

# ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Διπλωματική εργασία

<<Βιοαποδόμηση IFO 180 με θαλάσσιους αποδομητές υδρογονανθράκων απομονωμένους από περιβάλλον με χρόνια ρύπανση.>>

**ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ ΤΣΙΟΤΑΛΑΚΙΔΗΣ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

**ΠΑΣΑΔΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ , ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την υποστήριξη ορισμένων προσώπων που θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Τον **κ. Καλογεράκη Νικόλαο**, καθηγητή Πολυτεχνείου Κρήτης και επιβλέποντα την εργασίας για την επιλογή του θέματος, τις συμβουλές του σε όλη την διάρκεια του πειράματος, την διόρθωση της εργασίας καθώς και για την άριστη συνεργασία και επικοινωνία.

Τον **κ. Πασαδάκη Νικόλαο**, καθηγητή Πολυτεχνείου Κρήτης, για την άριστη συνεργασία τις συμβουλές του, για την διόρθωση και εξέταση της εργασίας.

Την **κα. Βενιέρη Δανάη** για την άριστη επικοινωνία καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε για την διόρθωση και εξέταση της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την κα. **Νικολοπούλου Μαρία** μεταδιδακτορική στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγηση καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της και την βοήθεια της σε όλη την διάρκεια της εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. **Χαμηλάκη Ελένη** υπεύθυνη του εργαστηρίου Ανάλυσης Ρευστών και Πυρήνων Υπογείων Ταμιευτήρων για τις συμβουλές της και την υποστήριξη σε όλη την διάρκεια του πειράματος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την **οικογένεια μου** για την στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση σε όλες τις επιλογές και τις προσπάθειες μου.

## Περίληψη

Οι διαρροές του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον , κατά την μεταφορά του , την αποθήκευση αλλά και κατά την εξόρυξη του έχουν αποτελούν στις μέρες σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Στη παρούσα διπλωματική , πραγματοποιήθηκε βιοδιέγερση αποδομητών με θρεπτικά (  $\text{KNO}_3\text{-KH}_2\text{PO}_4$  ), οι οποίοι απομονώθηκαν από θαλάσσια περιοχή (Λιμανάκι Αγίου Νικολάου , Κερατσίνι , Πειραιάς) η οποία είναι εκτεθειμένη σε χρόνια ρύπανση με πετρέλαιο Μαζούτ. Στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η έρευνα της αποτελεσματικότητας των βιοδιεγερμένων αποδομητών απέναντι σε πετρέλαιο IFO 180 , καθώς και τα αποτελέσματα με την προσθήκη επιφανιοδραστικών ουσιών( dispersant , bio-surfactant) οι οποίες διασπούν το οργανικό φορτίο για ευκολότερη αποδόμηση του.

Κατά την πειραματική διαδικασία εξετάστηκαν 3 πειραματικοί σχεδιασμοί και είχε διάρκεια 112 ημερών. Ο πρώτος , περιείχε μόνο τους αποδομητές και θρεπτικά συστατικά για βιοδιέγερση. Ο δεύτερος , περιείχε του αποδομητές , θρεπτικά συστατικά και ένα dispersant με το όνομα Marichem , το οποίο αποτελεί χημική μη τοξική ουσία για το θαλάσσιο περιβάλλον. Ο τρίτος σχεδιασμός περιείχε του αποδομητές , θρεπτικά συστατικά και ένα bio-surfactant με το όνομα New Chery το οποίο είναι βιολογικής προέλευσης.

Η αποτελεσματικότητα τους εκτιμήθηκε σύμφωνα με τις μεταβολές των συγκεντρώσεων στα χαρακτηριστικά του πετρελαίου , τόσο στα κανονικά αλκάνια όσο και σε επιλεγμένα αρωματικά.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα έδειξαν ανικανότητα των μικροοργανισμών με την προσθήκη θρεπτικών να διασπάσουν συστατικά του πετρελαίου , σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της προσθήκης του bio-surfactant New Chery όπου υπάρχουν ποσοστά αποδόμησης. Η ουσία Marichem κρίνεται ως τοξική για τους συγκεκριμένους οργανισμούς.

## Περιεχόμενα

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Πετρέλαιο και περιβάλλον .....   | 6  |
| 1.1   | Ιστορία του πετρελαίου .....   | 6  |
| 1.2   | Χημική σύσταση πετρελαίου. ....  | 7  |
| 1.3   | Φυσικές και χημικές ιδιότητες του πετρελαίου .....                                   | 9  |
| 1.4   | Ατυχήματα και πετρελαιοκηλίδες.....  | 10 |
| 1.5   | Ατυχήματα που προκάλεσαν διαρροή πετρελαίου στο περιβάλλον. ....                     | 13 |
| 1.6   | Διεργασίες γύρασης πετρελαιοκυλίδων. ....  | 16 |
| 1.7   | Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων. ....                                     | 17 |
| 1.7.1 | Φυσική βιοεξυγίανση.....   | 17 |
| 1.7.2 | Ανάκτηση του πετρελαίου με την χρήση Skimmer και Booms.....                          | 17 |
| 1.7.3 | Μέθοδος ελεγχόμενης καύσης .....   | 17 |
| 1.7.4 | Χημικές Ουσίες διασποράς .....   | 18 |
| 1.7.5 | Βιολογικές μέθοδοι εξυγίανσης πετρελαιοκηλίδων.....                                  | 19 |
| 2     | Πειραματική διαδικασία .....   | 21 |
| 2.1   | Υλικά και εξοπλισμός .....   | 21 |
| 2.2   | Προετοιμασία πετρελαίου .....  | 22 |
| 2.3   | Μικροβιακά Consortia.....  | 22 |
| 2.4   | Επιφανειακές Δραστικές Ουσίες (bio surfactants-dispersants ).....                    | 22 |
| 2.5   | Προετοιμασία δείγματος .....   | 23 |
| 2.6   | Μικροβιολογική ανάλυση .....   | 23 |
| 2.7   | Μικροβιακή απαρίθμηση.....   | 24 |
| 2.7.1 | Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων .....   | 24 |
| 2.7.2 | Μέτρηση πληθυσμού μικροοργανισμών στα τριβλία Petri (plate counts) ....              | 25 |
| 2.7.3 | Μέθοδος MPN.....   | 26 |
| 2.8   | Χημική ανάλυση της σύστασης του πετρελαίου .....                                     | 27 |
| 2.8.1 | Εκχύλιση υγρής – υγρής φάσης (Liquid Liquid Extraction-LLE).....                     | 27 |
| 2.8.2 | Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction-SPE)- Κλασματοποίηση πετρελαίου ..... | 28 |
| 2.8.3 | GC/MS Ανάλυση.....   | 29 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3     | Επεξεργασία και σχολιασμός αποτελεσμάτων .....              | 31 |
| 3.1   | Δείγμα Control ( C ) .....                                  | 31 |
| 3.1.1 | Αναλύσεις GC/MS.....  | 31 |
| 3.1.2 | Αναλύσεις MPN (Most Probable Number).....                   | 33 |
| 3.2   | Δείγμα Marichem ( MAR ) .....                               | 34 |
| 3.2.1 | Αναλύσεις GC/MS.....  | 34 |
| 3.2.2 | Αναλύσεις MPN (Most Probable Number).....                   | 35 |
| 3.3   | Δείγμα NEW CHERRY ( NEW ).....                              | 36 |
| 3.3.1 | Αναλύσεις GC/MS.....  | 37 |
| 3.3.2 | Αναλύσεις MPN (Most Probable Number).....                   | 39 |
| 3.4   | Συγκριτικά αποτελέσματα Control , Marichem , New Chery..... | 41 |
| 3.5   | Συμπεράσματα .....  | 42 |
| 4     | Βιβλιογραφία.....   | 43 |

# 1 Πετρέλαιο και περιβάλλον

## 1.1 Ιστορία του πετρελαίου

Το πετρέλαιο πρόκειται για ένα παχύρευστο υγρό πέτρωμα , με χρώμα μαύρο , καφετί ή πρασινωπό. Το αργό πετρέλαιο , όπως ονομάζεται η ακατέργαστη μορφή του , αποτελείται από υδρογονάνθρακες με διαφορετικά μοριακά βάρη , και άλλες οργανικές ενώσεις.

Η πρώτη γεώτρηση πετρελαίου με τρυπάνι (που δούλευε με ατμό) πραγματοποιήθηκε το 1859 στην Πενσυλβάνια των Η.Π.Α από την εταιρία Pennsylvania Rock Oil Company του Κονέκτικατ (αργότερα μετονομάστηκε σε Seneca Oil Company) όπου και σήμανε την έναρξη της πιο επικερδής βιομηχανίας.

Το 1870 ιδρύθηκε από τον John Rockefeller ή Standard Oil Company όπου μετατράπηκε σε εταιρία κολοσσό για την βιομηχανία μέχρι το 1911 όπου και έληξε η λειτουργία της από το Ανώτατο Δικαστήριο των Η.Π.Α με την κατηγορία για παράνομα μονοπώλιο. Έκτοτε διασπάστηκε σε μικρότερες εταιρίες με τις μετέπειτα ονομασίες του να είναι γνωστές ως Exxon (Standard Oil of New Jersey) , Chevron (Standard Oil of California), British Petroleum (Standard Oil of Ohio) κ.α.

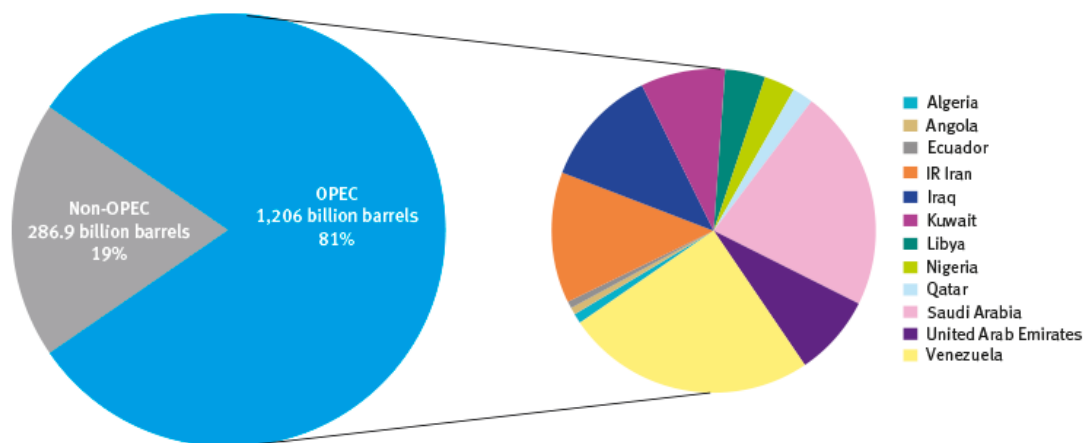
Ωστόσο μέχρι το 1910, σημαντικά αποθέματα πετρελαίου είχαν ανακαλυφθεί σε Καναδά, Σουμάτρα, Περσία, Περού, Βενεζουέλα Ρωσία και Μεξικό.

Το μεμονωμένο γεγονός που θα τόνωνε καθοριστικά τη βιομηχανία του πετρελαίου δεν ήταν άλλο από τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, με το πετρέλαιο να γίνεται πλέον το καύσιμο της νέας εποχής και να μετατρέπει την πετρελαϊκή βιομηχανία σε ζωτικό κλάδο την κοινωνίας.

Σήμερα το πετρέλαιο αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας με την καθημερινή παραγωγή να αυξάνεται συνέχεια και σήμερα να αγγίζει παγκόσμιος περίπου τα 80 εκατομμύρια βαρέλια [1] και το μεγαλύτερο μέρος των αποθεμάτων να ελέγχει ο Οργανισμός Πετρελαιοπαραγωγών Εξαγωγών Χωρών ( OPEC) [2] όπου επάγονται χώρες της Μ. Ανατολής , της Αραβίας και της Λατινικής Αμερικής.

Κατά την επεξεργασία του αργού πετρελαίου σε εγκαταστάσεις διύλισης , παράγονται προϊόντα όπως νάφθα, βενζίνη, καύσιμο ντίζελ, ασφαλτος, πετρέλαιο θέρμανσης, κηροζίνη υγραέριο καθώς και ενώσεις που είναι πρώτες ύλες για πετροχημικές διεργασίες που παράγουν τέτοια προϊόντα όπως πλαστικά, απορρυπαντικά, διαλύτες, ελαστομερή καθώς και ίνες όπως νάιλον και πολυεστέρες.

## OPEC share of world crude oil reserves, 2014



OPEC proven crude oil reserves, at end of 2014 (billion barrels, OPEC share)

|              |        |       |        |        |       |         |       |      |         |       |      |
|--------------|--------|-------|--------|--------|-------|---------|-------|------|---------|-------|------|
| Venezuela    | 299.95 | 24.9% | Iraq   | 143.07 | 11.9% | Libya   | 48.36 | 4.0% | Algeria | 12.20 | 1.0% |
| Saudi Arabia | 266.58 | 22.1% | Kuwait | 101.50 | 8.4%  | Nigeria | 37.07 | 3.1% | Angola  | 8.42  | 0.7% |
| IR Iran      | 157.53 | 13.1% | UAE    | 97.80  | 8.1%  | Qatar   | 25.24 | 2.1% | Ecuador | 8.27  | 0.7% |

Source: OPEC Annual Statistical Bulletin 2015.

Εικόνα 1 Παγκόσμια αποθέματα πετρελαίου και οι χώρες όπου ανήκουν.

## 1.2 Χημική σύσταση πετρελαίου.

Το αργό πετρέλαιο αποτελείται από ενώσεις υδρογονανθράκων όπου αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του ( 50-98%) και από ετεροενώσεις – μη υδρογονανθράκων που περιέχουν άζωτο – θείο οξυγόνο και ίχνη διαφόρων μετάλλων όπως σίδηρος , χαλκός , νικέλιο κ.α.

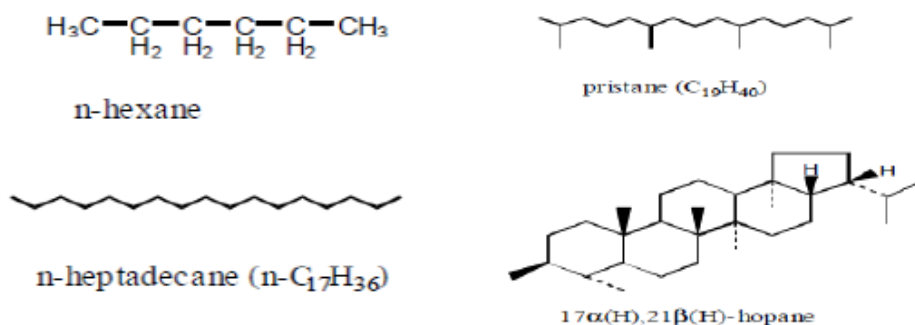
Η τυπική σύσταση του πετρελαίου κατά βάρος κυμαίνεται στα παρακάτω επίπεδα:

| Στοιχείο | Περιεκτικότητα κ.β% |
|----------|---------------------|
| Άνθρακας | 83 - 85%            |
| Υδρογόνο | 10 -14%             |
| Άζωτο    | 0.1 - 2%            |
| Οξυγόνο  | 0.05 -1.5%          |
| Θείο     | 0.05 - 6.0%         |
| Μέταλλα  | < 0.1%              |

Πίνακας 1Τυπική σύσταση πετρελαίου

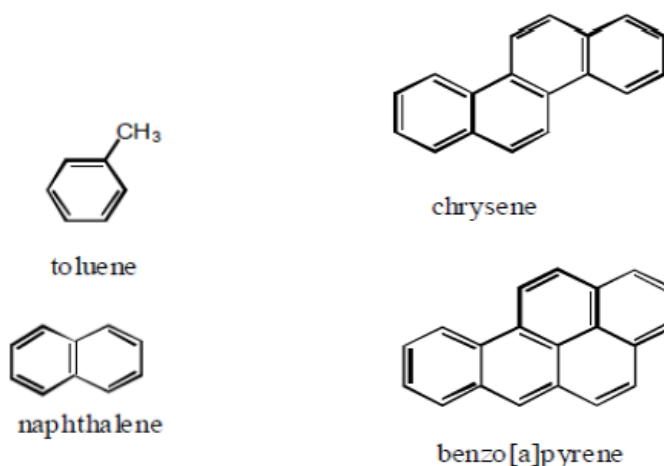
Οι υδρογονάνθρακες ταξινομούνται σε 4 μεγάλες κατηγορίες με βάση την διαλυτότητα του σε οργανικούς διαλύτες: Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες , αρωματικοί υδρογονάνθρακες , ρητίνες και ασφαλτένια.

