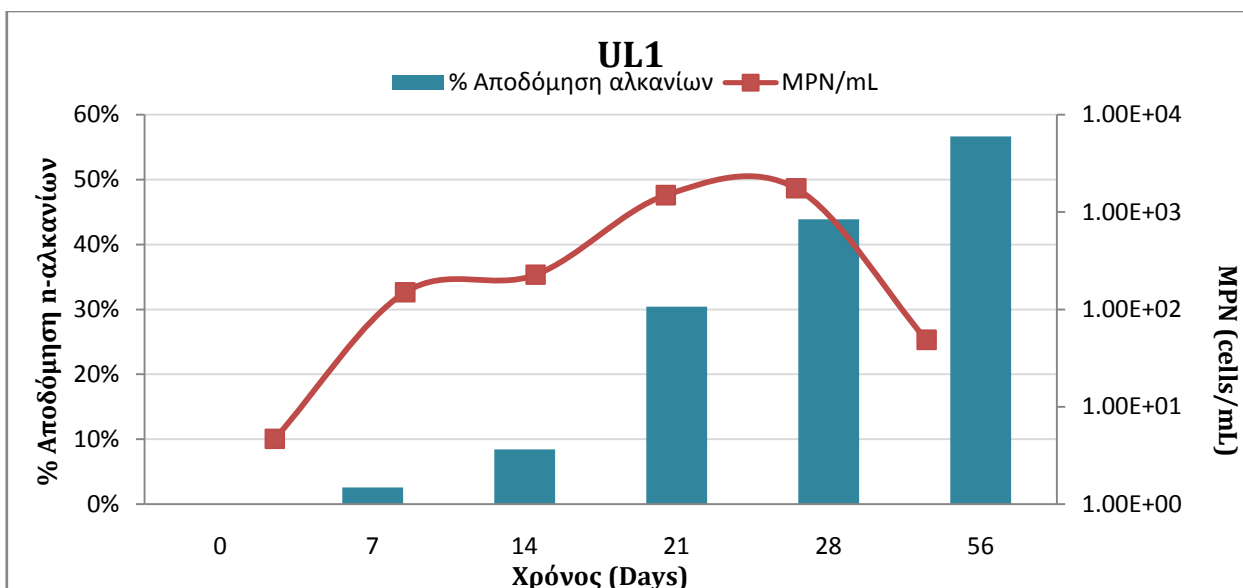
**Σχήμα 42:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων ( $C_{30}$ - $C_{35}$ ) μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Όσον αφορά στα n-αλκάνια με αλυσίδα μεγάλου μήκους (C<sub>31</sub>-C<sub>35</sub>), προκύπτει ότι η δοκιμή UL2 με την εμπορική λεκιθίνη χαμηλού κόστους παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού. Συγκρίνοντας τα ποσοστά αποδόμησης, τα n-αλκάνια υψηλής αλυσίδας (C<sub>31</sub>-C<sub>35</sub>) παρουσίασαν το χαμηλότερο ποσοστό αποδόμησης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων σε σχέση με τα n-αλκάνια μεσαίας αλυσίδας (C<sub>15</sub>-C<sub>30</sub>).



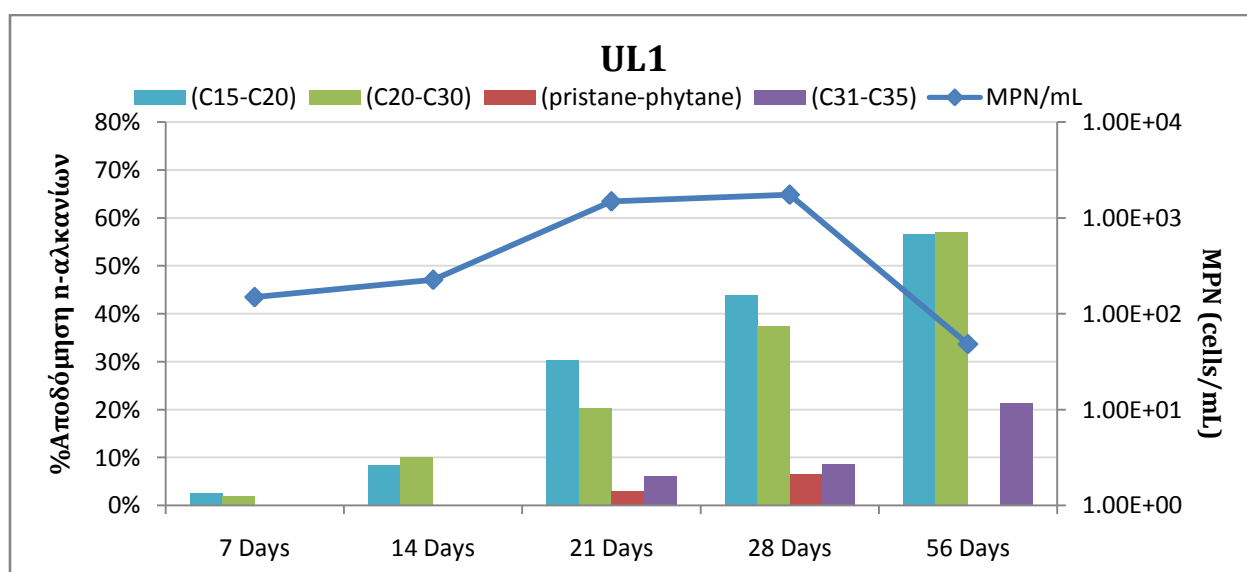
**Σχήμα 43:** Μικροβιακό προφίλ των δοκιμών Control, UL1 και UL2.

Στο σχήμα 43 παρατηρείται το μικροβιακό προφίλ των αποδομητών πετρελαίου, όπως αυτοί μετρήθηκαν με τη μέθοδο MPN, εκφρασμένοι σε cells/mL. Όπως είναι φυσικό η δοκιμή Control παρουσιάζει σχεδόν μηδενική συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου, διότι δεν περιέχει θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι ικανά να διεγείρουν τους αποδομητές πετρελαίου και να ευνοήσουν την ανάπτυξή τους. Αντίθετα, στις δοκιμές UL1 και UL2, παρατηρείται μία αυξητική τάση στη συγκέντρωση των αποδομητών μέχρι τις 28 και 21 ημέρες παρακολούθησης, αντίστοιχα. Παρατηρείται, επίσης, το γεγονός ότι η δοκιμή UL2 παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου.



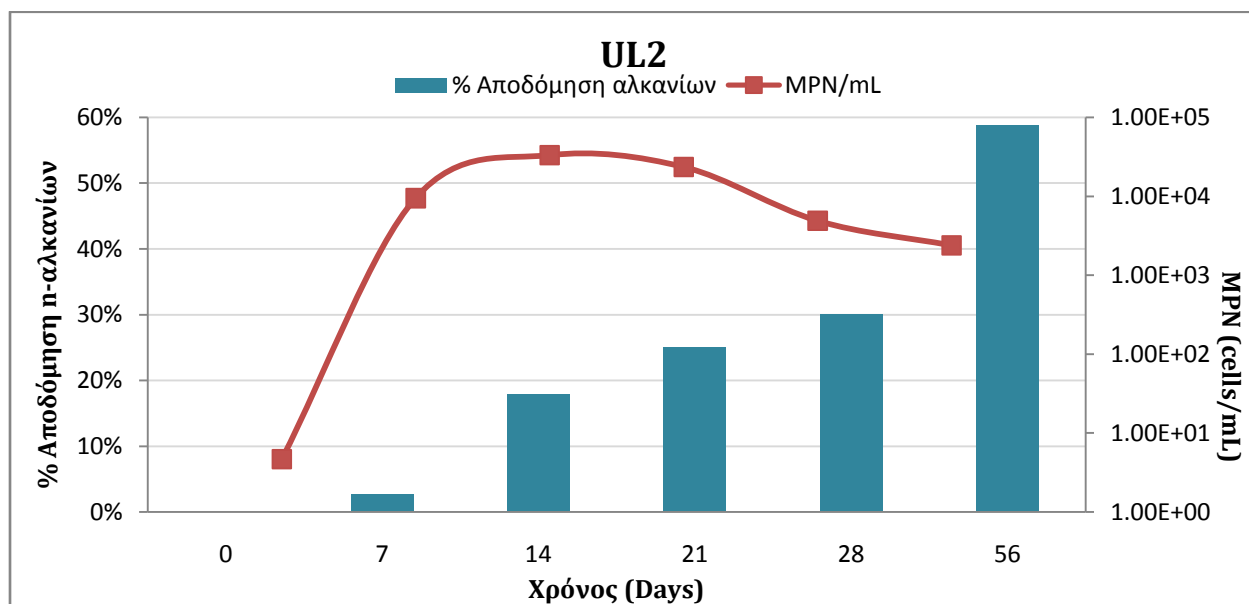
**Σχήμα 44:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL1 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Στο σχήμα 44 παρατηρείται το ποσοστό αποδόμησης της δοκιμής UL1 σε σχέση με τη μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης στις 56 ημέρες παρακολούθησης. Επίσης, προκύπτει ότι στις 56 ημέρες το ποσοστό αποδόμησης συνεχίζει να αυξάνεται, ενώ παράλληλα ο πληθυσμός των αποδομητών μειώνεται απότομα.



