

M. Sc. Thesis

**«Βιοεξυγίανση ρυπασμένης άμμου με IFO-180 με χρήση κομπόστ
πτηνοτροφείου, ή λιπάσματος φυτικής προέλευσης σε συνδυασμό με
βιοτασιενεργές ενώσεις»**

Χατάς Ιωάννης

Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική

Εξεταστική Επιτροπή

Καλογεράκης Νικόλαος

Βενιέρη Δανάη

Πασαδάκης Νικόλαος

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



Chania

Αύγουστος, 2015



Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια φοίτησης μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του τμήματος των Μηχανικών Περιβάλλοντος Πολυτεχνείου Κρήτης με τίτλο «Περιβαλλοντική & Υγειονομική Μηχανική».

Θα ήθελα με την σειρά μου να ευχαριστήσω τον κ. **Καλογεράκη Νικόλαο**, καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος και επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, για την συνεργασία του στην επιλογή του θέματος καθώς και για τις συμβουλές και διόρθωση της εργασίας. Επιπλέον ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κα **Βενιέρη Δανάη**, επίκουρη καθηγήτρια της σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος και κ. **Πασαδάκη Νικόλαο** αναπληρωτή καθηγητή της σχολής Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην εξέταση της εργασίας καθώς και για την ευγενική παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και διαθέσιμων χώρων απαραίτητα στοιχεία για την εκπόνηση των πειραμάτων.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κα. **Νικολοπούλου Μαρία** μεταδιδακτορική ερευνήτρια της σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος για την άριστη συνεργασία, συμπαράσταση, πολύτιμες συμβουλές και βοήθεια της στην οργάνωση της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποίηση των μετρήσεων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ακόμα ευχαριστώ ιδιαίτερα τον συνάδελφο **Ντάνο Ευάγγελο**, με τον οποίο μοιραστήκαμε τον πειραματικό φόρτο μετρήσεων και αναλύσεων, για τη συνεργασία και συμβολή του στην παρούσα εργασία, καθώς και τις **Σπυριδάκη Ελένη** και **Μητροπούλου Όλγα** για την συντροφιά στο εργαστήριο. Τέλος ευχαριστώ πάρα πολύ την οικογένεια και τους γονείς μου **Κωνσταντίνο** και **Μαρία** οι οποίοι σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου ήταν πάντα στο πλευρό μου, που με στήριζαν ανελλιπώς με κάθε τρόπο σε όλες τις αποφάσεις και επιλογές μου.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αρχικά γίνεται αναφορά στα διάφορα περιστατικά σχηματισμού πετρελαιοκηλίδων καθώς και τα προβλήματα που αυτές μπορούν να δημιουργήσουν στην ευρύτερη περιοχή. Ακολουθεί η ανάλυση των διαθέσιμων τεχνικών και μεθόδων αποκατάστασης της θαλάσσιας και παράκτιας ρύπανσης από το πετρέλαιο, συμπεριλαμβανομένης και της εξεταζόμενης μεθόδου, της εδαφικής καλλιέργειας ή αλλιώς Land Farming. Έπειτα στο πειραματικό μέρος εξετάζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αποκατάστασης ρυπασμένης άμμου από IFO-180 με βιο-διέγερση (biostimulation) των αυτόχθονων μικροοργανισμών. Έγινε εξέταση συνολικά 7 δοχείων με άμμο από την παραλία του Αγίου Ονούφριου (Χανιά, Ελλάδα) σε κάθε ένα από τα οποία έγινε προσθήκη διαφορετικού μίγματος λιπάσματος φωσφόρου και αζώτου σε συνδυασμό με ή χωρίς επιφανειοδραστική ουσία Oil Be Gone. Εξετάστηκαν τα εξής οργανικά λιπάσματα: Αγροσύν, Λεκιθίνη Σόγιας, Besfoliar 36 Extra, Avant Natur 8-4-6. Πραγματοποιείται παρουσίαση των αποτελεσμάτων για κάθε δείγμα ξεχωριστά και ακολουθεί μια συγκριτική αξιολόγηση τους. Τέλος εξάγονται τα συνολικά συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου στην απομάκρυνση του πετρελαίου από την άμμο μαζί με τις μελλοντικές προτάσεις για βελτίωση της πειραματικής διαδικασίας και επιπλέον αξιολόγησης των θρεπτικών συστατικών.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
2 Περιστατικά δημιουργίας πετρελαιοκηλίδων, επιπτώσεις και τεχνικές αντιμετώπισης	12
2.1 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων	12
2.2 Επιπτώσεις πετρελαϊκής ρύπανσης	19
2.2.1 Επιπτώσεις του πετρελαίου στη χλωρίδα	20
2.2.2 Επιπτώσεις στην πανίδα.....	21
2.2.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	22
2.2.4 Επιπτώσεις στην οικονομία και τον τουρισμό	23
2.3 Τρόποι αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων σε παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα .	24
2.3.1 Φυσικές Μέθοδοι	25
2.3.2 Μη Χημικές Μέθοδοι	26
2.3.3 Χημικές Μέθοδοι.....	27
2.3.4 Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως τεχνολογία καθαρισμού	28
2.3.5 Η τεχνική Landfarming.....	29
3 Στάδια εφαρμογής της “εδαφικής καλλιέργειας” και προστασία από την εξάπλωση του ρύπου.....	31
3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της τεχνικής Landfarming	33
3.1.1 Χαρακτηριστικά εδάφους	34
3.1.2 Χαρακτηριστικά ρύπου.....	36
4 Ιδιότητες αργού πετρελαίου και τύποι πετρελαίου	38
4.1 Χημική σύσταση του αργού πετρελαίου και των προϊόντων του	38