**Κορεσμένοι :** περιλαμβάνουν τα αλκάνια και τα κυκλοαλκάνια και είναι οι απλές οργανικές ενώσεις όπου υπάρχουν σε αφθονία στο αργό πετρέλαιο. Ο χημικός τύπος ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα που περιέχουν (κυμαίνεται από 1-60 άτομα) είναι  $C_nH_{2n+2}$ .



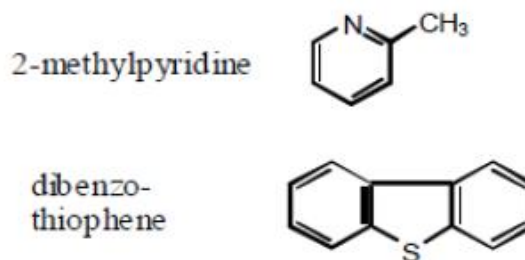
Εικόνα 2 Αντιπροσωπευτικοί κορεσμένοι υδρογονάνθρακες που υπάρχουν στο αργό πετρέλαιο.

**Αρωματικοί υδρογονάνθρακες :** Είναι οι μονοκυκλικές ενώσεις με δακτυλίους βενζολίου ή παρόμοιων δομικών συστημάτων (τολουόλιο, ξυλολία) καθώς και πολυκυκλές ενώσεις αρωματικών ( PAHS) όπως η ναφθαλίνη, το ανθρακένιο και το φενανθένιο όπου διαθέτουν δύο ή περισσότερους συμπυκνωμένους αρωματικούς δακτυλίους. Τα PAHs τείνουν ιδιαίτερης προσοχής καθώς είναι καρκινογόνες ουσίες.



Εικόνα 3 Αντιπροσωπευτικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που υπάρχουν στο αργό πετρέλαιο.

**Ρητίνες:** περιλαμβάνουν πολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο , θείο , οξυγόνο.



Εικόνα 4 Αντιπροσωπευτικές ρητίνες του αργού πετρελαίου.

**Ασφαλτένια:** Ενώσεις με υψηλό μοριακό βάρος που περιέχουν άζωτο , θείο , οξυγόνο. Έχουν πολλαπλές δομές και απαρτίζονται από αλυσίδες υδρογονανθράκων και συχνά συνδέονται με μέταλλα όπως το νικέλιο το βαδάνιο και ο σίδηρος.

### 1.3 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του πετρελαίου

**Πυκνότητα:** Η πυκνότητα του αργού πετρελαίου , με την πιο συνηθισμένη χρήση αυτήν της ειδικής πυκνότητας κυμαίνεται από 0,73-1,04 gr/cm<sup>3</sup>. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε ελαφριούς ( παραφινικούς) υδρογονάνθρακες υποδηλώνει πετρέλαιο χαμηλής πυκνότητας και αντίστοιχα μεγάλη περιεκτικότητα σε βαριούς υδρογονάνθρακες ( ναφθενικούς / αρωματικούς) υποδηλώνει πετρέλαιο υψηλής πυκνότητας. Η πυκνότητα του πετρελαίου αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη που λαμβάνεται υπόψιν για την μελέτη της συμπεριφοράς του στο νερό.

**Ιξώδες:** Η τιμή του ιξώδες του πετρελαίου εξαρτάται από την σύνθεση του καθώς και από την θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποτελεί δείκτη για τον ρυθμό εξάπλωσης μια πετρελαιοκηλίδας.

**Σημείο Ροής:** Το σημείο ροής του πετρελαίου είναι η θερμοκρασία στη οποία το πετρέλαιο γίνεται ημιστερεό ή σταματά να ρέει και αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για τον καθορισμό του. Για το αργό πετρέλαιο το σημείο ροής κυμαίνεται από -57°C – 32 °C .

**Διαλυτότητα στο νερό:** Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι εξαιρετικά χαμηλή και διαφέρει ανάλογα με την χημική του καθώς και την θερμοκρασία. Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με την τοξικότητα του πετρελαίου και τις διεργασίες βιοεξυγίανσης. Η τιμή της διαλυτότητας κυμαίνεται στα 30 mg/L

**Σημείο ανάφλεξης:** Ονομάζεται η κατώτερη θερμοκρασία στην οποία είναι δυνατή η ανάφλεξη μίγματος ατμών πετρελαίου με αέρα, όταν θερμαίνεται σε

συγκεκριμένες συνθήκες. Το σημείο ανάφλεξης κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα , κάτω από 38,7 °C , καθιστώντας το εξαιρετικά εύφλεκτο.

#### 1.4 Ατυχήματα και πετρελαιοκηλίδες.

Οι συχνές διαρροές πετρελαίου προς το περιβάλλον έχουν ενισχύσει την ευαισθησία της κοινωνία σε περιβαλλοντικά θέματα και έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση τροπών αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων που δημιουργούνται.

Σύμφωνα με τις στατιστικές ασφαλιστικών εταιριών, 80% των ατυχημάτων των πετρελαιοφόρων που προκαλούν διαρροές πετρελαίου στη θάλασσα είναι αποτέλεσμα **ανθρώπινων σφάλματων**:

- κακή διαχείριση ελιγμών,
- παραμέληση συντήρησης,
- ανεπαρκή έλεγχο των συστημάτων,
- έλλειψη επικοινωνίας μεταξύ των μελών του πληρώματος,
- κόπωση,
- ανεπαρκή απόκριση σε ένα ασήμαντο περιστατικό με αποτέλεσμα να κλιμακωθεί σε ένα μεγάλο ατύχημα.

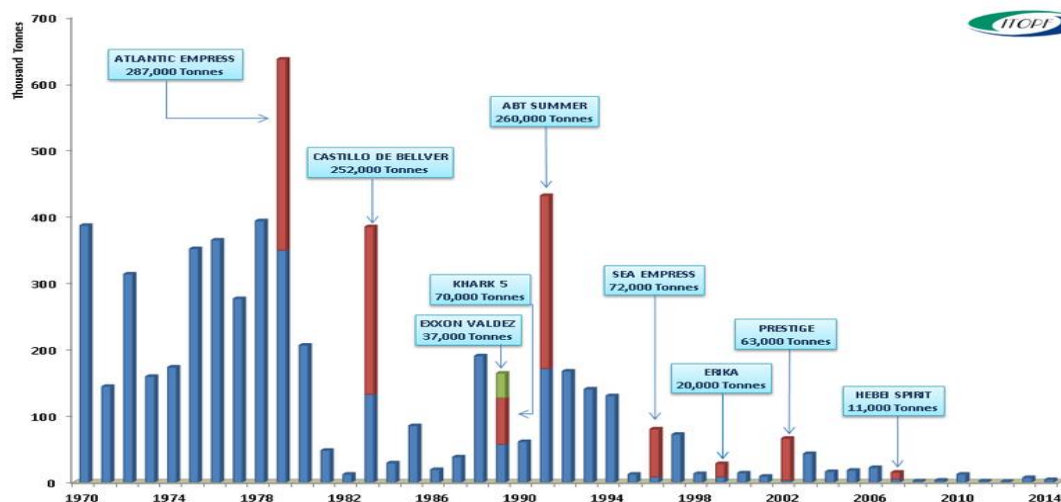
Στατιστικά τα ατυχήματα άνω των 700 των από το 1974 και μετά οφείλονται :

- 34% σε προσάραξη πλοίου σε ακτή
- 28% σε σύγκρουση μεταξύ πλοίων
- 13% Δομικές ζημιές στα πετρελαιοφόρα
- 9% διαρροή κατά την διαδικασία φόρτωσης και εκφόρτωσης
- 9% σε έκρηξη ή πυρκαγιά στο πλοίο
- 7% σε άλλα αίτια και αίτια που δεν έχουν γίνει γνωστά

Οι **συγκρούσεις** οφείλονται γενικά σε λανθασμένους ελιγμούς, ιδίως σε κακή ορατότητα και/ή απασχολημένη ναυτιλιακή περιοχή οδικής κυκλοφορίας.

**Η προσάραξη** επίσης είναι συχνά λόγω των λανθασμένων ελιγμών, που συχνά επιδεινώνονται από ισχυρούς ανέμους, ρεύματα και προκλητικές κακές καιρικές συνθήκες. Η προσάραξη του Sea Empress στην είσοδο του λιμένα Milford Haven, στην Ουαλία (Μεγάλη Βρετανία), είναι ένα τέτοιο παράδειγμα.

Όμως, οι βλάβες στον εξοπλισμό είναι μια πιο κοινή αιτία της προσάραξη από τις συγκρούσεις. Η προσάραξη του δεξαμενόπλοιου Braer στους Νήσους Shetland, στη Σκωτία (Μεγάλη Βρετανία), που προκλήθηκε από εισερχόμενο θαλασσινό νερό σε μια δεξαμενή καυσίμων, προκαλώντας βλάβη του κινητήρα, είναι ένα κλασικό παράδειγμα της τεχνικής βλάβης.



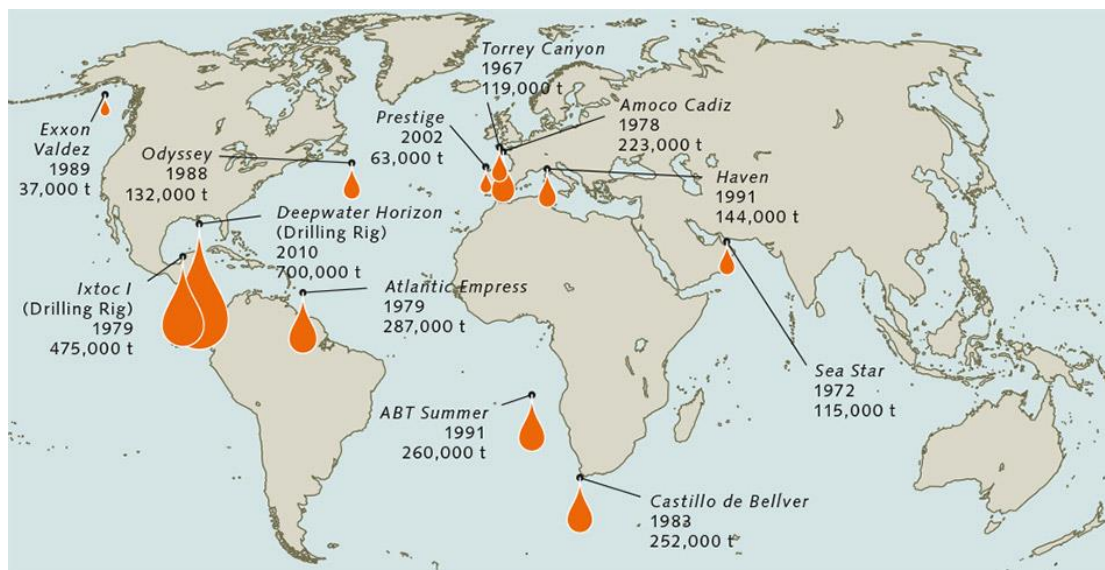
Εικόνα 5 Διαρροές πετρελαίου στην θάλασσα από το 1970 μέχρι σήμερα.

Ο Διεθνής Οργανισμός Ρύπανση των Ιδιοκτητών Πετρελαιοφόρων (ITOPF)[3] τηρεί μια ενημερωμένη βάση δεδομένων για τις πετρελαιοκηλίδες άνω των 700 τόνων, από τα πετρελαιοφόρα, μεταφορικά μεταλλεύματος και φορτηγίδες-δεξαμενές που έχουν συμβεί σε όλο τον κόσμο από το 1967. Παρέχονται επίσης πληροφορίες σχετικά με τις διάφορες πτυχές των διαρροών και τις συνέπειές τους.

Αυτά τα στοιχεία φέρνουν στο φως το γεγονός ότι λίγο περισσότερο από 5,5 εκατομμύρια τόνοι πετρελαίου διέρρευσαν στη θάλασσα σε όλου του κόσμου τις θάλασσες, από τα ατυχήματα των πετρελαιοφόρων κατά την περίοδο 30 χρόνων 1970-2000, συνολικού ύψους περίπου 182.000 τόνους ετησίως με τη μέγιστη τιμή των 287,000 τόνων το 1979.

| Shipname            | Year | Location   | Spill (tonnes) |
|---------------------|------|--|----------------|
| Atlantic Empress    | 1979 | Off Tobago, West Indies                          | 287,000        |
| ABT Summer          | 1991 | 700 nautical miles off Angola                    | 260,000        |
| Castillo de Bellver | 1983 | Off Saldanha Bay, South Africa                   | 252,000        |
| Amoco Cadiz         | 1978 | Off Brittany, France                             | 223,000        |
| Haven               | 1991 | Genoa, Italy                                     | 144,000        |
| Odyssey             | 1988 | 700 nautical miles off Nova Scotia, Canada       | 132,000        |
| Torrey Canyon       | 1967 | Scilly Isles, UK                                 | 119,000        |
| Sea Star            | 1972 | Gulf of Oman                                     | 115,000        |
| Irenes Serenade     | 1980 | Navarino Bay, Greece                             | 100,000        |
| Urquiola            | 1976 | La Coruna, Spain                                 | 100,000        |
| Hawaiian Patriot    | 1977 | 300 nautical miles off Honolulu                  | 95,000         |
| Independenta        | 1979 | Bosphorus, Turkey                                | 95,000         |
| Jakob Maersk        | 1975 | Oporto, Portugal                                 | 88,000         |
| Braer               | 1993 | Shetland Islands, UK                             | 85,000         |
| Khark 5             | 1989 | 120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco | 80,000         |
| Prestige            | 2002 | Off the Spanish coast                            | 77,000         |
| Aegean Sea          | 1992 | La Coruna, Spain                                 | 74,000         |
| Sea Empress         | 1996 | Milford Haven, UK                                | 72,000         |
| Katina P.           | 1992 | Off Maputo, Mozambique                           | 72,000         |
| Exxon Valdez        | 1989 | Prince William Sound, Alaska, USA                | 37,000         |

Εικόνα 6. Ατυχήματα που προκάλεσαν τις μεγαλύτερες διαρροές πετρελαίου



Εικόνα 7 Απεικόνιση στον παγκόσμιο χάρτη τοποθεσιών με μεγάλες διαρροές πετρελαίου.