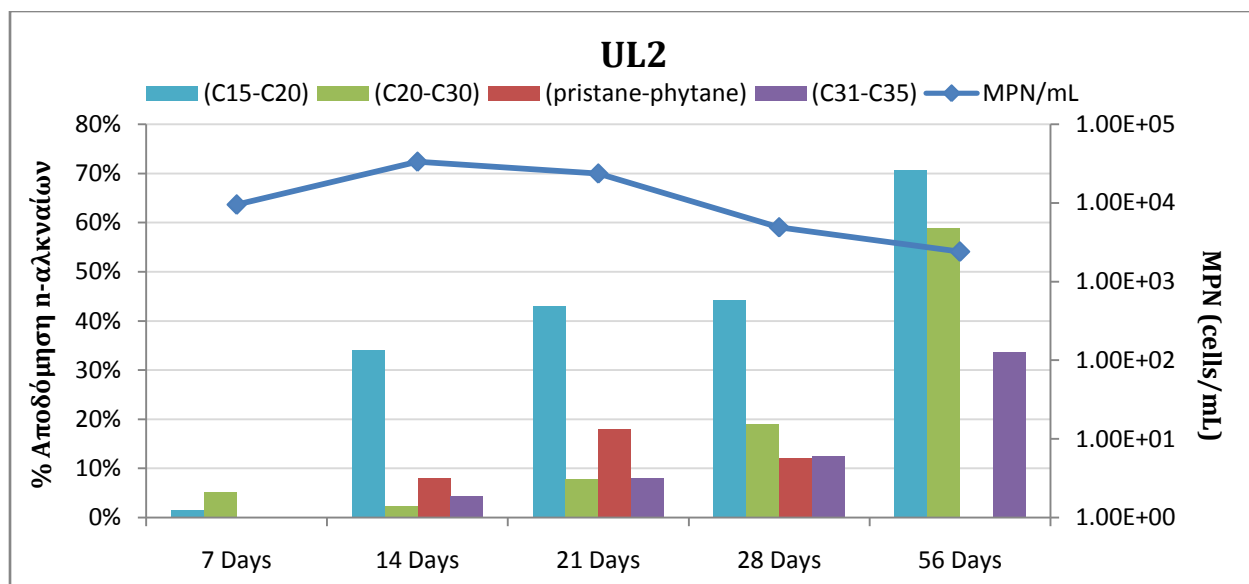
**Σχήμα 45:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL1 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Παρά το γεγονός ότι οι ενώσεις Πριστάνιο και Φυτάνιο έχουν θεωρηθεί στο παρελθόν εσωτερικού βιοδείκτες της αποδόμησης κατά τη διάρκεια των χημικών αναλύσεων στο GC-MS, στις 21 και 28 ημέρες αποδομούνται, σύμφωνα με το σχήμα 45.



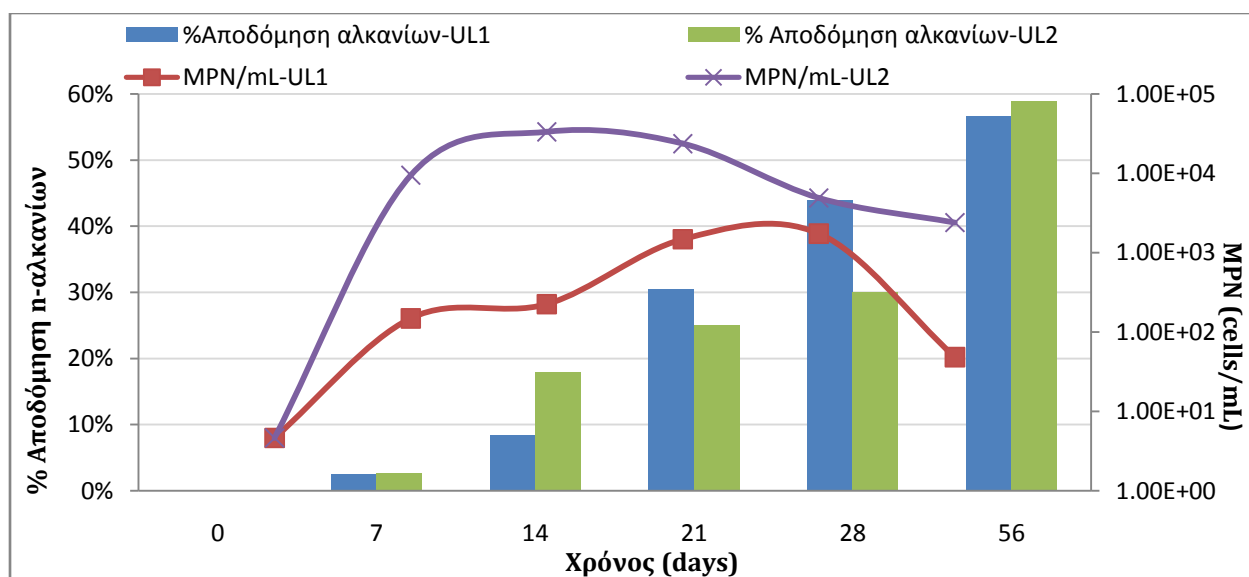
**Σχήμα 46:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Στο σχήμα 46 παρατηρείται το ποσοστό αποδόμησης της δοκιμής UL2 σε σχέση με τη μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού. Επίσης, προκύπτει ότι στις 56 ημέρες το ποσοστό αποδόμησης συνεχίζει να αυξάνεται, ενώ παράλληλα ο πληθυσμός των αποδομητών μειώνεται απότομα.



**Σχήμα 47:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης για τη δοκιμή UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Παρά το γεγονός ότι οι ενώσεις Πριστάνιο και Φυτάνιο έχουν θεωρηθεί στο παρελθόν εσωτερικού βιοδείκτες της αποδόμησης κατά τη διάρκεια των χημικών αναλύσεων στο GC-MS, στις 21 ημέρες παρακολούθησης ξεκινά η αποδόμηση τους σύμφωνα με το σχήμα 47. Επομένως, θα πρέπει να θεωρούνται αναξιόπιστοι δείκτες βιοαποδόμησης.



**Σχήμα 48:** Ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης μεταξύ των δοκιμών UL1 και UL2 μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης.

Στο σχήμα 48 παρατηρείται το ποσοστό αποδόμησης των δοκιμών UL1 και UL2 σε σχέση με τις αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης των αποδομητών για τις ημέρες 0, 7, 14, 21, 28 και 56. Η δοκιμή UL1 παρουσιάζει ταυτόχρονη ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού και του ποσοστού αποδόμησης στις 28 ημέρες παρακολούθησης. Η δοκιμή αυτή επίσης, εμφανίζει μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης ποσοστό αποδόμησης 57% και συγκέντρωση αποδομητών στην υγρή φάση των δειγμάτων, 48cells/mL. Από την άλλη πλευρά η δοκιμή UL2 παρουσιάζει στις 56 ημέρες 59% ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων και ταυτόχρονα την υψηλότερη συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου στην υγρή φάση των δειγμάτων,  $2 \times 10^4$  cells/mL.

**Πίνακας 15:** Ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , επιλεγμένων n-αλκανίων.

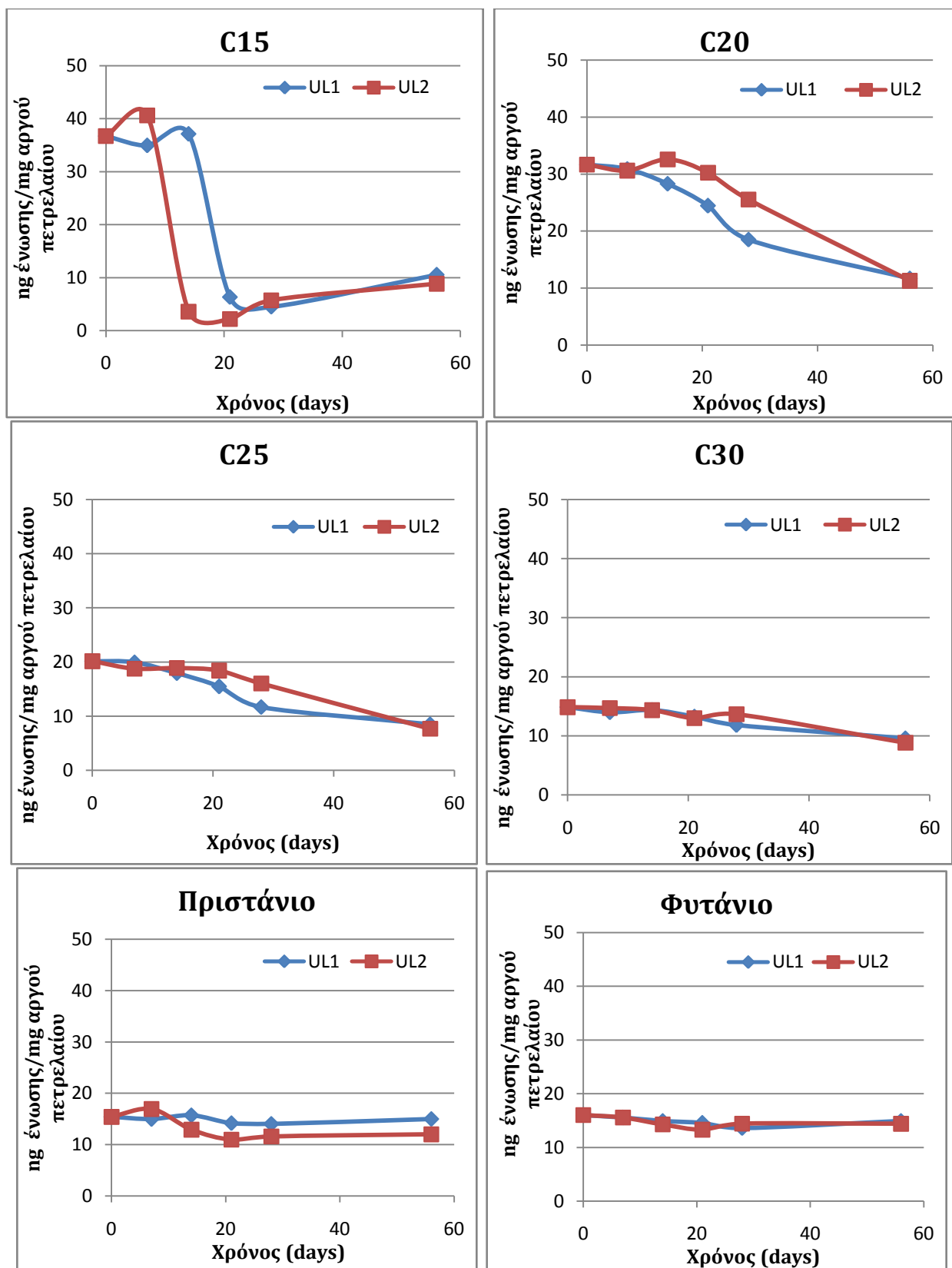
$q_s$ (ng/cells·h)	C15	C20	C25	C30	C35	Πριστάνιο	Φυτάνιο
<b>UL1</b>	18.46	5.30	3.42	1.22	0.06	0.73	0.22
<b>UL2</b>	18.87	2.66	1.63	0.78	0.12	0.95	0.21