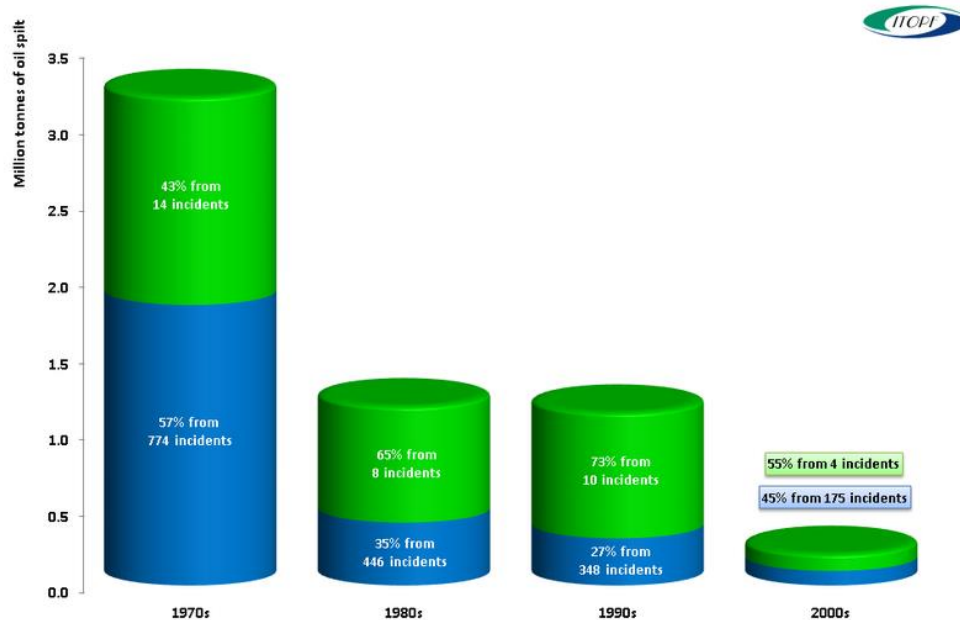
Οι πετρελαιοκηλίδες χωρίζονται σε τρεις βασικές ομάδες με βάσει τον όγκο του πετρελαίου που διαρρέει στη θάλασσα (700 tonnes). Οι πλειονότητα των ατυχημάτων (~85%) είναι 7 tonnes) από το 1970 έχει ως εξής:

| ΕΤΟΣ | 7-700 tonnes | >700 tonnes | ΕΤΟΣ | 7-700 tonnes | >700 tonnes |
|------|--------------|-------------|------|--------------|-------------|
| 1970 | 6            | 29          | 1990 | 50           | 13          |
| 1971 | 18           | 14          | 1991 | 27           | 8           |
| 1972 | 49           | 24          | 1992 | 31           | 9           |
| 1973 | 25           | 32          | 1993 | 30           | 11          |
| 1974 | 91           | 26          | 1994 | 27           | 7           |
| 1975 | 97           | 19          | 1995 | 20           | 3           |
| 1976 | 67           | 25          | 1996 | 20           | 3           |
| 1977 | 65           | 16          | 1997 | 27           | 10          |
| 1978 | 54           | 23          | 1998 | 22           | 4           |
| 1979 | 59           | 34          | 1999 | 19           | 5           |
| 1980 | 51           | 13          | 2000 | 18           | 3           |
| 1981 | 49           | 6           | 2001 | 16           | 3           |
| 1982 | 44           | 3           | 2002 | 12           | 3           |
| 1983 | 52           | 11          | 2003 |              |             |
| 1984 | 25           | 8           |      |              |             |
| 1985 | 29           | 8           |      |              |             |
| 1986 | 25           | 7           |      |              |             |
| 1987 | 27           | 10          |      |              |             |
| 1988 | 11           | 10          |      |              |             |
| 1989 | 32           | 13          |      |              |             |

Εικόνα 8 Καταμέτρηση ατυχημάτων με διαρροή μικρότερη των 700 τόνων και άνω των 700 τόνων την περίοδο 1970-2002

Στη δεκαετία του 1990 υπήρχαν 358 διαρροές των 7 τόνων και άνω, με αποτέλεσμα 1.133.000 τόνους πετρελαίου χυθεί. 73% του ποσού αυτού χύθηκε μέσα σε 10 επεισόδια.

Στη δεκαετία του 2000 υπήρχαν 179 διαρροές των 7 τόνων και άνω, με αποτέλεσμα 208.000 τόνους πετρελαίου χυθεί. 55% του ποσού αυτού χύθηκε σε μόλις 4 επεισόδια. Κατά την πενταετία 2010-2014 υπήρξαν 35 διαρροές των 7 τόνων και άνω, με αποτέλεσμα 26.000 τόνους πετρελαίου χυθεί. 90% του ποσού αυτού χύθηκε μέσα σε μόλις εννέα επεισόδια.



Εικόνα 9 Σύγκριση μεγέθους πετρελαιοκηλίδων από ατυχήματα <700 t και >700 t

## 1.5 Ατυχήματα που προκάλεσαν διαρροή πετρελαίου στο περιβάλλον.

### Exxon Valdez

Το πετρελαιοφόρο Exxon Valdez χτύπησε τον ύφαλο Blight στον Πορθμό Prince William στην Αλάσκα την 24<sup>η</sup> Μαρτίου του έτους 1989, καθώς μετέφερε 210.000 m<sup>3</sup> αργού (αδιύλιστο) πετρελαίου. Υπολογίζεται ότι το πλοίο έχυσε 37.000 τόνους αργού πετρελαίου στον πορθμό- το μέγεθος μιας τέτοιας καταστροφής ήταν πρωτοφανής και από τότε θεωρείται μια από τις χειρότερες περιβαλλοντικές καταστροφές από ανθρώπινα αίτια. Έρευνα στην αιτία του ατυχήματος ανέδειξε την αποτυχία του τρίτου αξιωματικού να χειριστεί το πλοίο, την αποτυχία του κυβερνήτη να εξασφαλίσει σωστή πορεία λόγω υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, και την αποτυχία της Εταιρείας Exxon να προμηθεύσει το κατάλληλο πλήρωμα.

Η πετρελαιοκηλίδα κάλυψε 1,300 μίλια ακτής και 11,000 τετραγωνικά μέτρα θάλασσας και ήταν η αιτία θανάτου τουλάχιστον 140 φαλακρών αετών, 302 φωκιών των λιμανιών (κοινή φώκια), 2800 θαλάσσιων βιδρών και 250,000 θαλασσοπουλιών μέσα σε λίγες μέρες εξαιτίας της απευθείας επαφής με το πετρέλαιο. Μακρόχρονη επίπτωση περιλαμβάνει την υπανάπτυξη του πληθυσμού του ροζ σολομού, που με

την σειρά του επηρεάζει αρνητικά τις φάλαινες δολοφόνους, των οποίων ο πληθυσμός μειώθηκε στο μισό τον επόμενο χρόνο. Έρευνα του πανεπιστημίου της Βόρειας Καρολίνας υπολόγισε ότι η ανάρρωση ορισμένων ειδών μπορεί να χρειαστεί ως και 30 χρόνια.

Τοπικοί πληθυσμοί και οι Ιθαγενείς Αμερικάνοι έχασαν την κύρια πηγή τροφής τους από φόβο δηλητηρίασης, ο οποίος συνεχίζει να επηρεάζει τις ζωές του μέχρι και σήμερα. Ακόμα η τουριστική βιομηχανία έκοψε 26,000 θέσεις εργασίας και έχασε \$2,4 δισεκατομμύρια έσοδα, η οποία δεν έχει ακόμη ανορθωθεί πλήρως καθώς οι περιοχές θεωρούνται ακόμα υψηλής ρυπάνσεως.



Εικόνα 10 Exxon Valdez , Αλάσκα, 1989[14].



Εικόνα 10 Exxon Valdez, Kodiak Island, Alaska, Αυτοψία ειδικών σε νεκρή γκρι φάλαινα.

## Prestige



Εικόνα 11 Η βύθιση του Prestige , Γαλικία, Ισπανία ,2002[19]

Στις 13 Νοεμβρίου του 2002, το πετρελαιοφόρο Prestige βούλιαξε 30 μίλια έξω από τις ακτές της Γαλικίας στην Βορειοδυτική Ισπανία. Το πετρελαιοφόρο μονού κελύφους μετέφερε 77.000 τόνους αργού πετρελαίου, από τα οποία υπολογίζετε ότι 63.000 τόνοι χύθηκαν στην θάλασσα. Ο καπετάνιος κατηγορήθηκε για ανυπακοή απέναντι στις ισπανικές αρχές, που έδωσαν εντολή για τη ρυμούλκηση του τάνκερ στην ανοιχτή θάλασσα. Οι δικηγόροι που εκπροσώπησαν τη ναυτιλιακή εταιρεία υποστήριξαν ότι η εντολή των ισπανικών αρχών να απομακρυνθεί το πλοίο από τις ακτές στην ανοιχτή θάλασσα, μετέτρεψε μια μικρή πετρελαιοκηλίδα σε μεγάλη

οικολογική καταστροφή. Αυτή η πετρελαιοκηλίδα ήταν μια από τις μεγαλύτερες ναυσιπλοηκές καταστροφές της Ευρωπαϊκής Ιστορίας, με περιβαλλοντικές καταστροφές συγκρίσιμες με αυτές που προκάλεσε το Exxon Valdez.

Η πετρελαιοκηλίδα κατά κύριο λόγο μόλυνε περίπου 1000χλμ Ισπανικής ακτής, καθώς επίσης και μέρη των Γαλλικών και Πορτογαλικών ακτών. Κατέστρεψε το οικοσύστημα των ακτών και την αλιεία .

### **DeepWater Horizon – Κόλπος του Μεξικού**

Η εξέδρα άντλησης πετρελαίου DeepWater Horizon εξερράγη την 20<sup>η</sup> Απριλίου 2010 και βυθίστηκε στις 22 Απριλίου 2010 προκαλώντας την μεγαλύτερη θαλάσσια πετρελαιοκηλίδα στην ιστορία. Υπολογίζετε ότι 700.000 τόνοι πετρελαίου χύθηκαν στον κόλπο του Μεξικού.

Η διαρροή προκάλεσε πετρελαιοκηλίδα που κάλυπτε 28,958 τετραγωνικά μίλια η οποία επιδρούσε σε μια περιοχή συνολικά 68,000 τετραγωνικών μιλίων με αποτέλεσμα πάνω από 37,000 άνθρωποι, 1.345 εκατομμύρια γαλιόνια διασποράς, 6,300 σκάφη και 6,7 εκατομμύρια πόδια φράγματος χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό.

Οι πραγματικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις της καταστροφής δεν είναι ακόμα γνωστές εξαιτίας του γεγονότος ότι η πετρελαιοκηλίδα συνέβη σε μεγάλο βάθος, και τα επηρεασμένα οικοσυστήματα σε μεγάλο βάθος είναι δυσκολότερα στο να παρακολουθούνται.

Το κόστος της ανταπόκρισης στο ατύχημα είχε υπολογιστεί στα \$11.2 δισεκατομμύρια αλλά καθώς οι αστικές δικαστικές υποθέσεις συνεχίζουν, ο αριθμός αυτός πιθανολογείτε ότι θα αυξηθεί σημαντικά. Η BP κατέληξε σε διακανονισμό με μια συμφωνία των \$7.8 δισεκατομμυρίων με την μεγαλύτερη ομάδα εναγόντων να μηνύουν την εταιρεία.



Εικόνα 12 Χρήση Boom , δέλτα Μισισσιπή , κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ , 2010



Εικόνα 12 Εξέδρα Deepwater Horizon , Κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ , 2010[17]



Εικόνα 14 Κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ , 2010



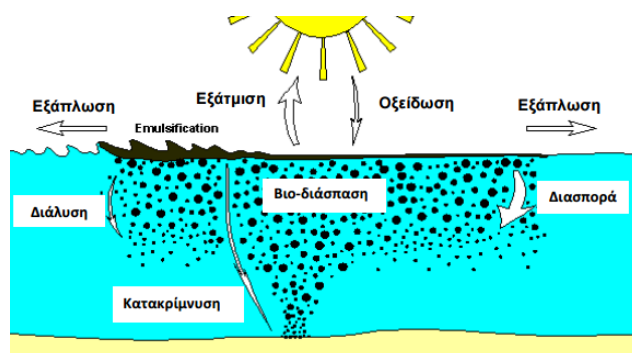
Εικόνα 13 Κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ , 2010

## 1.6 Διεργασίες γήρανσης πετρελαιοκηλίδων.

Όταν υπάρχει διαρροή πετρελαίου στη θάλασσα λαμβάνουν χώρα μια σειρά από φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες που σταδιακά θα αποκαταστήσουν το θαλάσσιο περιβάλλον. Οι αλλαγές που γίνονται στην σύνθεση του πετρελαίου κατά τις διαδικασίες αυτές ονομάζονται γήρανση του πετρελαίου( weathering process)[6] .

Οι διεργασίες όπου υποκαίτε το πετρέλαιο είναι:

- Εξάτμιση
- Διασπορά
- Γαλακτοποίηση
- Διάλυση
- Οξείδωση
- Κατακρήμνιση/ Καταβύθιση
- Βιοδιάσπαση (biodegradation)
- Συνδυασμός διεργασιών



Εικόνα 15 Διαδικασίες γήρανσης πετρελαίου

## 1.7 Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.

Για την αντιμετώπιση μιας θαλάσσιας ρύπανσης από διαρροή πετρελαίου μπορεί να ακολουθηθούν φυσικές , χημικές ή βιολογικές διεργασίες όπου θα καταλήξουν στην μείωση των συστατικών του. Η τεχνική που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το φυσικό περιβάλλον , καιρικές συνθήκες, το είδος του πετρελαίου , την πρόσβαση στο σημείο κ.α.

### 1.7.1 Φυσική βιοεξυγίανση.

Η μέθοδος ακολουθείται σε περιοχές όπου δεν βρίσκονται κοντά σε παράκτια ζώνη και το περιβάλλον διαθέτει αέρα , θαλάσσια ρεύματα και ηλιοφάνεια ώστε να εξατμιστεί το πετρέλαιο. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται κυρίως για ελαφριά πετρέλαια.

### 1.7.2 Ανάκτηση του πετρελαίου με την χρήση Skimmer και Booms.

Πρόκειται για συσκευές που συγκρατούν συλλέγουν το πετρέλαιο από την επιφάνεια της θάλασσας. Φαίνεται ως η ιδανική μέθοδος ωστόσο εμφανίζει προβλήματα όπως όταν η θάλασσα είναι ταραγμένη ο περιορισμός της κηλίδας είναι δύσκολος, στο γεγονός ότι η διεργασία του περιορισμού είναι ενάντια στα φυσικά φαινόμενα της εξάπλωσης και της διασποράς , επιπλέον πετρέλαιο υπόκειται γήρανση (weathering) με την πάροδο του χρόνου και επομένως τα χαρακτηριστικά του αλλάζουν και πιθανόν να απαιτούνται διαφορετικές αντλίες και μονάδες διαχωρισμού πετρελαίου/νερού κ.α.



Εικόνα 16 Χρήση Boom , Exxon Valdez , Alaska 1989

### 1.7.3 Μέθοδος ελεγχόμενης καύσης

Αν και φαίνεται απλή μέθοδος , και η διαδικασία που ακολουθείται πιο συχνά από την βιομηχανία ( Η BP πραγματοποίησε πάνω από 400 καύσεις στο Deep Horizon) παρουσιάζει αρκετά προβλήματα όπως η αδυναμία ανάφλεξης ή διατήρησης της

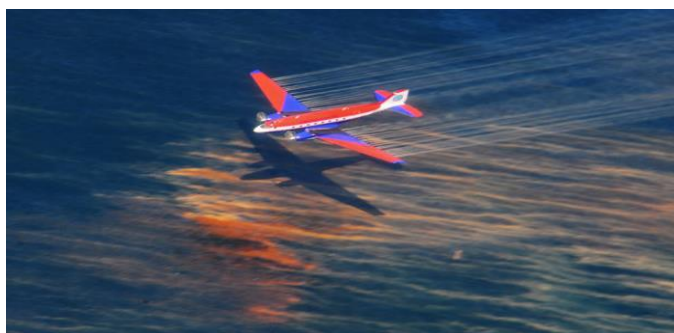
καύσης (πάχος πετρελαιοκηλίδας τουλάχιστον 2-3 mm για να υπερσχύσει της ψύξης λόγω του νερού και των ανέμων) , η εξατμισμό των ελαφριών συστατικών του πετρελαίου κάνει την ανάφλεξη πολύ πιο δύσκολη και το γεγονός πως αν το πετρέλαιο έχει υποστεί σημαντική γήρανση (weathered Oil) είναι δύσκολο να αναφλεχθεί. Γενικά αν εξατμιστεί το 20% κατά βάρος είναι πρακτικά ανεφάρμοστη αυτή η τεχνική.



Εικόνα 17 Ελεγχόμενη καύση Deepwater Horizon , Κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ ,2010

#### 1.7.4 Χημικές Ουσίες διασποράς

Πρόκειται για ρίψη 2 διαφορετικών ουσιών , μιας τασιενεργής ουσίας και ενός διαλύτη , με πλοiάρια ή γεωργικά αεροπλάνα και έχουν ως στόχο την φυσική ενίσχυση της διασποράς του πετρελαίου. Όταν η τασιενεργή ουσία έρθει σε επαφή με το πετρέλαιο μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης και μέρος της πετρελαιοκηλίδας διαχωρίζεται σε μικρά σταγονίδια που είναι διασπαρμένα στην υδατική φάση. Τα σταγονίδια αυτά έχουν διαφορετικά μεγέθη. Τα μεγάλα επιστρέφουν στην επιφάνεια ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν αιωρούμενα μέσα στην υδατική φάση. Εάν η ενίσχυση της διασποράς είναι επιτυχής, ένα πλούμιο θα δημιουργηθεί που θα προχωρά προς τα κάτω μετά από μερικά λεπτά αφότου γίνει η προσθήκη των χημικών διασποράς.



Εικόνα 18 Ρίψη oil dispersants ,Κόλπος Μεξικού , ΗΠΑ , 2010

#### 1.7.5 Βιολογικές μέθοδοι εξυγίανσης πετρελαιοκηλίδων.

Αφορά τεχνικές που έχουν στόχο την επιτάχυνση του ρυθμού φυσικής διάσπασης του πετρελαίου. Διακρίνονται κυρίως σε δύο τεχνικές, η βιοενύσχιση ( bio-augmentation ) και η βιοδιέγερση (bio-stimulation)

##### 1.7.5.1 Βιοδιέγερση (bio-stimulation)

Δεδομένου ότι ένα θαλάσσιο περιβάλλον πάντα υπάρχουν μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να διασπάσουν το πετρέλαιο, σε μια πετρελαιοκηλίδα υπάρχει μεγάλη ποσότητα άνθρακα χωρίς να υπάρχουν και τα αντίστοιχα απαιτούμενα μεγέθη αζώτου και φώσφορου ( C:N:P=120:10:1 σε mole) ώστε να γίνει η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η τεχνική αυτή λειτουργεί με την προσθήκη λιπασμάτων ώστε να επιτευχθεί η παραπάνω σχέση και να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί.

Ένα μειονέκτημα που παρουσιάζει η μέθοδος της βιοενύσχισης είναι πως το πρόσθετο φώσφορο και άζωτο συχνά διασπείρετε και διαλύεται μακριά από τα σταγονίδια του αργού πετρελαίου. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αντιμετωπιστεί με την προσθήκη επιφανιοδραστικών ουσιών ( surfactants) τα οποία όμως λειτουργούν σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα καθώς έχουν αποδειχθεί τοξικά για του μικροοργανισμούς , ή με την προσθήκη βιολογικά κατασκευασμένων επιφανιοδραστικών ουσιών ( bio-surfactants) τα οποία έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά. [7]

##### 1.7.5.2 Βιοενύσχιση ( bio-augmentation )

Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη εξειδικευμένων ομάδων μικροοργανισμών ( consortia) στο θαλάσσιο περιβάλλον , ώστε να ενισχύσουν τους ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμούς και να επιτευχθεί υψηλότερος ρυθμός βιοαποδόμισης. Για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι απαραίτητη η εξασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών για την επιβίωση και την εκτέλεση των μεταβολικών λειτουργιών των μικροοργανισμών.

Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται μόνο για περιοχές που δεν υπάρχει μόνιμη πετρελαϊκή ρύπανση.

## Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης

Η βιοεξυγίανση είναι η τεχνολογία που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία με σκοπό την έρευνα της αποτελεσματικότητας των βιολογικά κατασκευασμένων επιφανιοδραστικών ουσιών , καθώς και τον βαθμό αποδόμησης συγκεκριμένων μικροοργανισμών με χρήση θρεπτικών.

Η βιοεξυγίανση μπορεί να φανεί χρήσιμη ως μέθοδο για την απομάκρυνση μερικών τοξικών συστατικών του πετρελαίου όπως συμβαίνει με του χαμηλού μοριακού βάρους αρωματικούς υδρογονάνθρακες που απομακρύνονται γρηγορότερα από την μέθοδο της εξάτμισης. Ωστόσο η μέθοδος της εξυγίανσης εμφανίζει τελικά αποτελέσματα σε μακροχρόνια περίοδο παρότι ενεργοποιείται πιο γρήγορα από τις φυσικοχημικές μεθόδους που έχουν τελικά αποτελέσματα όμως σε μικρή χρονική περίοδο.

Πρόκειται για μια φυσική διεργασία που δεν προκαλεί περεταίρω ρύπανση στην περιοχή χρήσης της( δίνει ως προϊόντα  $\text{CO}_2\text{H}_2\text{O}$  και βιομάζα) , αν και δεν χρησιμοποιείται σε ανοιχτές θάλασσες λόγω της αυξημένης διάχυσης καθώς και σε περιπτώσεις βαριάς ρύπανσης εφαρμόζεται από την βιομηχανία ως δευτερεύουσα μέθοδος καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική.

Ως πως το οικονομικό μέρος η βιοεξυγίανση έχει χαμηλότερο κόστος έναντι των μηχανικών μεθόδων καθώς εκτελείται επιτόπου στο σημείο χωρίς να χρειάζεται συλλογή και μεταφορά του ρύπου.

Συγκριτικά από τις μεθόδους της βιοεξυγίανσης , βιοενύσχιση ( bio-augmentation ) και βιοδιέγερση (bio-stimulation), η βιοδιέγερση φαίνεται να υπερτερεί καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις οι ενδογενείς μικροοργανισμοί είναι ικανοί να αντιμετωπίσουν την ρύπανση χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη αλλού μικροβιακού πληθυσμού που θα επιφέρει περιβαλλοντική μόλυνση. Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποδημήσουν το πετρέλαιο βρίσκονται παντού και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις ακτές.

## 2 Πειραματική διαδικασία

Στη παρούσα διπλωματική εργασία ακολουθήθηκε το τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων εξυγίανσης της Environmental Protection Agency ( Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος ) ( EPA) (40 CFR Ch.I, Pt 300, App.C).

Το παραπάνω πρωτόκολλο σχεδιάστηκε για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Ακόμα το πρωτόκολλο εξετάζει την μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποίησή την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών (PAHs)

Συνοπτικά η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια

1. Βιοαποδόμηση πετρελαίου σε θαλασσινό νερό
2. Εκχύλιση του πετρελαίου (LLE)
3. Διαχωρισμός του πετρελαίου σε κορεσμένο και αρωματικό κλάσμα (SPE)
4. GC/MS ( αέρια χρωματογραφία) ανάλυση των παραχθέντων κλασμάτων ( κορεσμένων και αρωματικών )

### 2.1 Υλικά και εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά και εξοπλισμός:

- Πιπέτες Pasteur
- Πουάρ
- Φιαλίδια ( vials)
- Τριβλία Πέτρι
- MPN πηγαδάκια
- Διαχωριστικές χοάνες
- Σφαιρικές φιάλες
- Ογκομετρικές φιάλες
- Κωνικές φιάλες
- Υαλοβάμβακας
- Θεικό Νάτριο
- Διχλωρομεθάνιο (DCM suprasolve)
- Εξάνιο (C<sub>6</sub>H suprasolve)
- Ζυγαριά ακριβείας (0,0001γρ)
- Ξηραντήρας
- Στήλες SPE (Solid Phase Extraction)

- Περιστροφικός εξατμιστής
- Απαγωγός
- Συσκευή GC/MS ( Αέριος Χρωματογράφος / Φάσματος Μάζας)

## 2.2 Προετοιμασία πετρελαίου

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα δείγματα μελετήθηκαν σε καθαρό θαλασσινό νερό το οποίο συλλέχθηκε από την περιοχή του Αγίου Ονούφριου στα Χανιά . Η περιοχή αυτή δεν είναι ρυπασμένη ούτε εκτεθειμένη σε βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα.

Το πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι μαζούτ IFO 180[4].

| Χαρακτηριστικά                                      | Μέθοδοι δοκιμής             | Όριο | RME180 |
|---|-----------------------------|------|--------|
| Πυκνότητα στους 15 ° C, kg / m <sup>3</sup>         | ISO 3675 ή 12185            | Max. | 991    |
| Κινηματικό ιξώδες στους 50 ° C, mm <sup>2</sup> / s | ISO 3104                    | Max. | 180    |
| Σημείο Ανάφλεξης, ° C                               | ISO 2719                    | min. | 60     |
| Το υπόλειμμα άνθρακα,% (m / m)                      | ISO 10370                   | Max. | 15     |
| Στάχτη,% (m / m)                                    | ISO 6245                    | Max. | 0,10   |
| Νερό,% (V IV)                                       | ISO 3733                    | Max. | 0,50   |
| Θείο,% (m / m)                                      | ISO 8754                    | Max. | 3.5    |
| Βανάδιο mg / kg                                     | IP 501 / IP 470 / ISO 14579 | Max. | 200    |
| Αλουμίνιο   | IP 501 / IP 470 / ISO 14578 | Max. | 80     |
| συν πυρίτιο, mg / kg                                |                             |      |        |
| Σύνολο των ιζημάτων, δυναμικό,% (m / m)             | ISO 10307-2                 | Max. | 0,10   |

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά πετρελαίου IFO180

## 2.3 Μικροβιακά Consortia

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί ( μικροβιακά κονσόρσια) που χρησιμοποιήθηκαν για την Βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων απομονωθήκαν από δείγμα που προήλθε από την περιοχή του λιμανιού του Κερατσινίου στον Πειραιά. Μια περιοχή η οποία είναι χρόνια εκτεθειμένη σε πετρελαϊκή μόλυνση με Μαζούτ προερχόμενη από τις γειτονικές εγκαταστάσεις της Δ.Ε.Η.

## 2.4 Επιφανειακές Δραστικές Ουσίες (bio surfactants-dispersants )

Για την καλύτερη διάσπαση του πετρελαίου στα δείγματα ώστε να μπορέσουν οι μικροοργανισμοί να διασπάσουν το οργανικό φορτίο ευκολότερα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Στην μία πειραματική σειρά χρησιμοποιήθηκε το dispersant MARICHEM [5] , το οποίο χαρακτηρίζεται ως μη τοξικό χημικό και στην άλλη πειραματική σειρά η βιολογικά παρασκευασμένη ουσία (bio-surfactant) NEW CHERY.

## 2.5 Προετοιμασία δείγματος

Σε κωνικές φιάλες δημιουργήθηκαν 3 σειρές δειγμάτων , με 3 χαρακτηριστικές δοκιμές επαναλήψεις για την κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας και τοποθετήθηκαν για επώαση για 0 , 7, 28, 56 , 112 ημέρες σε θάλαμο με θερμοκρασία 20<sup>0</sup> C και ρυθμό ανάδευσης 120 rpm.

Η πρώτη σειρά με την ονομασία Control περιείχε:

- 20 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό
- 102 μl μαζούτ IFO 180
- 400 μl NP ( nutrients KNO<sub>3</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2 ml inoculum

Η δεύτερη σειρά με την ονομασία MAR περιείχε:

- 20 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό
- 102 μl μαζούτ IFO 180
- 400 μl NP ( nutrients KNO<sub>3</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2 ml inoculum
- 70 μl MARICHEM

Η τρίτη σειρά με την ονομασία NEW περιείχε:

- 20 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό
- 102 μl μαζούτ IFO 180
- 400 μl NP ( nutrients KNO<sub>3</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2 ml inoculum
- 120 μl NEW CHERY

Κατά την πειραματική διαδικασία στην 95<sup>η</sup> ημέρα προστέθηκαν άλλα 400 μl N.P στα δείγματα NEW με σκοπό να κρατηθεί ο αριθμός των μικροοργανισμών σε υψηλά επίπεδα.

## 2.6 Μικροβιολογική ανάλυση

Προετοιμασία τριβλίων Petri με Marine agar (θρεπτικού μέσου)

Σε ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου τοποθετούνται:

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

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

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

Σε ογκομετρική φιάλη δύο λίτρων τοποθετούνται:

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

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

## 2.7 Μικροβιακή απαρίθμηση

### 2.7.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

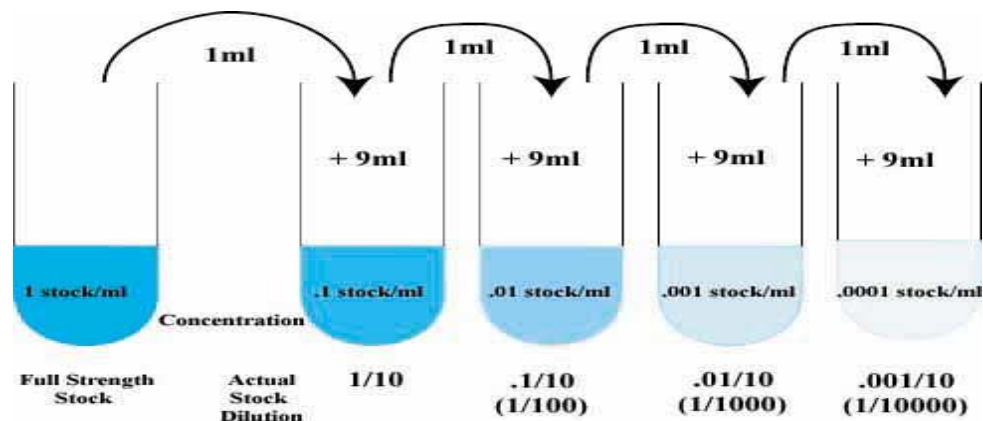
Σε συγκεντρώσεις οι οποίες είναι πολύ υψηλές και είναι αδύνατο να καταμετρηθεί ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο δείγμα πραγματοποιείται η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

Σε αποστειρωμένους σωλήνες αραιώσης (delution tubes) τοποθετούνται:

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

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

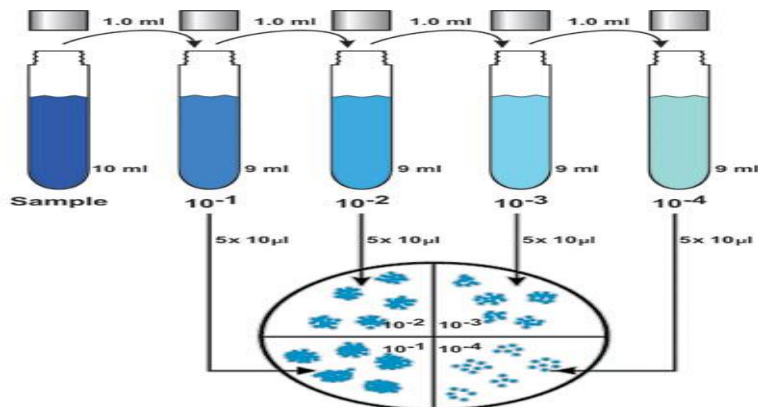
Για την καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμού τοποθετήθηκαν αντίστοιχα 9ml ONR7 και 1ml δείγματος (inoculum) και η διαδικασία συνεχίστηκε διαδοχικά μέχρι την έβδομη αραιώση (10<sup>-7</sup>).