**Πίνακας 16:** Ειδικός ρυθμός αποδόμησης,  $q_s$ , επιλεγμένων ρητινών και PAHs.

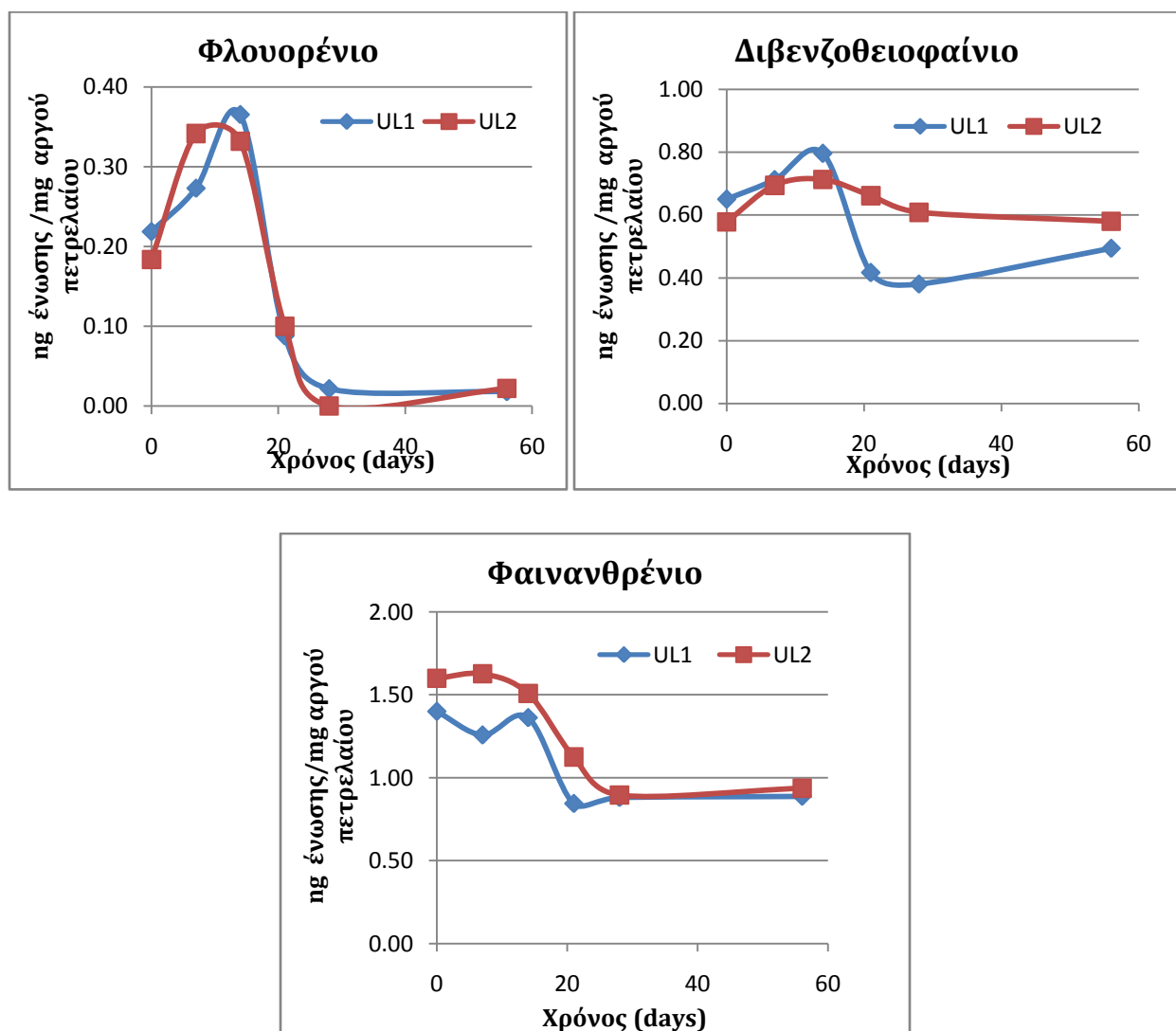
$q_s$ (ng/cells·h)	Φλουορένιο	Διβενζοθειοφαίνιο	Φαινανθρένιο	Χρυσένιο	Πυρένιο
<b>UL1</b>	0.14	0.23	0.31	0.00	0.00
<b>UL2</b>	0.09	0.02	0.18	0.00	0.00

**Πίνακας 17:** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $\mu$ .

	$\mu$ (1/h)
<b>UL1</b>	0.011
<b>UL2</b>	0.045



Σχήμα 49: Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων n-αλκανίων των δοκιμών UL1 και UL2..



**Σχήμα 50:** Προφίλ συγκέντρωσης επιλεγμένων ρητινών και PAHs των δοκιμών UL1 και UL2.

Στους πίνακες 15 και 16 παρουσιάζονται οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης,  $q_s$ , για επιλεγμένα n-αλκάνια, ρητίνες και PAHs. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας μεταξύ των δύο δοκιμών, προκύπτει ότι τα  $q_s$  για τη δοκιμή UL1 των ενώσεων Φλουορένιο, Διβενζοθειοφαίνιο και Φαινανθρένιο είναι 1.6, 12 και 1.7 φορές μεγαλύτερα από αυτά της δοκιμής UL2. Το σχήμα 50 απεικονίζει το προφίλ των συγκεντρώσεων των ρητινών και PAHs με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, προκύπτει από τον πίνακα 16 ότι τα υψηλού μοριακού βάρους PAHs, όπως το Χρυσένιο και το Πυρένιο, και στις δύο δοκιμές παρουσιάζουν μηδενικό ειδικό ρυθμό αποδόμησης και είναι μη αποδομήσιμα (σχήμα 36, 38). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο

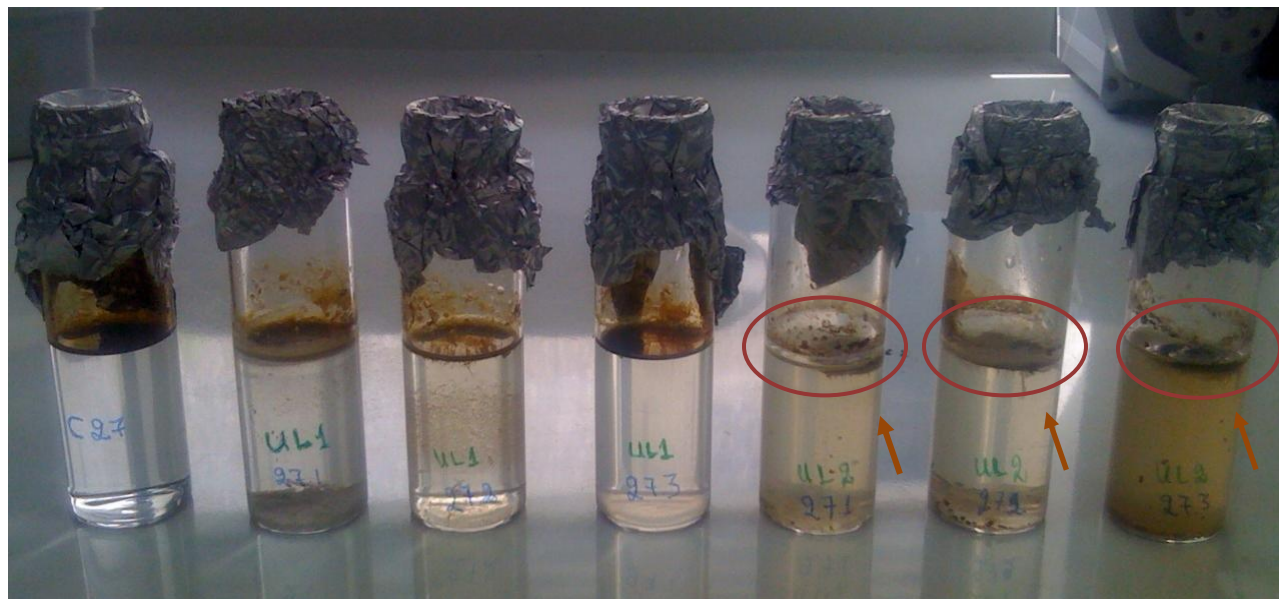
μικρό αριθμό αποδομητών πετρελαίου, ο οποίος προκλήθηκε από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά προφανώς είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για την μείωση των κορεσμένων ενώσεων του πετρελαίου.

Όσον αφορά στη μείωση των n-αλκανίων, συγκρίνοντας μεταξύ των δύο δοκιμών, προκύπτει ότι τα  $q_s$  για τη δοκιμή UL1 των ενώσεων  $C_{20}$ ,  $C_{25}$  και  $C_{30}$  είναι 2, 2 και 1.6 φορές μεγαλύτερα από αυτά της δοκιμής UL2. Αντίθετα οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης του μεσαίου μήκους n-αλκανίου,  $C_{15}$ , και των ισοπρενοϊδών, Πριστάνιο και Φυτάνιο, προκύπτουν παρόμοια για τις δύο δοκιμές. Επιπρόσθετα, το  $q_s$  για τη δοκιμή UL2 της ένωσης  $C_{35}$  προκύπτει διπλάσιο της δοκιμής UL1.