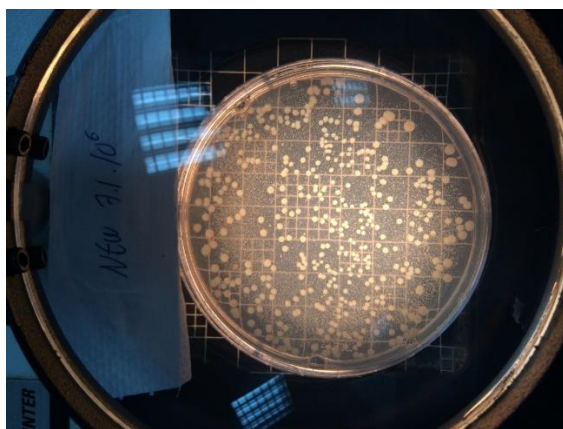
Εικόνα 19 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

## 2.7.2 Μέτρηση πληθυσμού μικροοργανισμών στα τριβλία Petri (plate counts)

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



Εικόνα 20 Καταμέτρηση πληθυσμών σε Τριβλία Petri.



Εικόνα 21 Αποικίες πληθυσμών σε Τριβλίο Petri , δείγμα NEW 7.1 , αραιώση  $10^6$ .

### 2.7.3 Μέθοδος MPN

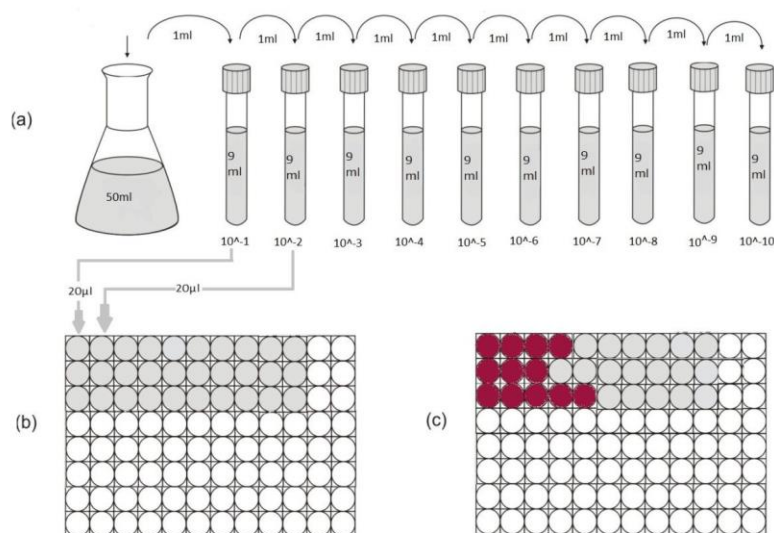
Στα πηγαδάκια MPN , αφού αποστειρωθούν με ακτινοβολία UV , προστίθενται:

- 180 μl Bushnell-Hass( B.H)
- 5 μl πετρέλαιο ( crude oil)
- 20 μl δείγματος από κάθε διάλυση , ξεκινώντας από το πιο πυκνό στο πιο αραιό. Οι δύο τελευταίες στήλες χρησιμεύουν ως έλεγχοι ( μάρτυρες) σε περίπτωση μόλυνσης , καθώς σε εκείνες δεν προστίθεται δείγμα.

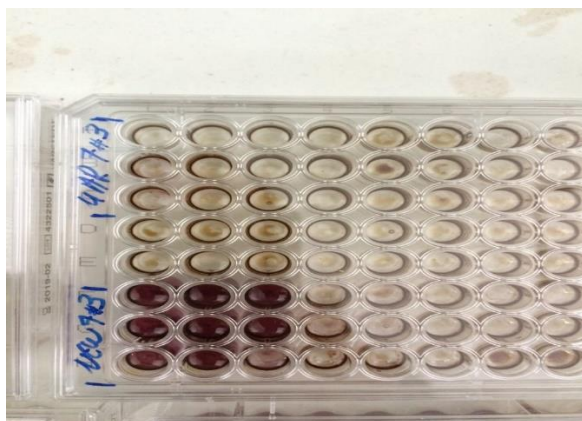
Στη συνέχεια τα πλακίδια επωάζονται για 14 ημέρες σε θάλαμο στους 20 °C .

Μετά το πέρας των 14 ημερών προστίθενται 50 μl βαφή INT , η οποία έχει αποστειρωθεί πιο πριν ) .

Έπειτα από μία μέρα επώασης προσδιορίζεται η αλλαγή χρώματος στα πηγαδάκια, με την αλλαγή χρώματος σε κόκκινο- ροζ να πιστοποιεί θετική ένδειξη.



Εικόνα 22 Μέθοδος MPN.



Εικόνα 23 Καταμέτρηση πηγαδιών MPN, δείγμα MAR7.3 (πάνω), NEW 7.3 (κάτω)

## 2.8 Χημική ανάλυση της σύστασης του πετρελαίου

### 2.8.1 Εκχύλιση υγρής – υγρής φάσης (Liquid Liquid Extraction-LLE)

Η εκχύλιση υγρής- υγρής φάσης πραγματοποιείται σε εκχυλιστικές χοάνες ,για το κάθε δείγμα ξεχωριστά, όπου το πετρέλαιο διαχωρίζεται από το θαλασσινό νερό και το διάλυμα θρεπτικών με την χρήση του διχλωρομεθανίου( DCM) ως διαλύτη.

Αναλυτικά η διαδικασία γίνεται:

Προσθήκη στο προς εκχύλιση δείγμα 50µl surrogate συγκέντρωσης 200ppm σε 10-phrenanthrene και 5a-androstane. Τόσο το δείγμα όσο και το surrogate θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Τοποθέτηση του δείγματος στη διαχωριστική χοάνη (η οποία στηρίζεται σε μεταλλική βάση), αφού πρώτα ελεγχθεί πως η στρόφιγγα της χοάνης είναι κλειστή.
- Προσθήκη 50ml DCM στο δείγμα, μέρος του οποίου χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα της κωνικής φιάλης στην οποία βρισκόταν το δείγμα.
- Ανάδευση της χοάνης για περίπου ένα λεπτό και συνεχής εκτόνωση έτσι ώστε να απελευθερωθούν οι παραγόμενοι ατμοί του διαλύτη. Στη συνέχεια αφήνεται να ηρεμήσει και να γίνει διαχωρισμός των δυο φάσεων.
- Προετοιμασία στήλης από την οποία θα περάσει το εκχύλισμα, στην οποία τοποθετείται μικρής ποσότητας υαλοβάμβακα και θειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ενεργοποιημένο στους  $400^\circ\text{C}$  για 4 ώρες). Τέλος γίνεται έκπλυση (conditioning) της στήλης με μικρή ποσότητα DCM.
- Αφού περάσει όλο το εκχύλισμα από τη στήλη θειικού νατρίου, μεταφέρεται και τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator), για περίπου 10 λεπτά (έως ότου εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης).
- Τέλος η σφαιρική φιάλη που περιέχει το εκχυλισμένο πετρέλαιο, αναπαύετε για 24 ώρες ώσπου μεταφέρετε το περιέχομε με την χρήση διχλωρομεθανίου (DCM Supra solve) σε ζυγισμένα vials των 4 ml και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε ξηραντήρα.



Εικόνα 24 Διαδικασία εκχύλισης Υγρής -Υγρής φάσης

### 2.8.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction-SPE)- Κλασματοποίηση πετρελαίου

Η εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιείται στη στήλη SPE (συσκευή εκχύλισης) και έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του κορεσμένου και του αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου. Ως διαλύτες στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν διχλωρομεθάνιο (DCM)

για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες και εξάνιο (C6) για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Αναλυτικά η διαδικασία:

- Ζυγίζουμε 5-10 mg πετρέλαιο και το μεταφέρουμε σε προζυγισμένο φιαλίδιο όπου το διαλύουμε σε 1 ml C6:DCM ( 9:1) .
- Αφού τοποθετήσουμε τις ειδικές στήλες πάνω στην συσκευή κάνουμε PRECOCNDITIONING της στήλης με 6 ml εξάνιο.
- Βάζουμε το δείγμα στη στήλη και προσθέτουμε 4 ml εξάνιο ( 2x2ml) . Το κλάσμα που βγαίνει είναι τα κορεσμένα ( αλκανια ) F1
- Στη συνέχεια για να ανακτήσουμε το κλάσμα ων αρωματικών υδρογονανθράκων F2 , περνάμε στην στήλη 4 ml DCM( 2x2ml) .
- Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μεταφέρουμε σε προζυγισμένα φιαλίδια τα 2 κλάσματα στον ξηραντήρα για 24 ώρες.
- Μετά το πέρας των 24 ωρών τα φιαλίδια ζυγίζονται.



Εικόνα 25 Διαδικασία εκχύλισης Στερεάς φάσης , SPE

### 2.8.3 GC/MS Ανάλυση.

Το σύστημα ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας , ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και ο φασματογράφος μάζας για την ανίχνευση , ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους. Αυτό γίνεται μέσω της διάσπασης των ενώσεων σε ηλεκτρικά φορτισμένα μέρη , ιόντα. Η πορεία διάσπασης κάθε ένωσης εξαρτάται από την χημική δομή και περιέχει ένα μοναδικό αποτύπωμα ( ίχνος) που είναι χαρακτηριστικό για την κάθε ένωση.

Πριν από την έγχυση , στο δείγμα τοποθετείται ένα εσωτερικό πρότυπο διάλυμα ( internal standard)<sup>1</sup> τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων.

Τα δείγματα τοποθετούνται στο σύστημα GC/MS , με αρχή ένα τυφλό δείγμα , και στη συνέχεια τα δείγματα F1 και μετά το τέλος της σειράς τα δείγματα F2 που είναι προς ανάλυση. Ανά 5 δείγματα τοποθετείται ένα τυφλό δείγμα , ώστε να καθαρίζεται η ένεση και να μην πέφτει η απόδοση του οργάνου.

Οι απαραίτητες πληροφορίες ( όνομα , ποσότητα , συνθήκες κλπ.) που αφορούν το δείγμα που εισάγεται για ανάλυση κάθε φορά περιγράφονται στο acquisition form του προγράμματος του αέριο χρωματογράφου.

Τα συστατικά του κάθε δείγματος ταυτοποιούνται με βάση τον χρόνο συγκράτησης και του φάσματος των μαζών . Για κάθε συστατικό υπολογίζονται οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης.

Η ποσοτικοποίηση του κάθε αναλυτή γίνεται με βάση του συντελεστές απόκρισης.

Για το κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο υπολογίζονται με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

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

Όπου :

RF: Σχετικός συντελεστής απόκρισης

A<sub>x</sub>: Εμβαδό της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται

A<sub>is</sub>: Εμβαδό της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο

C<sub>x</sub>: Συγκέντρωση (ng/μl) του συστατικού που μετράται

C<sub>is</sub>: Συγκέντρωση (η οποία είναι σταθερή για την καμπύλη βαθμονόμησης και ίση με 10ng/μl) του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου



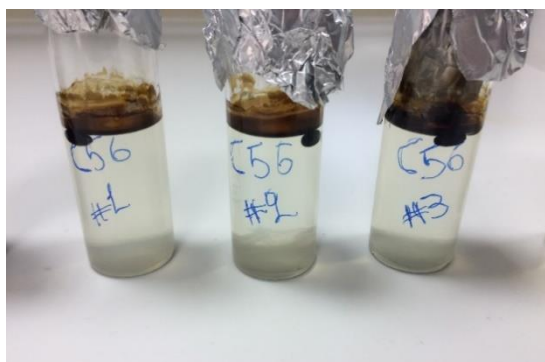
Εικόνα 26GC/MS . (Σύστημα ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας)

<sup>1</sup> Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα διάλυμα που περιείχε : naphthalene-d8 , phenanthrene-d10 , chrysene-d12 , perylene-d12.

### 3 Επεξεργασία και σχολιασμός αποτελεσμάτων

Στο παρακάτω κεφάλαιο παρέχονται τα αποτελέσματα από τις χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Κάθε κεφάλαιο θα περιέχει δεδομένα από τις αναλύσεις GC/MS και MPN του κάθε δείγματος.

#### 3.1 Δείγμα Control ( C )

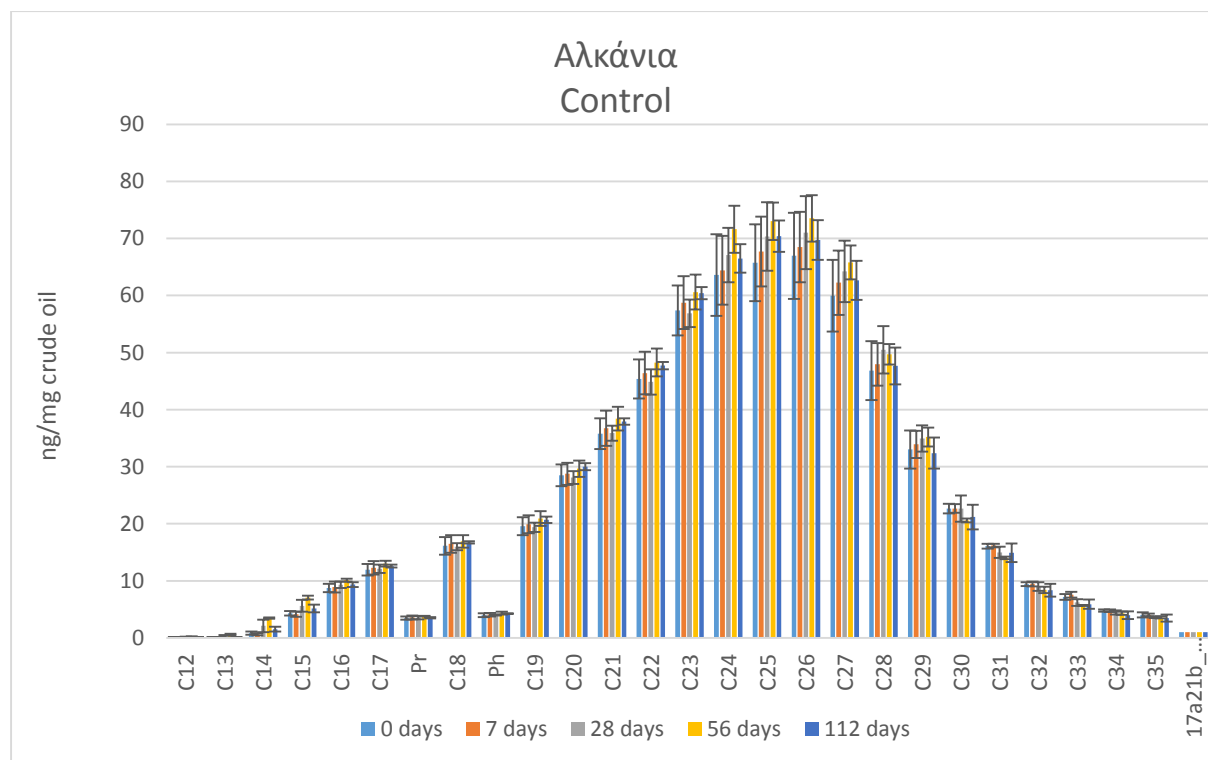


Εικόνα 28 Δείγματα Control , μετά από 56 ημέρες στον θάλαμο επώασης



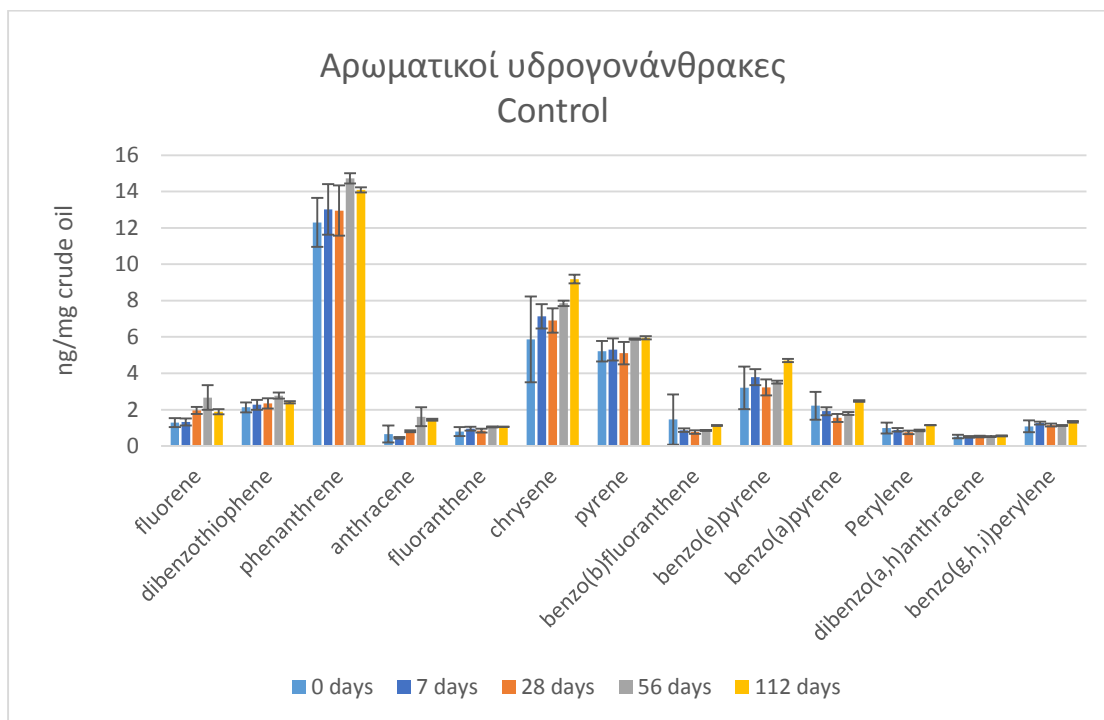
Εικόνα 27 Δείγμα Control με βιοφίλμ.

##### 3.1.1 Αναλύσεις GC/MS



Διάγραμμα 1 Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος Control

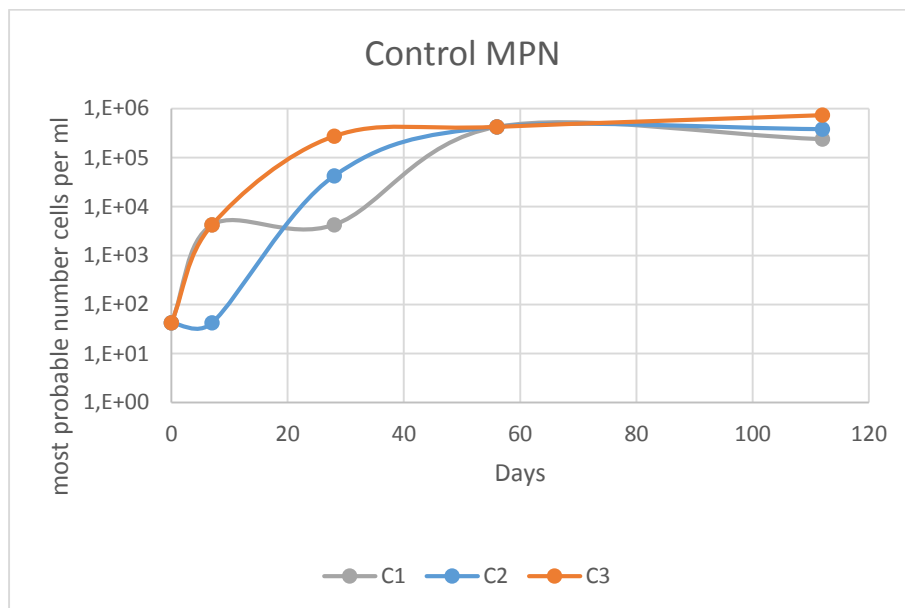
Στο διάγραμμα με την απομάκρυνση των αλκανίων , παρατηρούμε πως δεν υπάρχει μεταβολή της συγκεντρώσεως των αλκανίων ή είναι ελάχιστη σε κάποιες περιπτώσεις με αποτέλεσμα να μην μπορεί να βγει κάποιο συμπέρασμα για την αποτελεσματικότητα των μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 2 Συγκεντρώσεις Αρωματικών δείγματος Control

Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα καθώς σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το κλάσμα των αρωματικών συστατικών του δείγματος παραμένει αμετάβλητο.

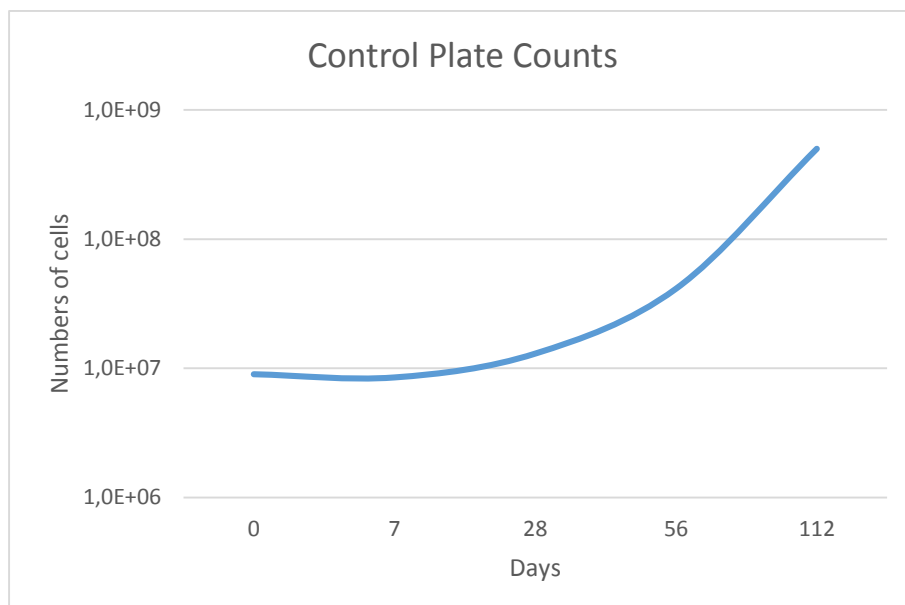
### 3.1.2 Αναλύσεις MPN (Most Probable Number)



Διάγραμμα 3 Μέγιστος αριθμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου . Δείγμα Control

Στο διάγραμμα παρατηρούμε την διαδοχική αύξηση του αριθμού πως μικροοργανισμών που βρίσκονται στο δείγμα Control σε διάστημα 112 ημερών όπως υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα της EPA.

### Καταμέτρηση αποικιών στα τριβλία Petri



Διάγραμμα 4 Πληθυσμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου. Δείγμα Control

Η καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία επαλήθευση την μέθοδο MPN και το συμπέρασμα πως ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο δείγμα αυξάνεται διαρκώς.

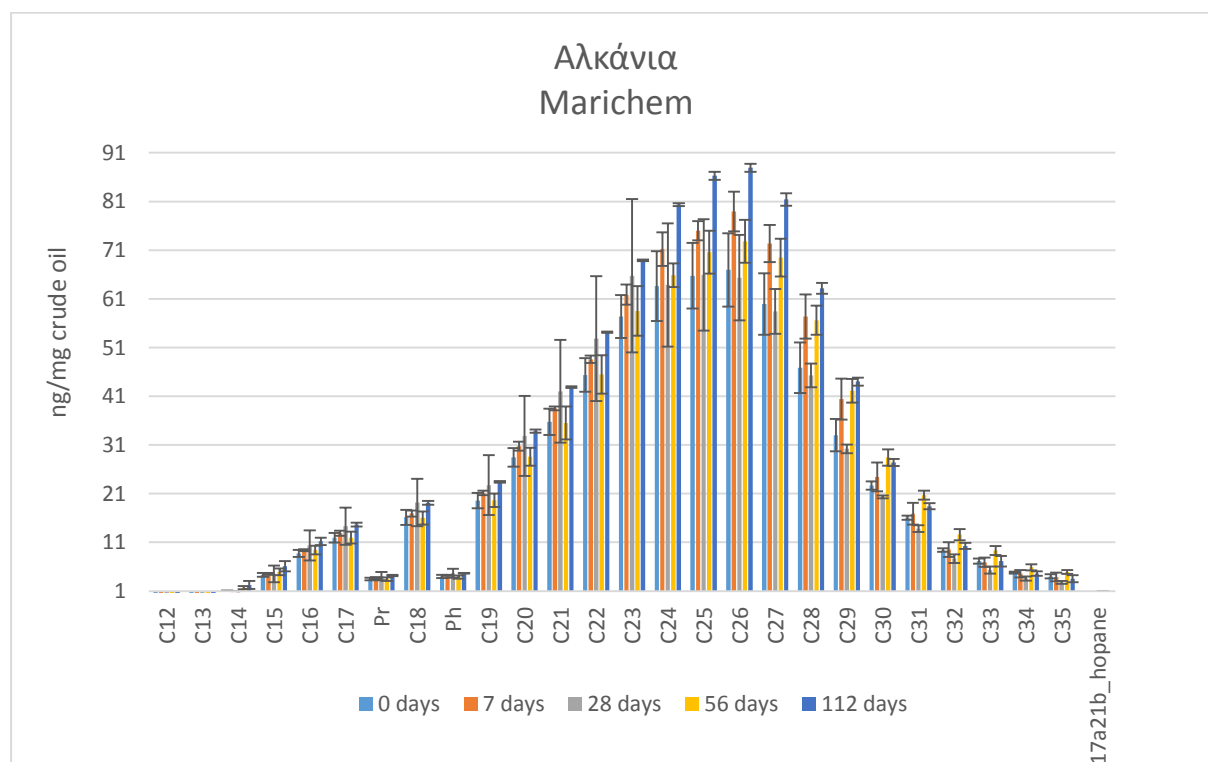
### 3.2 Δείγμα Marichem ( MAR )



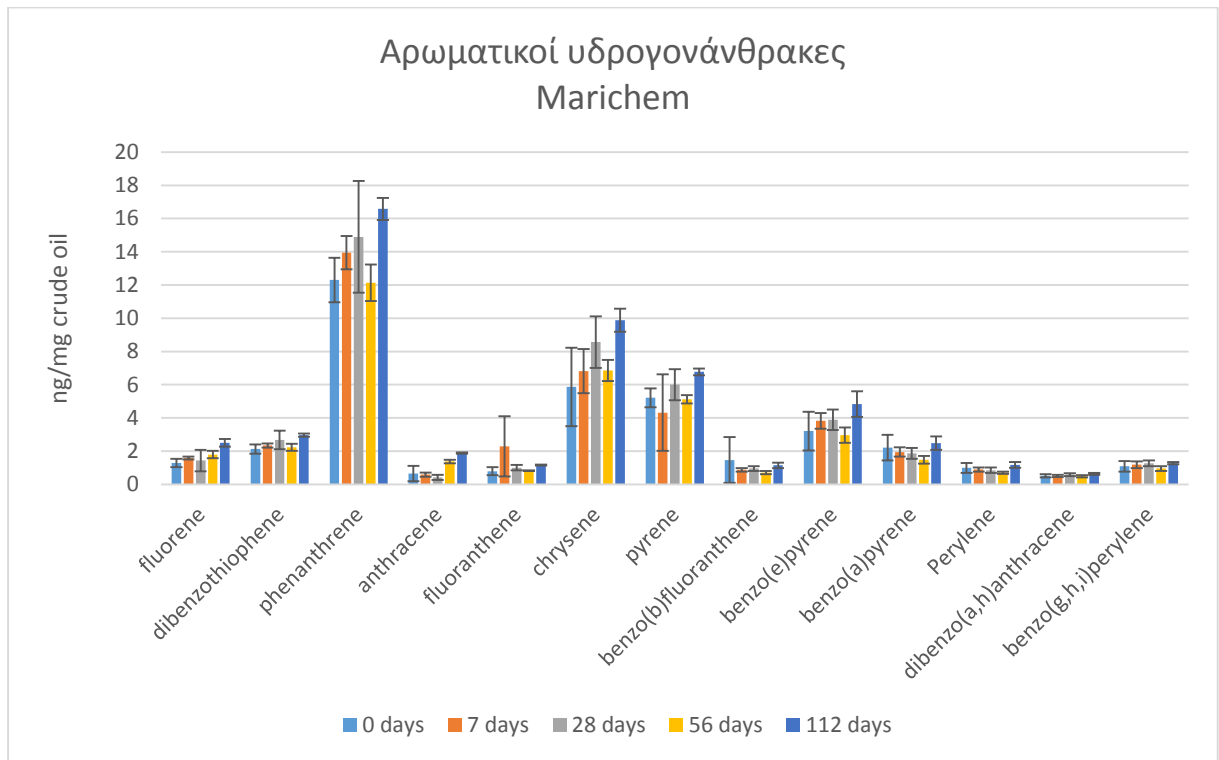
Εικόνα 29 Δείγματα Marichem , μετά από 56 ημέρες στον θάλαμο επώασης

Όπως θα δούμε και από τα δεδομένα από τις μικροβιολογικές αναλύσεις , η χημική ουσία MARICHEM αποδείχθηκε τοξική για τους μικροοργανισμούς , καθώς δεν υπήρξε αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών . Ωστόσο παραπέμπονται τα δεδομένα και από τις χημικές αναλύσεις χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα.

#### 3.2.1 Αναλύσεις GC/MS

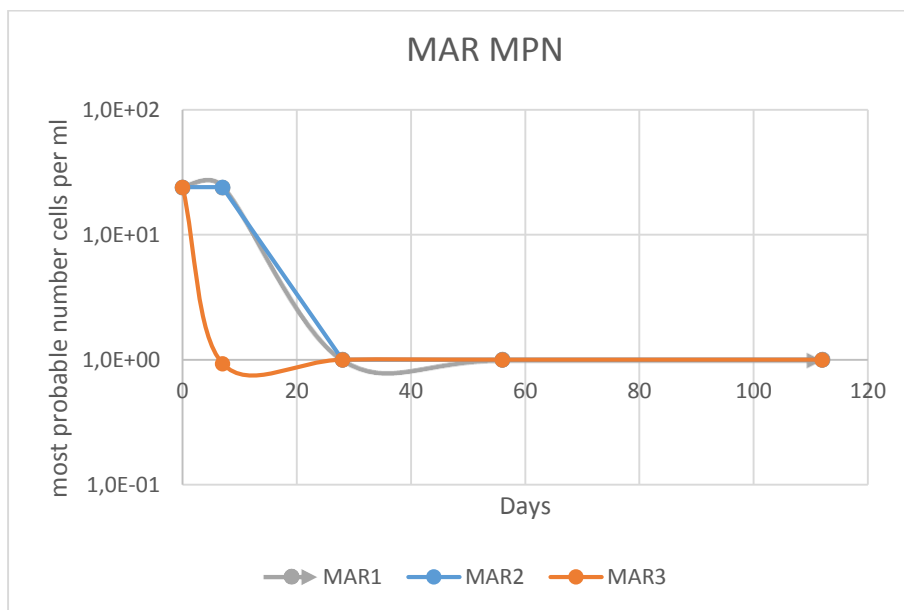


Διάγραμμα 5 Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος Marichem



Διάγραμμα 6 Συγκεντρώσεις Αρωματικών δείγματος Marichem

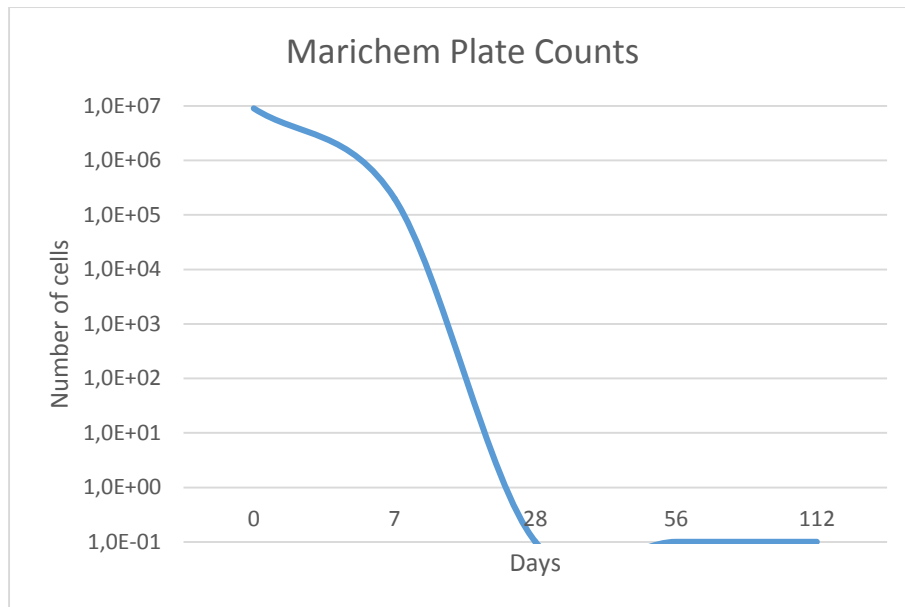
### 3.2.2 Αναλύσεις MPN (Most Probable Number)