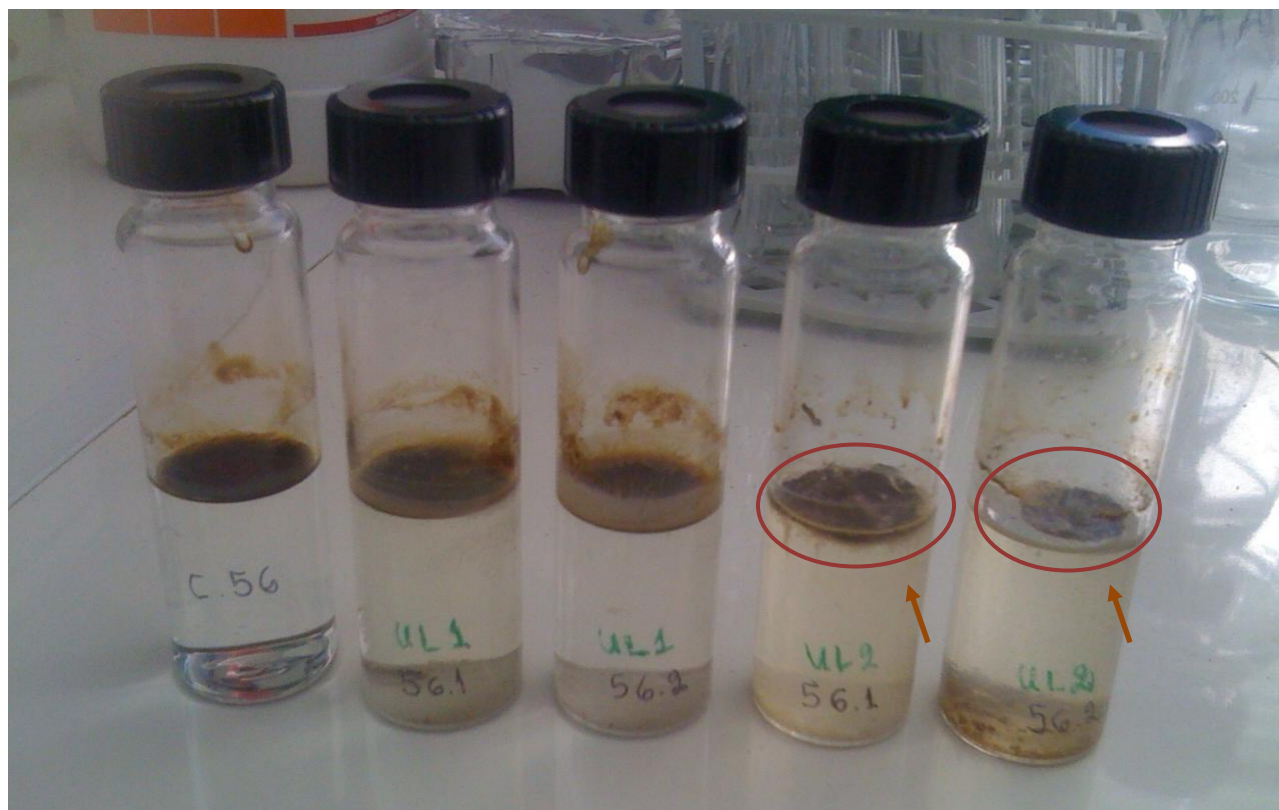
Παρά το γεγονός ότι οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης για τα περισσότερα n-αλκάνια και PAHs της δοκιμής UL2 είναι χαμηλότεροι από αυτούς της δοκιμής UL1, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στη UL2 προκύπτει 4 φορές μεγαλύτερος από τη δοκιμή UL1 (πίνακας 17). Το γεγονός αυτό οδήγησε και στην αυξημένη συγκέντρωση αποδομητών πετρελαίου της δοκιμής UL2 σε σχέση με τη δοκιμή UL1 (σχήμα 43).

Τέλος, το ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων για τη δοκιμή UL1 παρατηρείται από το σχήμα 48 μεγαλύτερο στις 21 και 28 ημέρες παρακολούθησης, γεγονός που εξηγεί τους μεγαλύτερους ρυθμούς αποδόμησης,  $q_s$ , σε ορισμένα n-αλκάνια, ρητίνες και PAHs της δοκιμής UL1 σε σχέση με τη UL2.

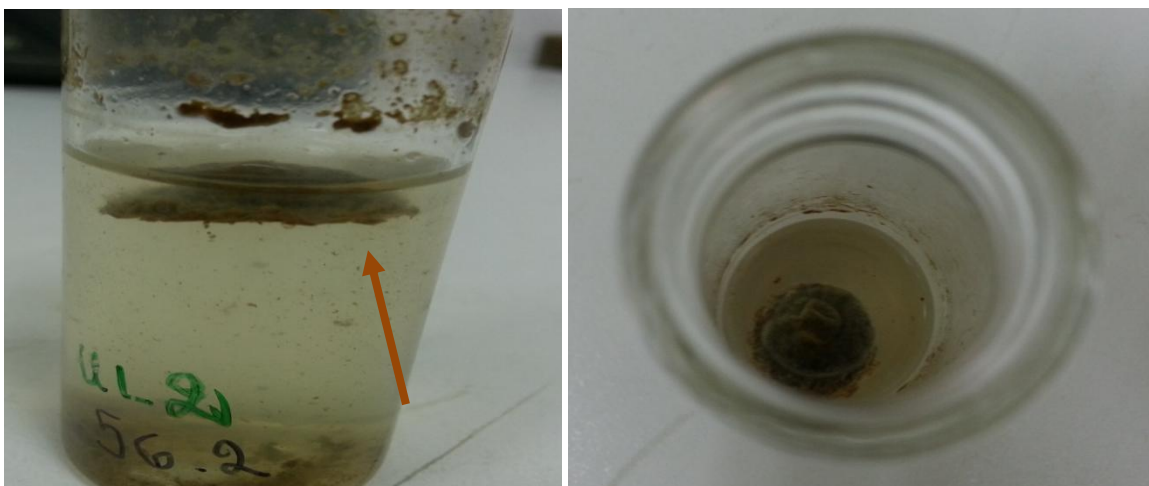
#### 4.2.5 Οπτική παρατήρηση- Μικροσκοπία Ομοεστιακής Δέσμης Λέιζερ (CLSM)



**Σχήμα 51:** Απεικόνιση των δειγμάτων Control, UL1 και UL2 μετά από επώαση 27 ημερών.



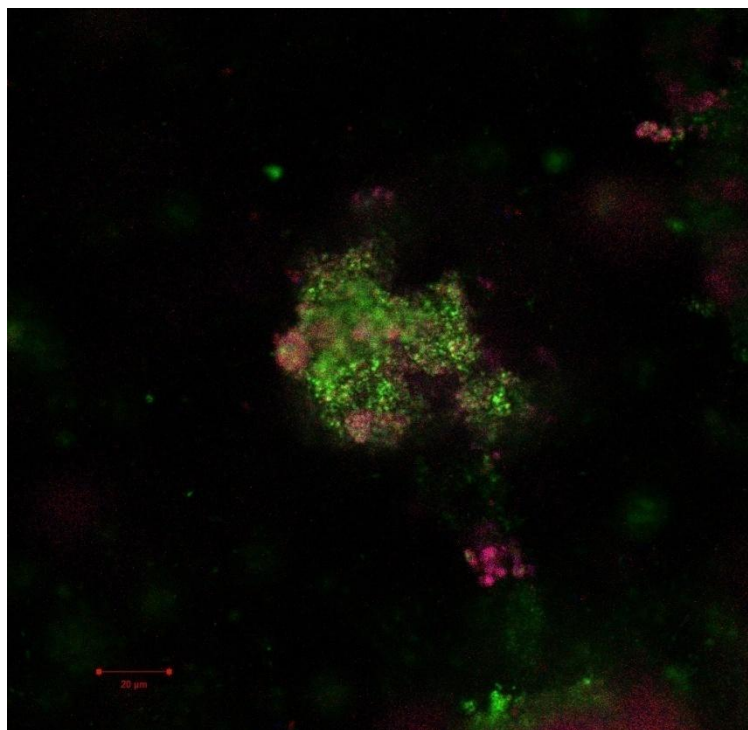
**Σχήμα 52:** Απεικόνιση των δειγμάτων Control, UL1 και UL2 μετά από επώαση 56 ημερών.



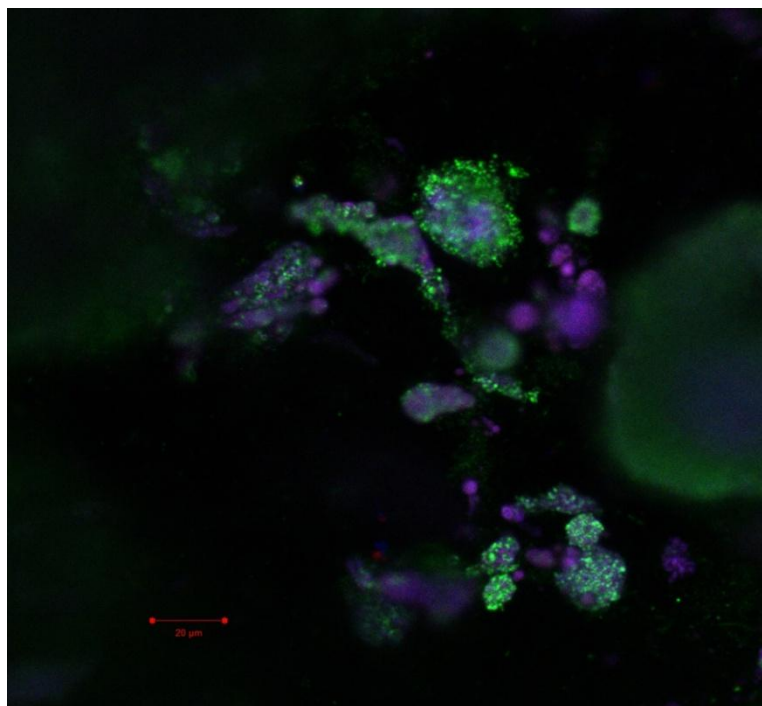
**Σχήμα 53:** Απεικόνιση του δείγματος UL2 μετά από επώαση 56 ημερών.

Όσον αφορά στην οπτική παρατήρηση των δειγμάτων, τα δείγματα των δοκιμών UL1 και UL2 είναι λιγότερο διαυγή σε σχέση με το δείγμα ελέγχου Control, διότι οι δοκιμές UL1 και UL2 εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης και πληθυσμό αποδομητών πετρελαίου στην υγρή φάση των δειγμάτων. Ακόμα, στα σχήματα 51, 52 και 53 απεικονίζεται ο πιθανός σχηματισμός βιοφίλμ ή βιοσυσσώρευση κυττάρων για τα δείγματα της δοκιμής UL2 στις 28 και 56 ημέρες παρακολούθησης.

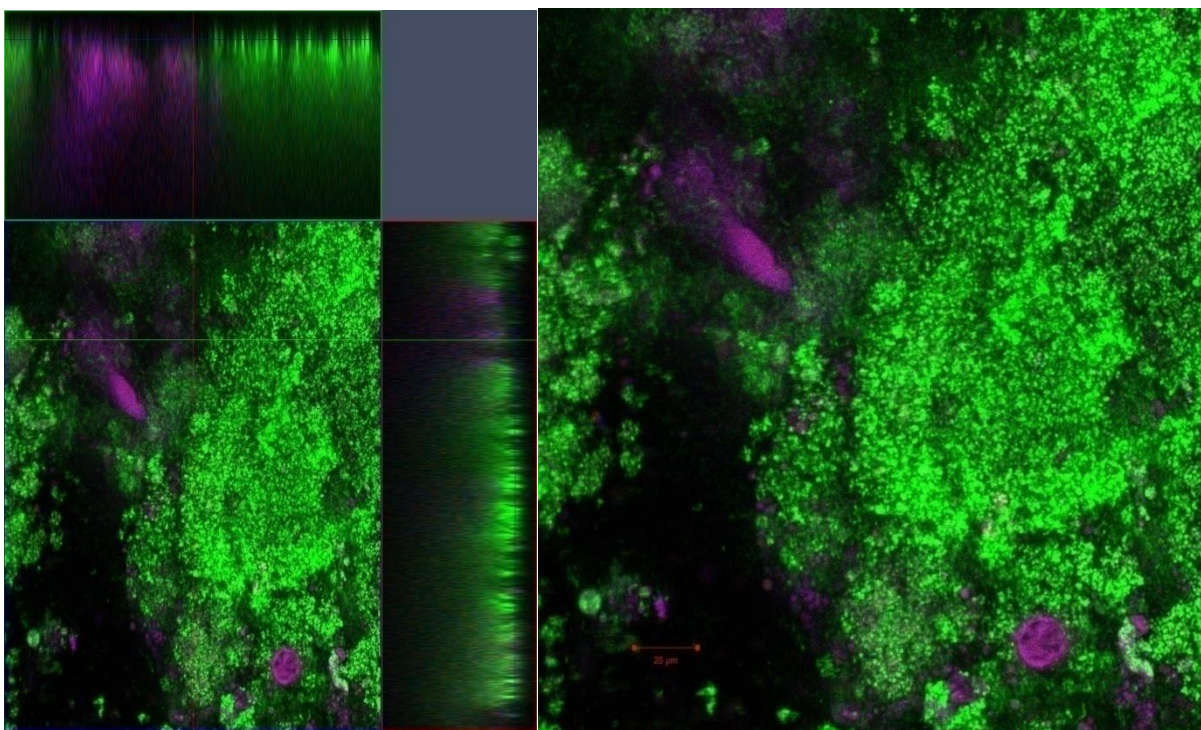
Στη συνέχεια, έγινε χαρακτηρισμός μικρού αριθμού δειγμάτων που εμφάνισαν τη δομή των σχημάτων 51, 52 και 53 με τη χρήση της Μικροσκοπίας Ομοεστιακής Δέσμης Λείζερ (CLSM) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.



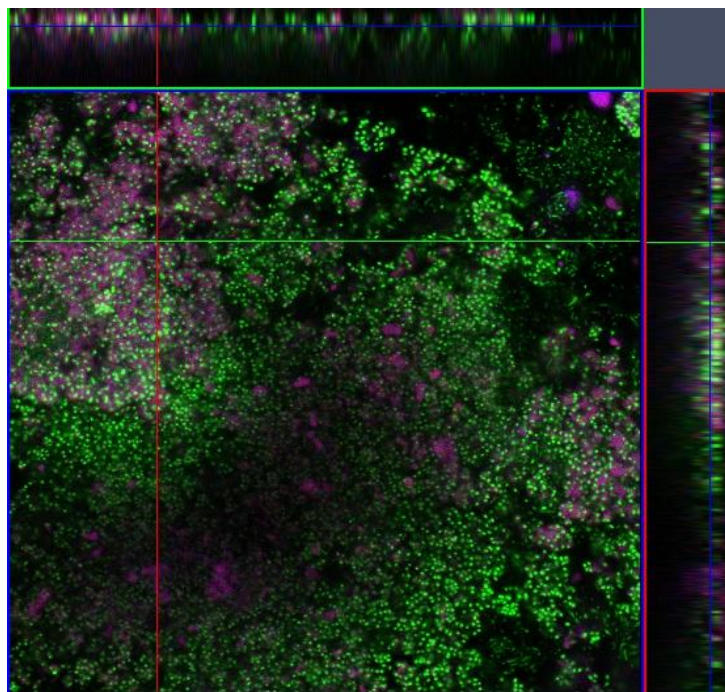
**Σχήμα 54:** Δομή που σχηματίζεται μεταξύ των μικροοργανισμών (πράσινο χρώμα) και του πετρελαίου (λilά χρώμα).



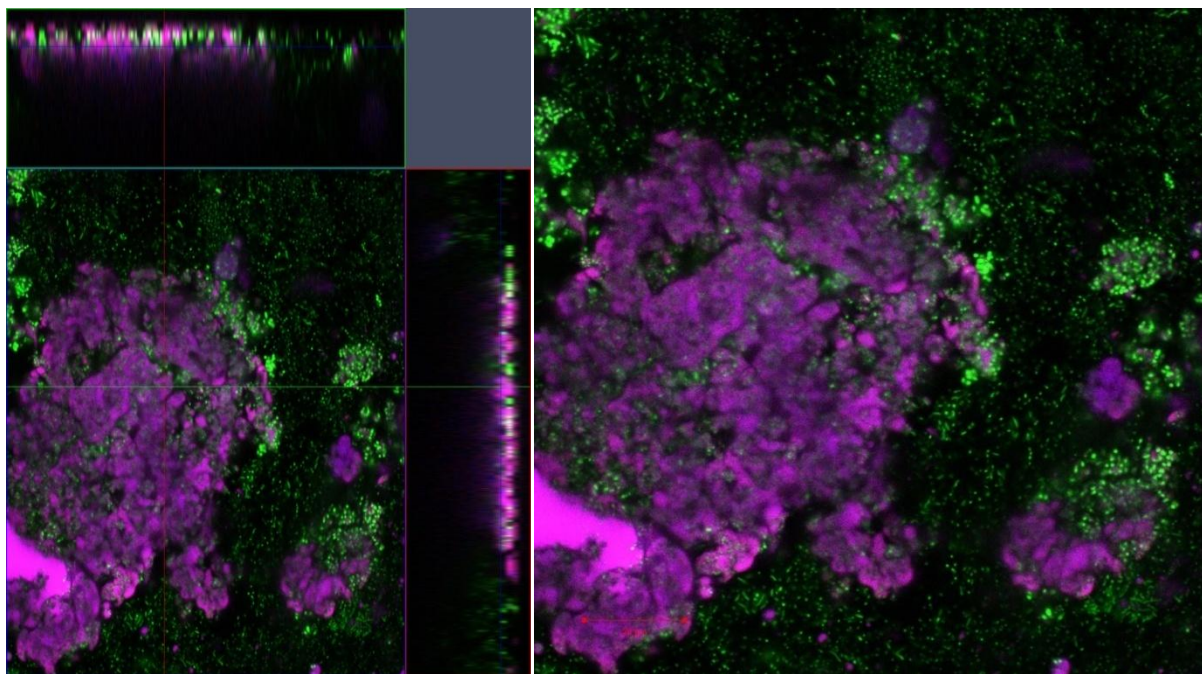
**Σχήμα 55:** Δομή που σχηματίζεται μεταξύ των μικροοργανισμών (πράσινο χρώμα) και των σταγονιδίων πετρελαίου (λilά χρώμα).



**Σχήμα 56:** Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα).



**Σχήμα 57:** Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα).



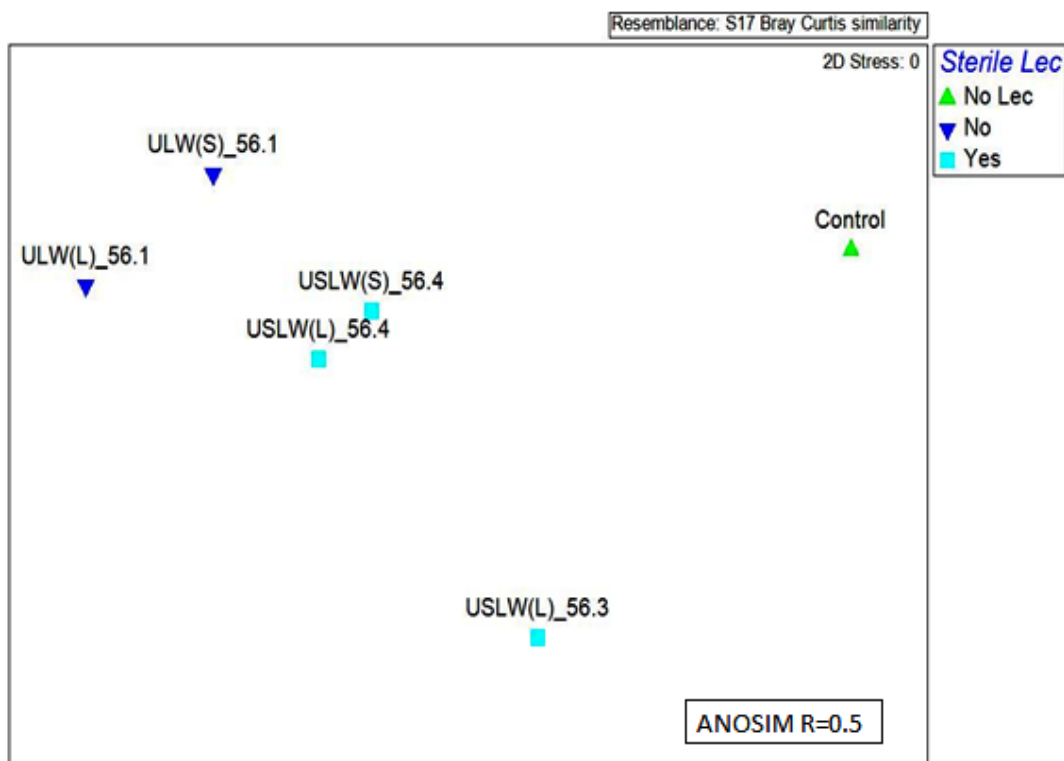
**Σχήμα 58:** Βιοφίλμ που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς (πράσινο χρώμα).