Διάγραμμα 7 Μέγιστος αριθμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου . Δείγμα Marichem

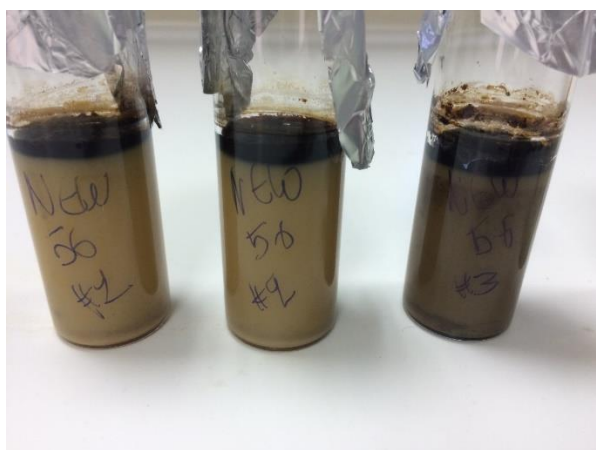
Όπως παρατηρούμε από τα διαγράμματα 7 , 8 ο αριθμός των μικροοργανισμών στο δείγμα μηδενίστηκε , προφανώς λόγω τοξικότητας του Marichem , και δεν υπήρξε η δυνατότητα αποδόμησης των συστατικών του πετρελαίου.

### Καταμέτρηση αποικιών στα τριβλία Petri



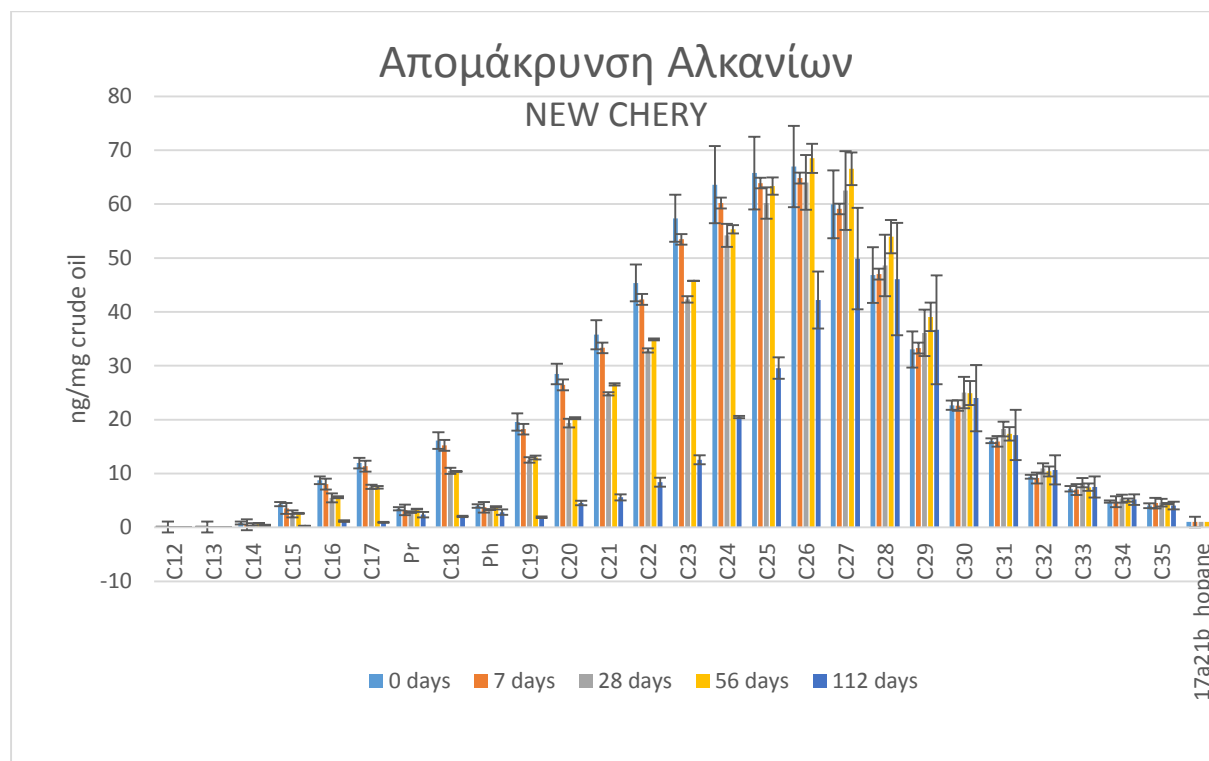
Διάγραμμα 8 Πληθυσμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου. Δείγμα Marichem

### 3.3 Δείγμα NEW CHERRY ( NEW )



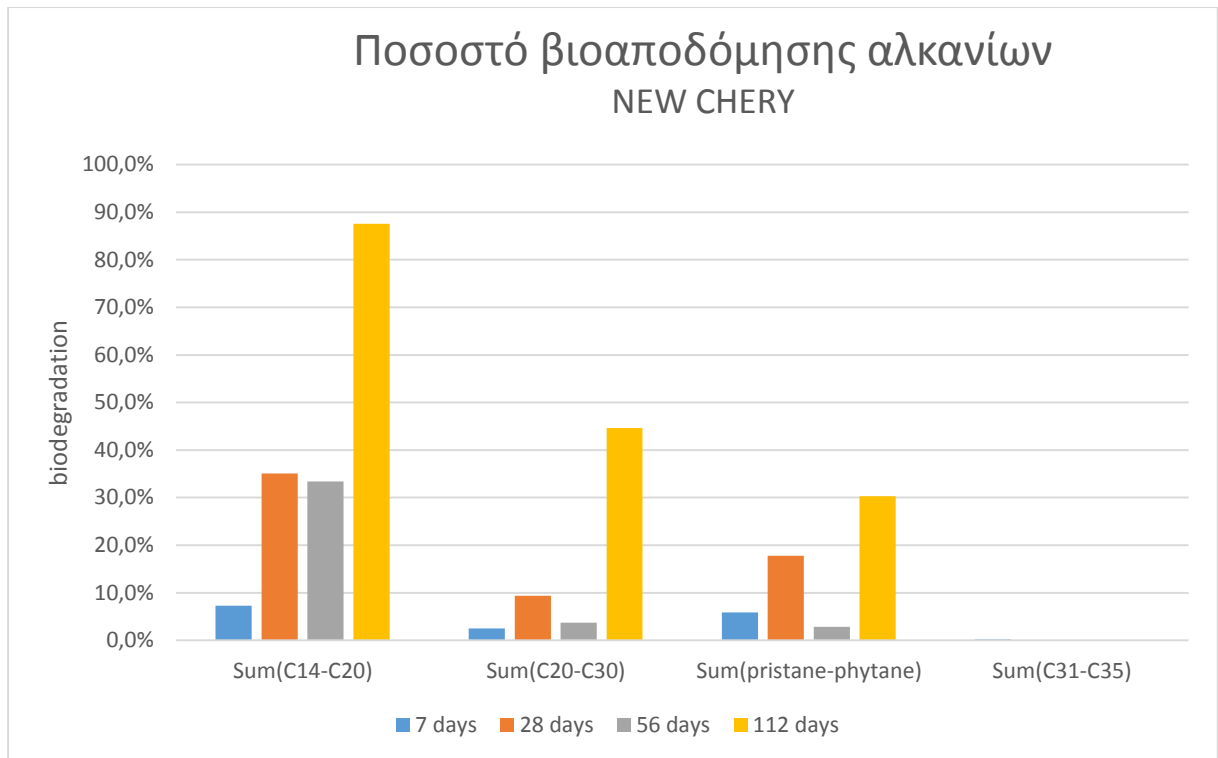
Εικόνα 30 Δείγματα NEW CHERRY, μετά από 56 ημέρες στον θάλαμο επώασης

### 3.3.1 Αναλύσεις GC/MS



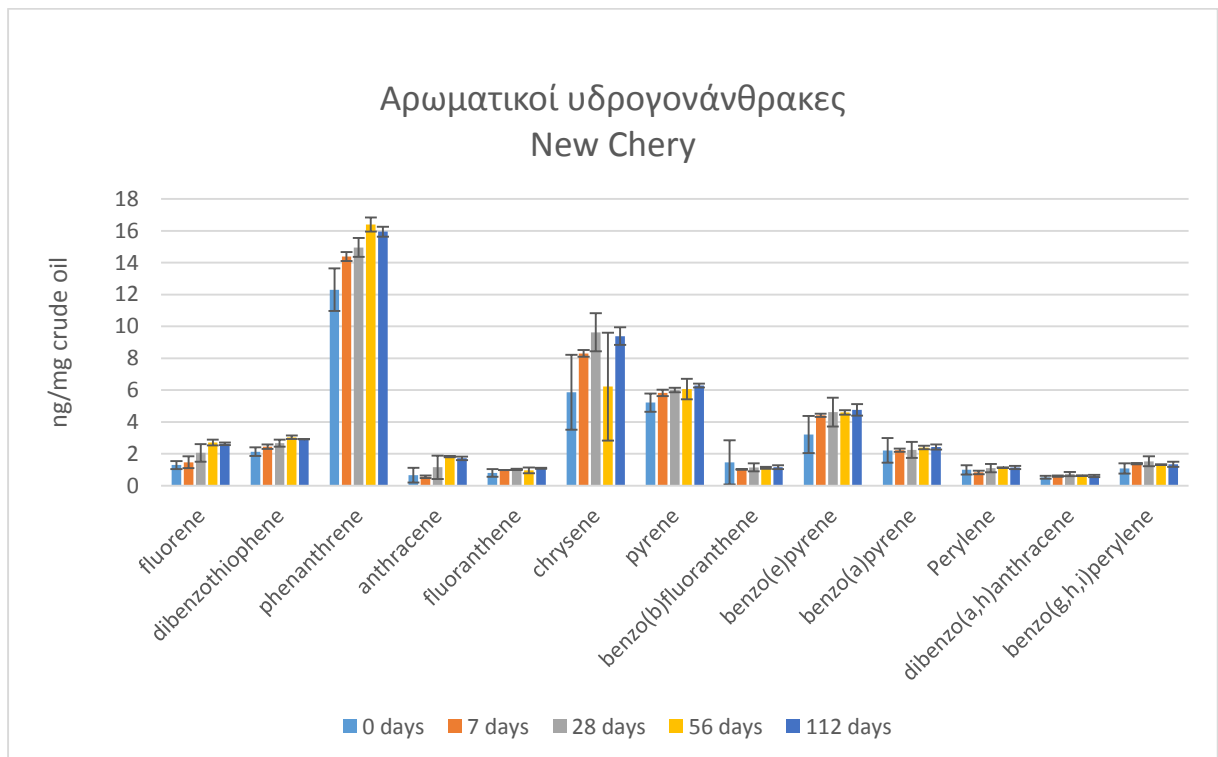
Διάγραμμα 9 Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος New Chery

Στο διάγραμμα 9 παρατηρούμε την απομάκρυνση των αλκανίων στο δείγμα με το bio-surfactant, μεγάλη μείωση στα ελαφριά συστατικά (C14-C20) ακόμα και σε διάστημα των 28 ημέρων όπου η αποδόμηση φτάνει το 35%, και με ραγδαία μείωση των συγκεντρώσεων τους στις 112 ημέρες με ποσοστό 87%. Απομάκρυνση παρατηρείται και στα συστατικά με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (C20-C30), στο πρυστάνιο και στο φυντάνιο, ωστόσο σε χαμηλά επίπεδα μέχρι τις 56 ημέρες και στη συνέχεια το ποσοστό αποδόμησης έφτασε αντίστοιχα 45% και 30%. Καθόλου μείωση των συγκεντρώσεων δεν παρατηρήθηκε στα βαριά συστατικά (C31-C35) σε όλη την διάρκεια του πειράματος.



Διάγραμμα 10 Ποσοστά αποδόμησης σε ομάδες αλκανίων συνάρτηση του χρόνου. Δείγμα New Chery.

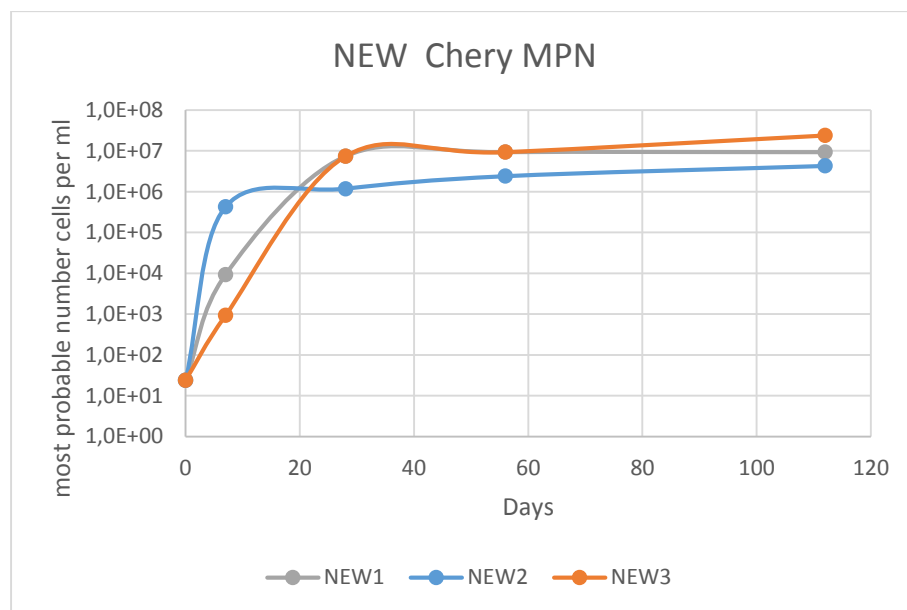
Η αποδόμηση στα αλκάνια παρουσιάζει σε όλες τις ομάδες μια πτώση στις μετρήσεις των 56 ημερών σε σχέση με των 28 , όμως με την συμπλήρωση θρεπτικών στις 112 ημέρες εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα αποδόμησης.



Διάγραμμα 11 Συγκεντρώσεις Αρωματικών δείγματος New Chery.

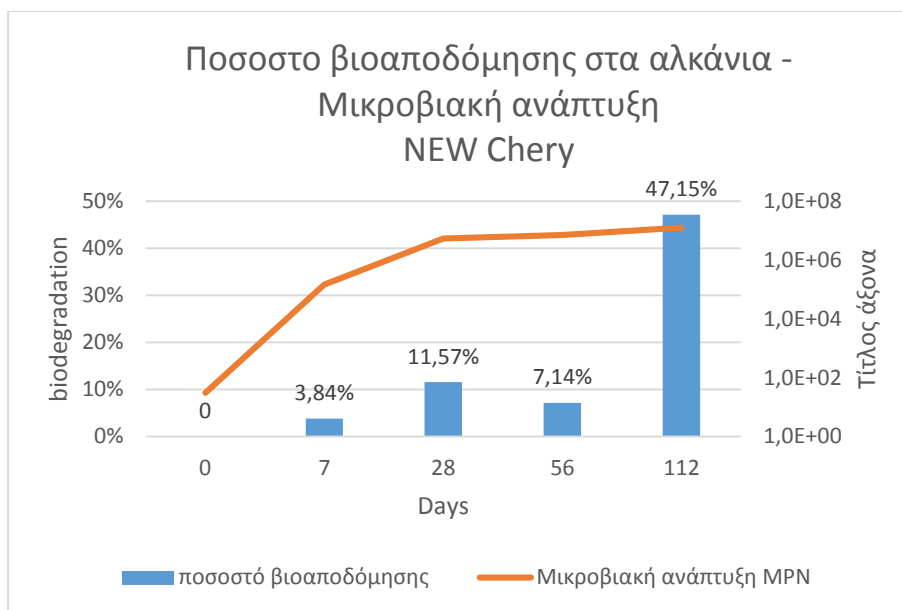
Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα καθώς σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το κλάσμα των αρωματικών συστατικών του δείγματος παραμένει αμετάβλητο.

### 3.3.2 Αναλύσεις MPN (Most Probable Number)



Διάγραμμα 12 Μέγιστος αριθμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου . Δείγμα New Chery

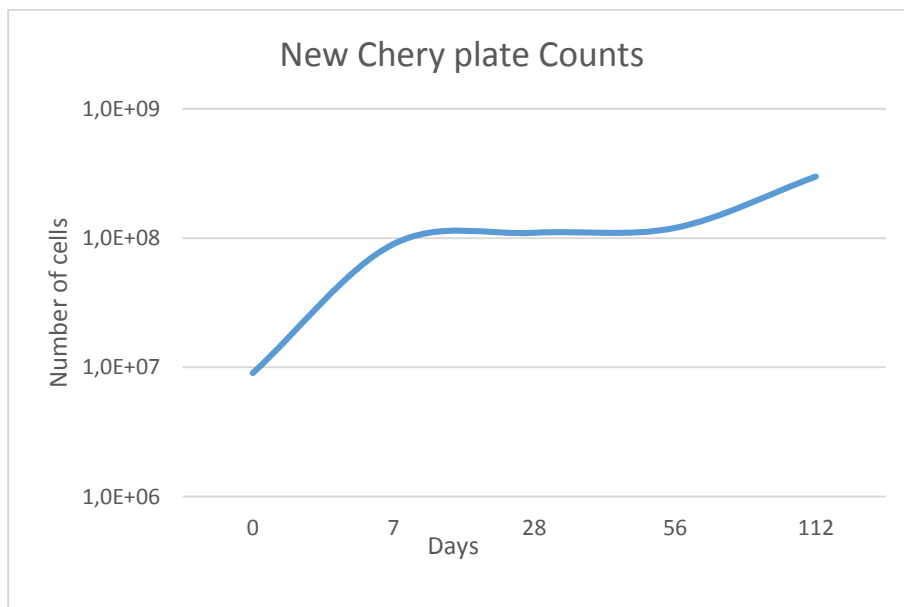
Στο διάγραμμα και στον πίνακα παρατηρείται τεράστια αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο δείγμα. Το γεγονός ότι στις 95 ημέρες προστέθηκαν θρεπτικά στο δείγμα [400 μl NP ( nutrients  $\text{KNO}_3\text{-KH}_2\text{PO}_4$  ) ] οδήγησε τον αριθμό των μικροοργανισμών σε ακόμα πιο υψηλό επίπεδο.



Εικόνα 31 Αποδόμηση Αλκανίων σε συνάρτηση της μικροβιακής ανάπτυξης και του χρόνου.

Το διάγραμμα απεικονίζει την αύξηση την αποδόμησης των συστατικών στα αλκάνια ταυτόχρονα με την αύξηση των μικροοργανισμών στο δείγμα.

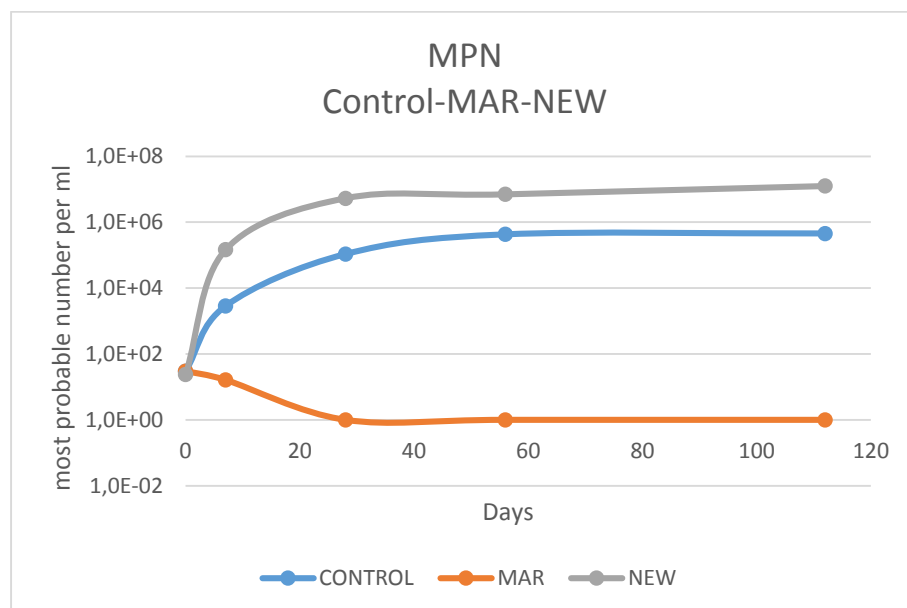
#### Καταμέτρηση αποικιών στα τριβλία Petri



Διάγραμμα 13 Πληθυσμός οργανισμών συνάρτηση του χρόνου. Δείγμα New Chery

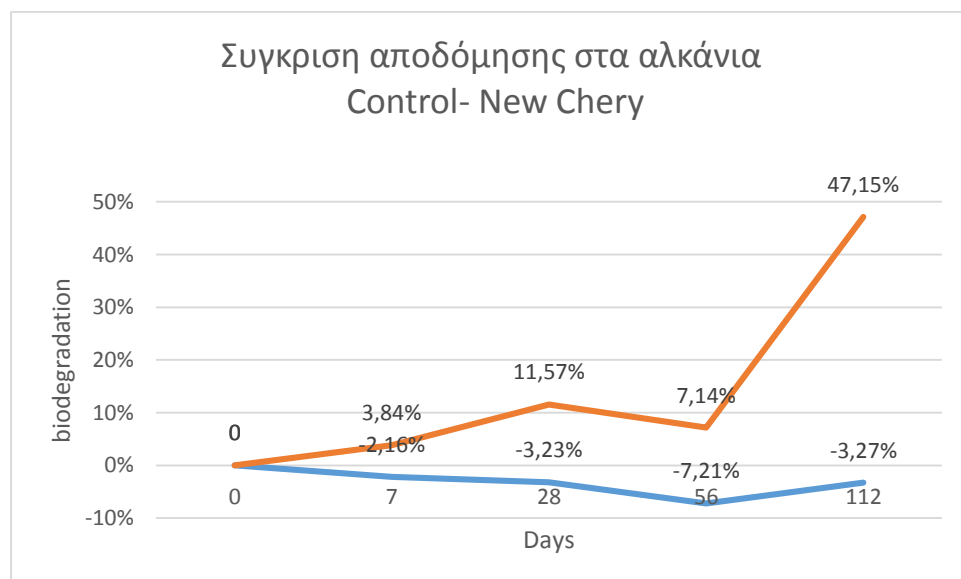
Η καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία επαλήθευση την μέθοδο MPN και το συμπέρασμα πως

### 3.4 Συγκριτικά αποτελέσματα Control , Marichem , New Chery



Διάγραμμα 14 Μέγιστος πιθανός αριθμός οργανισμών C , New , Mar σε συνάρτηση με τον χρόνο

Ο αρχικός πληθυσμός φαίνεται είναι ο ίδιος και στα 3 δείγματα , άλλα μετρά τις 7 ημέρες το δείγμα NEW δείχνει την διάθεση για μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τα άλλα 2 δείγματα. Στη συνέχεια το NEW αυξάνεται ραγδαία , το Control αυξάνεται σταδιακά και το δείγμα Mar να ακολουθεί πτωτική πορεία και να μηδενίζεται.



Διάγραμμα 15 Αποδόμηση αλκανίων Control , New σε συνάρτηση με τον χρόνο

Στο διάγραμμα 15 φαίνεται η αδυναμία των μικροοργανισμών να αποδημήσουν το πετρέλαιο σε αντίθεση με την προσθήκη του New Chery όπου παρουσιάζουν ποσοστά αποδόμησης.

### 3.5 Συμπεράσματα

Στη παρούσα διπλωματική εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα μικροβιακών κονσορσίων, τα οποία απομονώθηκαν από θαλάσσιο περιβάλλον εκτεθειμένο σε χρόνια ρύπανση σε μαζούτ ,με την προσθήκη θρεπτικών καθώς και η αποτελεσματικότητα τους με την προσθήκη 2 διαφορετικών επιφανιοδραστικών ουσιών. Η μια ουσία ήταν το dispersant Marichem ( MAR) και η άλλη ουσία το bio-surfactant New Chery ( NEW).

Το δείγμα Control, που περιείχε τους μικροοργανισμούς και τα θρεπτικά, δεν έδειξε καμία μείωση στα συστατικά των αλκανίων και το κλάσμα των αρωματικών συστατικών παρέμεινε σταθερό σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί από μόνοι τους , χωρίς την χρήση κάποιας επιφανιοδραστικής ουσίας , δεν μπορούν να πετύχουν σημαντικά ποσοστά αποδόμησης στα συστατικά του πετρελαίου IFO 180.

Το δείγμα MAR, με το dispersant Marichem, αποδείχθηκε τοξικό για τους μικροοργανισμούς μηδενίζοντας τον πληθυσμό τους στις πρώτες 28 ημέρες του πειράματος. Παρόλου που έχει χαρακτηριστεί από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών ( ΕΛΚΕΘΕ ) ως μη τοξική ουσία , οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί κρίνονται ως ευάλωτοι απέναντι στο χημικό Marichem.

Το δείγμα NEW , με το bio-surfactant NEW CHERY, έδειξε αποδόμηση στο τέλος του πειράματος στο σύνολο των αλκανίων 47.5%. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης εμφανίστηκαν στα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους( C14-C20 ) όπου τα αποτελέσματα αυξήθηκαν από 7 % που ήταν στις 7 ημέρες , σε 35% στις 28 ημέρες , 34 % στις 56 , και τέλος 87% αποδόμηση στις 112 ημέρες όπου και τελείωσε το πείραμα. Εξίσου καλά αποτελέσματα εμφανίστηκαν στα συστατικά μεσαίου μοριακού βάρους( C20-C30 ) με αποδόμηση 44 % και στο πρυστάνιο- φυντάνιο αποδόμηση 30% .Στα βαριά συστατικά ( C31-C35 ) δεν παρουσιάστηκε κάποια μείωση. Από τα αρωματικά συστατικά δεν παρουσιάστηκε κάποια σημαντική αλλαγή στα συστατικά τους. Ως παρατήρηση πρέπει να προστεθεί πως σε όλα τα αλκάνια, τα ποσοστά αποδόμησης των 56 ημερών ήταν ελαφρώς μειωμένα σε σχέση με αυτά των 28 ημερών , και στη συνέχεια αυξήθηκαν πάλι. Σε αυτό βοήθησε η προσθήκη των θρεπτικών στα δείγματα που έγινε στο μεσοδιάστημα μεταξύ των 56 και 112 ημερών.

Εν κατακλείδι, οι βιοδιεγερμένων αποδομητές χρειάζονται περισσότερο χρόνο για την αποδόμηση βαρύ πετρελαίου όμως το IFO 180. Η ουσία Marichem κρίνεται ως ακατάλληλη για τους συγκεκριμένους οργανισμούς και η προσθήκη bio-surfactant New Chery παρουσιάζει αποδόμηση σχεδόν κατά το ήμισυ στα αλκάνια στις 112 ημέρες του πειράματος.

## 4 Βιβλιογραφία

1. International Energy Statistics  
<http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=5&pid=55&aid=1&cid=regions&syid=2014&eyid=2014&unit=TBPD>
2. OPEC [http://www.opec.org/opec\\_web/en/data\\_graphs/330.htm](http://www.opec.org/opec_web/en/data_graphs/330.htm)
3. ITOPF- International Tanker Owners Pollution Federation  
<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>
4. <http://www.lankaio.com/products/ifo180cst/>
5. <http://www.marichem-marigases.com/pdfs/OIL%20SPILL%20DISPERSANT.pdf>
6. Καλογεράκης Ν, 2010 Σημειώσεις Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης περιβάλλοντος , Bioremediation ,Μέρος Ι Χανιά .Π.Κ , [www.eclass.tuc.gr](http://www.eclass.tuc.gr)
7. Nikolopoulou M, Kalogerakis N , 2011 Petroleum Spill Control with Biological Means , Elsevier B. V. p263-272
8. Nikolopoulou M., Eichenbusch P., Pasadakis N., Venieri D. and Kalogerakis N.,2013. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills. [pdf] Elsevier, New Biotechnology, vol.30, No.6 [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413000745](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413000745)
9. Nikolopoulou M., Pasadakis N. and Kalogerakis N., 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. Elsevier Marine pollution bulleting,72, 165-173. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13001896](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13001896)
10. Nikolopoulou M.,2013 Oil spills bioremediation in marine environment - biofilm characterization around oil droplets <http://dias.library.tuc.gr/view/16847>
11. Ebbing Gammon , Γενική χημεία , Οργανική Χημεία, Υδρογονάνθρακες p1036
12. Cheryl A.Page , James S.Bonner, Shahrukh A.Kanga, Marc A.Mills , Robin L. Autenrieth , Biosurfactant Solubilization of PAHS 1999 <http://serf.clarkson.edu/Publications/Peerreviewed/Page%20et%20al%20-%20EES%20paper%201999.pdf>
13. Symeonidis Georgios ,2009,Μεταπτυχιακή εργασία στην Ναυτιλία , Πετρελαϊκή ρύπανση από ατυχήματα δεξαμενόπλοιων Υπόθεση EXXON VALDEZ <http://digilib.lib.unipi.gr/dspace/bitstream/unipi/3380/1/Simeonidis.pdf>

14. Exxon Valdez, Φωτογραφίες.  
<http://www.theguardian.com/environment/gallery/2014/mar/24/exxon-valdez-oil-spill-in-pictures>
15. Drygiannaki Ilektra, 2015, Μεταπτυχιακή εργασία , Βιοδιέγερση ενδογενών αποδομητών πετρελαίου με υλικά χαμηλού κόστους.  
[www.dias.library.tuc.gr/view/26777?show=full](http://www.dias.library.tuc.gr/view/26777?show=full)
16. Deepwater Horizon <https://www.sciencenews.org/article/five-years-deepwater-horizon-oil-spills-impact-lingers>
17. Deepwater Horizon φωτογραφίες  
<http://www.telegraph.co.uk/news/earth/earthpicturegalleries/8453474/BP-oil-spill-30-pictures-of-the-Deepwater-Horizon-Gulf-of-Mexico-disaster-one-year-ago.html>
18. Prestige  
[http://www.oikologos.gr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=124&Itemid=191](http://www.oikologos.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=124&Itemid=191)
19.  
<http://worldoceanreview.com/en/wor-3-overview/oil-and-gas/oiling-the-oceans/>
20. Prestige oil tanker disaster crew acquitted in Spain  
<http://www.bbc.com/news/world-europe-24930976>