Στα σχήματα 54-58 παρουσιάζονται οι απεικονίσεις του μικροσκοπίου CLSM για τη δοκιμή που περιέχει ουρικό οξύ και τη λεκιθίνη Bolec Zt μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Η κλίμακα των απεικονίσεων αναγράφεται στη κάτω αριστερή πλευρά με κόκκινη ένδειξη και είναι 20μm για όλα τα σχήματα. Η βαφή Syto 13 που χρησιμοποιήθηκε για να βάψει αρχικά το δείγμα, δίνει πράσινο χρώμα στα βακτήρια. Επίσης, οι ενώσεις του πετρελαίου αναπαριστώνται με λιλά χρώμα. Παρατηρώντας, λοιπόν, τα σχήματα 56, 57 και 58 επιβεβαιώνεται η ύπαρξη βιοφίλμ και η ομογενοποίησή του με τα σταγονίδια του πετρελαίου.

#### **4.2.6 Χαρακτηρισμός μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων**

Εκτός από τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων, μελετήθηκε η βακτηριακή δομή της κοινότητας στα δείγματα μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης με τη χρήση της μεθόδου της Αυτοματοποιημένης Ριβοσωματικής Ανάλυσης (ARISA). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πολυμορφικότητα τόσο σε επίπεδο μεγέθους όσο και αλληλουχίας βάσεων της διαγονιδιακής περιοχής μεταξύ της μικρής (16S) και της μεγάλης (23S) υπομονάδας του οπερονίου rRNA μεταξύ των βακτηρίων (Ribeiro, et al., 2013). Για την εφαρμογή της μεθόδου, πρώτα

πραγματοποιείται η απομόνωση του DNA της κοινότητας των δειγμάτων, τόσο από την υγρή φάση, όσο και από την περιοχή σχηματισμού του βιοφίλμ (στερεή φάση). Η μέθοδος απομόνωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρωτόκολλου CTAB (bromide-polyvinylpyrrolidone-b mercaptoethanol), όπως αυτό προκύπτει από τη βιβλιογραφία (Moore, et. Al., 2004). Με τη μέθοδο της ARISA δίνεται ένα διάγραμμα κορυφών για κάθε δείγμα, όπου κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει τουλάχιστον ένα στέλεχος (OTUs). Το ύψος της κάθε κορυφής αντιπροσωπεύει τη σχετική αφθονία του κάθε μικροβιακού είδους. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη γλώσσα προγραμματισμού R και επεξεργάστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα PRIMER 6. Η μέθοδος πολυδιάστατης διαβάθμισης (Multidimensional scaling, MDS) είναι μία τεχνική που βασίζεται σε έναν αλγόριθμο ο οποίος εκτελεί διαδοχικές δοκιμές και συγκρίσεις των αποστάσεων των δειγμάτων καλυτερεύοντας τις σχετικές θέσεις τους μέχρι να βρεθεί ο καλύτερος δυνατός συνδυασμός. Στο παρακάτω σχήμα τα δείγματα διευθετήθηκαν με κριτήριο ομοιότητας, τη μέθοδο Bray–Curtis. Το ANOSIM test πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν οι κοινότητες των διαφορετικών δειγμάτων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το τεστ αυτό υπολογίζει την τιμή ενός στατιστικού R που κυμαίνεται μεταξύ του 0 και του 1, όταν η τιμή R τείνει προς το μηδέν τα δείγματα δε διαφέρουν μεταξύ τους, ενώ όταν πλησιάζει προς το 1 τα δείγματα είναι τελείως διαφορετικά.

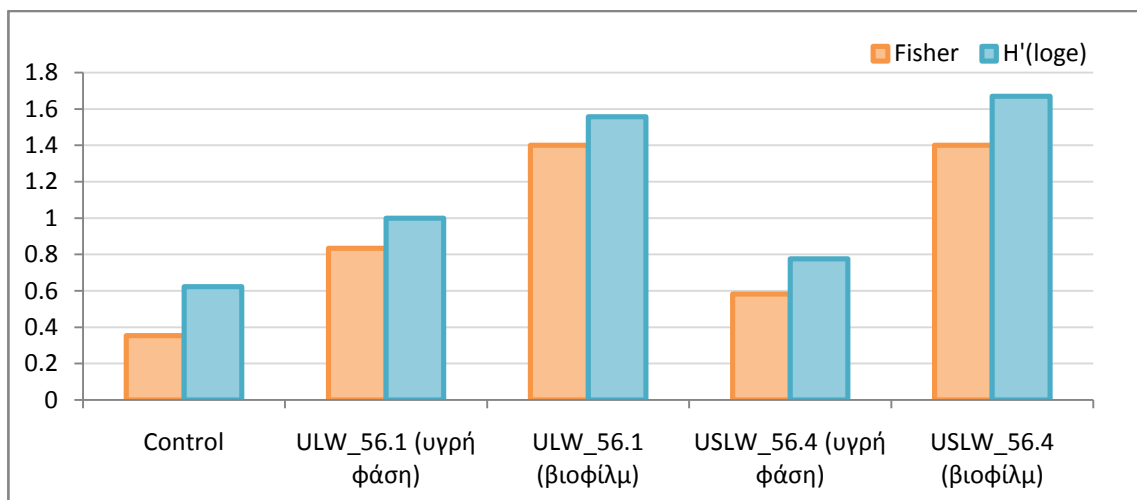


**Σχήμα 59:** Πολυδιάστατη απεικόνιση (MDS) των δειγμάτων, ULW: μη αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt, USLW: αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt, Control: μη προσθήκη λεκιθίνης Bolec Zt.

Στο σχήμα 59 εξετάζεται ο παράγοντας της αποστειρωμένης ή μη λεκιθίνης Bolec Zt των δειγμάτων μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Τα δείγματα «ULW» περιέχουν τη μη αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt, ενώ τα δείγματα «USLW» αποστειρωμένη λεκιθίνη Bolec Zt. Ο συγκεκριμένος παράγοντας ουσιαστικά αποδίδει την επίδραση των μικροοργανισμών (cfu/g) που περιέχονται στην αρχική λεκιθίνη Bolec Zt (πίνακας 16) όσον αφορά στη σύνθεση της κοινότητας μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Έτσι, παρατηρείται ότι ανάλογα με την αποστείρωση ή μη της λεκιθίνης προκύπτουν διαφορές ως προς τη σύνθεση των κοινοτήτων μεταξύ των δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα με την αποστειρωμένη λεκιθίνη εμφανίζονται διαφορετικά από τα δείγματα της δοκιμής Control. Επίσης, διαφέρουν και από τα δείγματα που περιέχουν τη μη αποστειρωμένη λεκιθίνη. Επομένως, η σύνθεση της τελικής κοινότητας διαφοροποιείται ανάλογα με την αποστείρωση της λεκιθίνης, καθώς οι μικροοργανισμοί που περιέχονται στη λεκιθίνη (πίνακας 16) αλληλεπιδρούν με τους ενδογενείς αποδομητές. Να σημειωθεί ότι από το

διάγραμμα MDS δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα (αρνητικό ANOSIM R) ως προς τις διαφοροποιήσεις των κοινοτήτων μεταξύ της στερεής φάσης (βιοφίλμ) και της υγρής φάσης, καθώς δεν υπήρχε ικανοποιητικός αριθμός δειγμάτων και ομοιογένεια μεταξύ των επαναλήψεων των δειγμάτων.



**Σχήμα 60:** Δείκτες βιοποικιλότητας Fisher's alpha και H' Shannon diversity index.

Οι στατιστικοί δείκτες βιοποικιλότητας H' Shannon index και Fisher's alpha υπολογίστηκαν με τη χρήση του πακέτου PRIMER 6. Ο δείκτης βιοποικιλότητας είναι ένα μαθηματικό μέτρο έκφρασης της ποικιλότητας των ειδών σε μια δεδομένη μικροβιακή κοινότητα και εκφράζει τον αριθμό και την αφθονία των ειδών που υπάρχουν στην κοινότητα (Keylock, 2005). Στο σχήμα 60 παρατηρείται ότι η δοκιμή Control παρουσιάζει τη χαμηλότερη βιοποικιλότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επιπρόσθετα, προκύπτει ότι η ύπαρξη βιοφίλμ οδηγεί σε αύξηση της βιοποικιλότητας. Επομένως, η ανάπτυξη πολλών διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ευνοείται στο στρώμα του βιοφίλμ. Τέλος, παρατηρείται ότι τα δείγματα του βιοφίλμ με την μη αποστειρωμένη λεκιθίνη παρουσιάζουν χαμηλότερη βιοποικιλότητα σε σχέση με δείγματα βιοφίλμ της αποστειρωμένης λεκιθίνης, γεγονός που εξηγείται από την ύπαρξη ενδεχόμενων ανταγωνιστικών φαινομένων μεταξύ των αρχικών μικροοργανισμών (πίνακας 16) της μη αποστειρωμένης λεκιθίνης με τους ενδογενείς αποδομητές.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, όσον αφορά στα αποτελέσματα του 1<sup>ου</sup> πειραματικού σχεδιασμού προκύπτει ότι η επιφανειοδραστική ένωση Oil Begone Bio ενισχύει το ποσοστό βιοαποδόμησης των n-αλκανίων έως και 24% μετά από 28 ημέρες παρακολούθησης (δοκιμή ULB) σε σχέση με τις δοκιμές, UL, 16% και B36L, 19%. Εκτός από το ποσοστό αποδόμησης, ευνοείται και η ανάπτυξη των μικροβιακών αποδομητών με τη χρήση του επιφανειοδραστικού, η οποία είναι η μεγαλύτερη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με τις άλλες δύο δοκιμές. Παράλληλα, οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης της δοκιμής ULB για τις ενώσεις C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub> και C<sub>35</sub> και Φαινανθρένιο ήταν οι μεγαλύτεροι σε σχέση με τις άλλες δύο δοκιμές (πίνακες 12 και 13). Επιπρόσθετα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων διασκορπά τα σταγονίδια του πετρελαίου και αυξάνει την επιφάνεια επαφής του πετρελαίου, γεγονός που το καθιστά επιρρεπές στη μικροβιακή αποδόμηση (Banat, et al., 2000) (Nikolopoulou και Kalogerakis, 2011) (Atlas, 1988). Επιπλέον, η διασπορά του πετρελαίου και η διαθεσιμότητα της διεπιφάνειας της υδάτινης φάσης με το πετρέλαιο ευνοεί την εναπόθεση των αποδομητών στην επιφάνειά του (Al-Tahhan, et al., 2000). Η εναπόθεση αυτή επομένως επιταχύνει την αποδόμηση του πετρελαίου. Η βιβλιογραφία σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι η χρήση της επιφανειοδραστικής ένωσης θεωρείται ένας πολύ ικανοποιητικός παράγοντας βιοδιέγερσης.

Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις δοκιμές UL και B36L, δηλαδή τις δοκιμές με τις δύο διαφορετικές πηγές αζώτου, το ουρικό οξύ και το λίπασμα χαμηλού κόστους «Basfoliar 36 extra», προκύπτει ότι οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των n-αλκανίων, των ρητινών και των PAHs ήταν σχεδόν ίσοι για τις δύο ενώσεις (πίνακας 12 και 13). Επίσης, το ποσοστό αποδόμησης των n-αλκανίων μετά τις 28 ημέρες παρακολούθησης με τη χρήση του παράγοντα χαμηλού κόστους (λίπασμα Basfoliar 36 extra), προκύπτει υψηλότερο (19%) από αυτό με τη χρήση του ουρικού οξέος (16%) (σχήμα 28) και η συγκέντρωση των αποδομητών πετρελαίου με τη χρήση του παράγοντα χαμηλού κόστους μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη. Επιπλέον η μηδενική αποδόμηση των PAHs και ρητινών σε όλες τις δοκιμές μετά το πέρας του πειράματος μπορεί να αποδοθεί στο μικρό αριθμό αποδομητών πετρελαίου, ο οποίος προκλήθηκε από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά προφανώς είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για την μείωση των κορεσμένων ενώσεων του πετρελαίου. Επομένως, προκύπτει ότι το ουρικό οξύ που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ως μέσο βιοαποδόμησης-πηγή αζώτου και παρουσιάζει το

μειονέκτημα του υψηλού κόστους (πίνακας 6), μπορεί να αντικατασταθεί από το λίπασμα χαμηλού κόστους «Basfoliar 36 extra» κατά τη μέθοδο της βιοδιέγερσης.

Στον 2<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό γίνεται σύγκριση της αποτελεσματικότητας της βιοδιέγερσης με τη χρήση δύο δοκιμών με διαφορετικά είδη λεκιθίνης, την L-a-Lecithin που έχει υψηλό κόστος (UL1) και την εμπορική λεκιθίνη χαμηλού κόστους Bolec Zt (UL2). Από τα αποτελέσματα της μελέτης, τα ποσοστά αποδόμησης των δοκιμών UL1 και της UL2 προκύπτουν 57% και 59%, αντίστοιχα, μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Παρά το γεγονός ότι το ποσοστά αυτά είναι παρόμοια, μέχρι τις 28 ημέρες παρακολούθησης η δοκιμή UL1 υπερέχει σε ποσοστό αποδόμησης (43%) σε σχέση με τη UL2 (30%). Επιπλέον, προκύπτει ότι οι ειδικοί ρυθμοί αποδόμησης των n-αλκανίων, C<sub>20</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>30</sub> και των ρητινών και PAHs, Φλουορένιο, Διβενζοθιοφαίνιο και Φαινανθρένιο, για τη δοκιμή UL1 είναι υψηλότεροι από τη δοκιμή UL2. Η καθυστέρηση των πρώτων 28 ημερών ως προς την αποδόμηση των υδρογονανθράκων της δοκιμής UL2 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ενδογενείς αποδομητές προτιμούν να καταναλώνουν πρώτα το οργανικό ελαιόφιλο θρεπτικό (λεκιθίνη Bolec Zt) ως πηγή άνθρακα και στη συνέχεια τους πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά, καθώς τα βακτήρια που έχουν την ικανότητα αποδόμησης n-αλκανίων, έχουν ευπροσάρμοστο μεταβολισμό ώστε να μπορούν να χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και άλλες ενώσεις εκτός από n-αλκάνια (Singh, et al. 2012). Επιπρόσθετα, η λεκιθίνη Bolec Zt που μελετήθηκε ευνόησε την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας καθώς περιέχει ιχνοστοιχεία μετάλλων (πίνακας 5), τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Amor, Kennes και Veiga, 2001), καθώς επίσης και σίδηρο (Fe) σε συγκέντρωση ικανή ώστε να ενισχύσει την ανάπτυξη της κυτταρικής βιομάζας (Singh, et al., 2012). Η αύξηση αυτή των μικροοργανισμών μπορεί να παρατηρηθεί από τα αποτελέσματα (πίνακας 17), όπου ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών στη δοκιμή UL2 παρουσιάζονται μεγαλύτερα από τη UL1. Η L-a-Lecithin, λοιπόν, που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ως μέσο βιοαποδόμησης-πηγή φωσφόρου και παρουσιάζει το μειονέκτημα του υψηλού κόστους (πίνακας 6), μπορεί να αντικατασταθεί από την εμπορική λεκιθίνη Bolec Zt χαμηλού κόστους κατά τη μέθοδο της βιοδιέγερσης.

Η χρήση της εμπορικής λεκιθίνης Bolec Zt, λόγω της ιδιότητάς της να ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, φέρεται να ευνόησε το σχηματισμό βιοφίλμ, κατά τη διάρκεια των δύο πειραματικών σχεδιασμών. Το γεγονός αυτό

διαπιστώνεται στα σχήματα 32, 33, 51, 52 και 53, που παρατηρείται ο σχηματισμός βιοφίλμ στις δοκιμές UL, B36L και UL2. Εξαίρεση αποτελεί η δοκιμή ULB με τη χρήση της επιφανειοδραστικής ένωσης, η οποία διασπείρει τα σταγονίδια του πετρελαίου και εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων γύρω από τα σταγονίδια και συνεπώς τον σχηματισμό βιοφίλμ.

Με τη χρήση του μικροσκοπίου CLSM επιτυγχάνεται ο χαρακτηρισμός των δοκιμών που περιέχουν ουρικό οξύ και λεκιθίνη Bolec Zt μετά από 56 ημέρες παρακολούθησης. Επιβεβαιώνεται, επίσης, η ύπαρξη βιοφίλμ στα δείγματα (σχήματα 56-58).

Επιπρόσθετα, χαρακτηρίζεται η μικροβιακή κοινότητα των δειγμάτων, με τη χρήση της μεθόδου της πολυδιάστατης διαβάθμισης και τους δείκτες βιοποικιλότητας. Συνεπώς, προκύπτει ότι η σύνθεση της τελικής μικροβιακής κοινότητας των δειγμάτων (56 ημέρες) επηρεάζεται από τη λεκιθίνη Bolec Zt (αποστειρωμένη ή μη). Στην περίπτωση της μη αποστειρωμένης λεκιθίνης οι μικροοργανισμοί που περιέχονται σε αυτήν εξαρχής (πίνακας 16) αλληλεπιδρούν με τους ενδογενείς αποδομητές και διαφοροποιούν τη σύνθεση της τελικής κοινότητας. Ακόμα, επιβεβαιώνεται ότι η ανάπτυξη πολλών διαφορετικών μικροβιακών ειδών ευνοείται στο στρώμα του βιοφίλμ σε σχέση με την υγρή φάση του δείγματος.

Παρά το γεγονός ότι οι δοκιμές UL (1<sup>ο</sup> πείραμα) και UL2 (2<sup>ο</sup> πείραμα) περιέχουν και οι δύο ουρικού οξύ και εμπορική λεκιθίνη Bolec Zt διαφέρουν στο ποσοστό αποδόμησης στις 28 ημέρες παρακολούθησης. Το ποσοστό για την δοκιμή UL είναι 16%, ενώ για τη δοκιμή UL2 υπολογίζεται 30%. Αυτή η διαφορά μεταξύ παρόμοιων δειγμάτων αποδίδεται στο γεγονός ότι τα πειράματα διεξάγονται σε διαφορετικές εποχές. Ο πληθυσμός των αποδομητών πετρελαίου αυξάνεται κατά τη διάρκεια των θερμότερων μηνών του έτους, δηλαδή από τον Απρίλιο έως τον Οκτώβριο (Groudeva, Groudev και Doycheva, 2001). Η διαδικασία δειγματοληψίας του θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο, αφού είχε βρέξει, για τη δοκιμή UL και τον Ιούνιο για τη δοκιμή UL2. Έτσι, το θαλασσινό νερό του 1ου πειραματικού σχεδιασμού περιέχει χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση ενδογενών αποδομητών πετρελαίου και οδηγεί στη καθυστέρηση της έναρξης αποδόμησης των υδρογονανθράκων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο 1<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμού η βιοδιέγερση μελετήθηκε για το χρονικός εύρος 28 ημερών, ενώ στο 2<sup>ο</sup> για 56 ημερών. Το γεγονός αυτό δίνει διαφορετικούς ρυθμούς αποδόμησης και ανάπτυξης μεταξύ των δύο σχεδιασμών και δεν μπορεί να αποδώσει ασφαλές συμπέρασμα κατά την αξιολόγηση της επιτυχίας της βιοδιέγερσης του 1<sup>ου</sup> σχεδιασμού συγκριτικά με του 2<sup>ου</sup>.

Επιπλέον, επιβεβαιώνεται ότι τα κορεσμένα κλάσματα του πετρελαίου διασπώνται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα κλάσματα των αρωματικών ενώσεων και η βιοαποδόμηση ακολουθεί το μοτίβο:  $C_{15} > C_{20} > C_{25} > C_{30} >$  Πριστάνιο, Φυτάνιο  $> C_{35}$ , PAHs (πίνακας 12, 13, 14 και 15). Τα n-αλκάνια με μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας και διακλαδώσεις αυξάνουν την αντίσταση των υδρογονανθράκων κατά τη μικροβιακή κατανάλωση (Saadoun, 2002). Επίσης, η ελάχιστη αποδόμηση των ρητινών και PAHs αποδίδεται στο μικρό αριθμό αποδομητών πετρελαίου, ο οποίος προκλήθηκε από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη μείωση των κορεσμένων ενώσεων του πετρελαίου. Τέλος, οι ενώσεις Πριστάνιο και Φυτάνιο, εφόσον παρουσιάζουν ποσοστό αποδόμησης δεν θα πρέπει να θεωρούνται αξιόπιστοι δείκτες βιοαποδόμησης (σχήμα 45 και 47).

Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη επιτυγχάνεται η βιοδιέγερση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων με τη χρήση μέσων χαμηλού κόστους, μη τοξικών, βιοδιασπώμενων και φιλικών προς το περιβάλλον. Επιπλέον, γίνεται σύγκριση αυτών με τα μέσα που χρησιμοποιούνταν μέχρι σήμερα, τα οποία μπορεί να είναι αποδοτικά, όμως έχουν το μειονέκτημα του υψηλού κόστους. Ακόμα, επιτυγχάνεται βιοδιέγερση με τη χρήση επιφανειοδραστικής ένωσης βιολογικής προέλευσης χαμηλού κόστους. Τα αποτελέσματα της βιοδιέγερσης θεωρούνται ικανοποιητικά σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Παρόλα αυτά για να γίνει βιώσιμη η μελέτη θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν, τόσο το απαιτούμενο κόστος αποκατάστασης, όσο και το διαθέσιμο χρονικό περιθώριο αποκατάστασης της θαλάσσιας ρύπανσης.

Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την εκτίμηση της βιοδιέγερσης με μέσα χαμηλού κόστους, θρεπτικά συστατικά σε συνδυασμό με επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης, όχι μόνο στη θαλάσσια επιφάνεια αλλά και στις περιοχές που βρίσκονται σε μεγάλα βάθη κάτω από την επιφάνεια αυτή. Τέλος, προτείνεται η περαιτέρω μελέτη του βιοφίλμ που σχηματίστηκε με τη χρήση της λεκιθίνης Bolec Zt στο υπόστρωμα του πετρελαίου για περιβαλλοντικές εφαρμογές.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καλογεράκης, Ν., 2010. *Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος Ειδικά Θέματα Βιοχημικής Μηχανικής Biofilms*. [pdf]. Διαθέσιμο σε: < <https://www.eclass.tuc.gr/> >.

Atlas R. M., 1988. *Biodegradation of hydrocarbons in the environment*. Εκδόσεις: Springer Science, Business Media New York.

Atlas, R. M., 1981. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective*. [pdf] Διαθέσιμο σε: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281502/> >.

Amor L., Kennes C. and Veiga M. C., 2001. *Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400001826>>.

Al-Tahhan R. A., Sandrin T. R., Bodour A. A. and Maier R.M., 2000. *Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://aem.asm.org/content/66/8/3262.full.pdf+html>>.

Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S., 2000. *Cameotra potential commercial applications of microbial surfactants*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002530051648#page-1>>.

Brookfield, 2008. *Ocean Pollution*. [διαδίκτυο] Διαθέσιμο σε: <<http://kanat.jsc.vsc.edu/student/brookfield/setup.htm>>.

Bossert, I. and Bartha, R., 1984. *The fate of petroleum in soil ecosystems*. Εκδόσεις: Macmillan Publishing Company, New York.

Cerniglia C. E., 1992. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-1672-5\\_16#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-1672-5_16#page-1)>.

Congressional Research Service, 2015. *Resources, Science and Industry Division* [διαδίκτυο] <<http://www.loc.gov/crsinfo/>>.

Denkhaus E., Meisen S., Telgheder U. και Wingerder J., 2006. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00604-006-0688-5>>.

Englezos P. and Kalogerakis N., 2001. *Applied parameter estimation for chemical engineers*. Εκδόσεις: MARCEL DEKKER INC .

Etkin D. S., 1999. *ESTIMATING CLEANUP COSTS FOR OIL SPILLS*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <[http://www.thebanninginformer.com/wp-content/uploads/2011/12/ERC\\_paper\\_1.pdf](http://www.thebanninginformer.com/wp-content/uploads/2011/12/ERC_paper_1.pdf)>.

EPA, 2013. *Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test* 40 CFR Part 300 Appendix C. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.gpo.gov/fdsys/granule/CFR-2011-title40-vol28/CFR-2011-title40-vol28-part300-appC>>.

EMEC, 2015. *Oil spill dispersants*. [εικόνα στο διαδίκτυο]. Διαθέσιμο σε: <<http://www.emec.com.eg/products-services/production-chemicals/oil-spill-dispersants>>.

Evers K. U, Jensen H. V, Resby J. M, et al., 2004. *State of the art report on oil weathering and on the effectiveness of response alternatives*. Εκδόσεις: Growth Project, GRD.

Greenpeace, 2010. *Greenpeace confronts reckless oil exploration*. [εικόνα στο διαδίκτυο]. Διαθέσιμο σε: <<https://www.greenpeace.org.au/blog/greenpeace-confronts-reckless-oil-exploration/>>.

Groudeva V.I, Groudev S. N. and Doycheva A. S., 2001. *Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301751600000600>>.

ITOPF, 2015. *Oil tanker statistics 2014*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <[http://www.itopf.com/fileadmin/data/Documents/Company\\_Lit/Oil\\_Spill\\_Stats\\_2014FINALlowres.pdf](http://www.itopf.com/fileadmin/data/Documents/Company_Lit/Oil_Spill_Stats_2014FINALlowres.pdf)>.

Koren O., Knezevic V., Ron E. Z. and Rosenberg E., 2003. *Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532103>>.

Keylock C. J., 2005. *Simpson diversity and the Shannon-Wiener index as special cases of a generalized entropy*. [pdf] Διαθέσιμο σε: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0030-1299.2005.13735.x/epdf>>.

Leahy, J.G. and Colwell, R.R., 1990. *Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2215423>>.

Moran, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., Sineriz, F., 2000. *Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from Bacillus subtilis O9*.

Biodegradation 11. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1026513312169>>.

Moore E., Arnscheidt A., Kruger A., Strompl C. and Mau M., 2004. *Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures*. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<[http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-1-4020-2177-0\\_101](http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-1-4020-2177-0_101)>.

Nikolopoulou M. and Kalogerakis N., 2009. *Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons*. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.2182/pdf>>.

Nikolopoulou M. and Kalogerakis N., 2008. *Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses*. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X08003883>>.

Nikolopoulou M. and Kalogerakis N., 2011. *Petroleum Spill Control with Biological Means*. [pdf].

NOAA, 2010. *Spill Containment Methods*. [εικόνα στο διαδίκτυο] Διαθέσιμο σε:  
<<http://response.restoration.noaa.gov/oil-and-chemical-spills/oil-spills/spill-containment-methods.html>>.

Petrova, O. E. και Sauer, K., 2012. *Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment* [pdf]. Διαθέσιμο σε: < <http://jb.asm.org/content/194/10/2413.full.pdf> >.

Prince RC, Bare RE, Garrett RM, et al., 2003. *Bioremediation. The Roles of Photooxidation and Biodegradation in Long-term Weathering of Crude and Heavy Fuel Oils*. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1353256103000173>>.

Prince, R.C., 1993. *Petroleum spill bioremediation in marine environments*. [pdf] Διαθέσιμο σε:  
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408419309113530#.VYBIhfmqqko> >.

Rosenberg, E. and Ron, E.Z., 1996. *Bioremediation: principles and Applications*. Εκδόσεις: Cambridge University Press, UK.

Ribeiro H., Mucha A.P, Almeida M.R. and Bordali A.A., 2013. *Bacterial community response to petroleum contamination and nutrient addition in sediments from a temperate salt marsh*. [pdf] Διαθέσιμο σε:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707865> >.

Saadoun I., 2002. *Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel*. [pdf] <Διαθέσιμο σε: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442304> >.

Sandrin T. R. and Maier R. M., 2003. *Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241557/> >.

Santas R and Santas P., 2000. *Effects of wave action on the bioremediation of crude oil saturated hydrocarbons*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X99002398> >.

Sahil K., Prashaut B., Akanksha M., Premjeet S. and Devashish R., 2011. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/464>>.

Speight J., 2014. *The chemistry and technology of petroleum*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <<https://www.crcpress.com/product/isbn/9781439873892> >.

Singh S. N., Kumari B. and Mishra S., 2012. *Microbial Degradation of Alkanes*. [pdf] Διαθέσιμο σε: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-23789-8\\_17#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-23789-8_17#page-1) >.

Vert, M., Doi, Y., Hellwich K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. και Schue, F., 2012. *Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*. [pdf]. Διαθέσιμο σε: <<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2012/pdf/8402x0377.pdf> >.

USCG, 2010. *Spilled Oil Recovery System*. [εικόνα στο διαδίκτυο]. Διαθέσιμο σε: <<http://www.uscg.mil/hq/nswfweb/nsf/nsfcc/ops/ResponseSupport/Equipment/sorsindex.asp> >.

Wrenn A, Venosa AD., 1996. *Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure*. [pdf]. Διαθέσιμο σε : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8868232> >.

Wrenn B. A, Haines J. R, Venosa A. D, Kadkhodayan M. and Suidan M. T., 1994. *Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation*. [pdf]. Διαθέσιμο σε: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01569729#page-1>>.

World ocean review, 2015. Oil and gas. [εικόνα στο διαδίκτυο]. Διαθέσιμο σε: <<http://worldoceanreview.com/en/wor-3-overview/oil-and-gas/oiling-the-oceans/>>.

Zhu X., Venosa A.D., Suidan M and Kenneth L., 2001. *GUIDELINES FOR THE BIOREMEDIATION OF MARINE SHORELINES AND FRESHWATER WETLANDS*. Εκδόσεις: U.S. Environmental Protection Agency.