4.2	Φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου	40
4.3	Τύποι πετρελαίου	41
4.4	Τύχη του πετρελαίου στο περιβάλλον.....	43
5	Μηχανισμοί αποδόμησης πετρελαίου από μικροοργανισμούς.....	45
5.1	Ο ρόλος των επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants)	47
5.2	Εκτίμηση του βαθμού αποδόμησης- Εφαρμογή βιοδεικτών (Biomarkers)	51
6	Υλικά και μέθοδοι - Αποτελεσματικότητα των παραγόντων βιοεξυγίανσης	52
6.1	Περίληψη μεθόδου	52
6.2	Προετοιμασία πετρελαίου και άμμου	53
6.2.1	Προετοιμασία Πετρελαίου.....	53
6.2.2	Προετοιμασία άμμου και ρύπανση της με πετρέλαιο	53
6.3	Καθορισμός των χαρακτηριστικών του χώματος	54
6.3.1	Ικανότητα συγκράτησης νερού.....	54
6.3.2	Περιεκτικότητα σε νερό και ξηρή μάζα χώματος.....	54
6.4	Λιπάσματα και επιφανειοδραστικές ουσίες	55
6.5	Λεκιθίνη σόγιας.....	56
6.6	Oil Be Gone.....	56
6.7	Basfoliar 36 extra	56
6.8	AvantNatur 8-4-6	56
6.9	Οργανικό Λίπασμα “ΑΓΡΟΣΥΝ”	57
7	Δειγματοληψία - Δομή πειράματος	58
7.1	Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	59
7.1.1	Μέθοδος MPN (Most Probable Number)	59



7.1.2	Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού σε τριβλία.....	62
7.2	Χημικές αναλύσεις.....	64
7.2.1	Εκχύλιση δειγμάτων σε συσκευή Soxhlet	64
7.2.2	Προετοιμασία δείγματος και εκχύλιση του	65
7.2.3	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) - Κλασματοποίηση πετρελαίου	66
7.2.4	Προετοιμασία δείγματος - Διαδικασία SPE.....	67
7.2.5	Ανάλυση GC/MS	68
7.2.6	Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία ανάλυσης GC/MS	69
8	Επεξεργασία και συζήτηση αποτελεσμάτων	73
8.1	Δείγμα “Μάρτυρας” - Control	73
8.1.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος Control.....	74
8.1.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος Control.....	77
8.1.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος Control.....	77
8.2	Δείγμα [“ΑΓΡΟΣΥΝ” + Λεκιθίνη] ⇔ (AL).....	79
8.2.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος AL.....	79
8.2.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος AL.....	81
8.2.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος AL.....	81
8.3	Δείγμα [“ΑΓΡΟΣΥΝ”+ Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (ALB).....	83
8.3.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ALB	83
8.3.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ALB	85
8.3.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ALB	85
8.4	Δείγμα [Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη] ⇔ (ANL)	86



8.4.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ANL.....	87
8.4.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ANL.....	89
8.4.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ANL.....	89
8.5	Δείγμα [Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (ANLB)	91
8.5.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ANLB	91
8.5.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ANLB	93
8.5.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ANLB	93
8.6	Δείγμα [Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη] ⇔ (B36L).....	95
8.6.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος B36L.....	95
8.6.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος B36L.....	97
8.6.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος B36L.....	98
8.7	Δείγμα [Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (B36LB).....	100
8.7.1	Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος B36LB	100
8.7.2	Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος B36LB	102
8.7.3	Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος B36LB	102
9	Συγκριτικά αποτελέσματα - Συνολικά συμπεράσματα.....	104
9.1	Σύγκριση πληθυσμών MPN και CFUs.....	104
9.2	Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20	106
9.3	Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30	107
9.4	Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35	109
9.5	Σύγκριση βιοαποδόμησης αρωματικών συστατικών	111
9.6	Συμπεράσματα-Προτάσεις	115
10	Βιβλιογραφία	117



ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 2.1: Πηγές εισαγωγής πετρελαίου στη θάλασσα.....	12
Εικόνα 2.2: Αριθμός πετρελαιοκηλίδων άνω των 700 τόνων (Πηγή ΙΤΟΡΡ).....	16
Εικόνα 2.3: Αξιοσημείωτες ποσότητες πετρελαίου που διέρρευσαν από μεμονωμένα ατυχήματα (Πηγή ΙΤΟΡΡ).....	17
Εικόνα 2.4: Οι καταστροφικές συνέπειες της διαρροής του Εχχον Valdez στο οικοσύστημα....	18
Εικόνα 2.5: Επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς διαφόρων κλασμάτων του πετρελαίου [Πηγή ΙΤΟΡΡ].....	20
Εικόνα 2.6: Νεογνό φώκιας έπειτα την επαφή του με πετρέλαιο.....	21
Εικόνα 2.7: Πελεκάνος ανήμπορος να αντιδράσει.....	22
Εικόνα 2.8: Τεχνικές αντιμετώπισης-καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων.....	24
Εικόνα 2.9: Τεχνικές αντιμετώπισης – καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων.....	24
Εικόνα 3.1: Εγκατάσταση επεξεργασίας εδάφους με την τεχνική Landfarming (ΕΡΑ).....	32
Εικόνα 4.1: Αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο.....	39
Εικόνα 4.2: Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου (Πηγή: ΙΤΟΡΡ).....	43
Εικόνα 4.3: Διάρκεια και έκταση διεργασιών γήρανσης σε μία πετρελαιοκηλίδα (Πηγή: SINTEF).....	44
Εικόνα 5.1: Τυπική δομή επιφανειοδραστικής ουσίας και μυκήλιοπου περιέχει το παγιδευμένο πετρέλαιο (Univerity of Waikato-2012).....	49
Εικόνα 5.2: Δομή χοπανίων [41].....	51
Εικόνα 7.1: Εγκατάσταση διεξαγωγής των πειραμάτων.....	59
Εικόνα 7.2: Διαδικασία αραιώσεων και εμβολιασμού πηγαδιών.....	62
Εικόνα 7.3: Διαδικασία καταμέτρησης μικροβιακού πληθυσμού.....	64
Εικόνα 7.4: Συσκευή Soxhlet.....	65
Εικόνα 7.5:Διάταξη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) [Πηγή: SigmaAldrich].....	67
Εικόνα 7.6: Διάταξη συστήματος GC/MS [50].....	68



Εικόνα 7.7: Ταξινόμηση αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης [43]	70
Εικόνα 7.8: Πρωτεύοντα ιόντα για τον κάθε αναλυτή στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS [43]	71
Εικόνα 7.9: Αναλύτες και συστατικά αναφοράς	72
Εικόνα 8.1: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου . Δείγμα Control Days 0-100	74
Εικόνα 8.2: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος Control.	75
Εικόνα 8.3: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα Control Days (0-100).....	77
Εικόνα 8.4: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα Control	78
Εικόνα 8.5: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου Δείγμα AL - Days (0-100)	79
Εικόνα 8.6: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος AL	80
Εικόνα 8.7: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα AL Days (0-100)	81
Εικόνα 8.8: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα AL	82
Εικόνα 8.9 Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ALB - Days (0-100)	83
Εικόνα 8.10: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ALB	84
Εικόνα 8.11: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ALB Days (0-100).....	85



Εικόνα 8.12: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ALB.....	86
Εικόνα 8.13 Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANL - Days (0-100)	87
Εικόνα 8.14: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ANL	88
Εικόνα 8.15: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANL - Days (0-100)	89
Εικόνα 8.16: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ANL	90
Εικόνα 8.17: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANLB - Days (0-100)	91
Εικόνα 8.18: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ANLB.....	92
Εικόνα 8.19: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANLB - Days (0-100)	93
Εικόνα 8.20: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ANLB.....	94
Εικόνα 8.21: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36L - Days (0-100)	95
Εικόνα 8.22: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος B36L	96
Εικόνα 8.23: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36L - Days (0-100)	97
Εικόνα 8.24: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα B36L	99
Εικόνα 8.25: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36LB – Days (0-100).....	100



Εικόνα 8.26: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος B36LB.....	101
Εικόνα 8.27: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου.Δείγμα B36LB - Days (0-100).....	102
Εικόνα 8.28: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα B36LB.....	103
Εικόνα 9.1: Σύγκριση μικροβιακών πληθυσμών που αποδομούν το πετρέλαιο για όλα τα δείγματα σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων	104
Εικόνα 9.2: Σύγκριση μικροβιακού πληθυσμού σε όλα τα δείγματα για τις πρώτες 60 ημέρες	105
Εικόνα 9.3: Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20 για τα δείγματα AL, ANL και B36L	106
Εικόνα 9.4: Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB	107
Εικόνα 9.5: Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30 για τα δείγματα AL, ANL και B36L	108
Εικόνα 9.6: Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB	108
Εικόνα 9.7: Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35 για τα δείγματα AL, ANL και B36L	109
Εικόνα 9.8: Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB	110
Εικόνα 9.9: Ποσοστιαία βιοαποδόμηση πριτανίου και φυτανίου σε όλα τα δείγματα	111
Εικόνα 9.10: Ποσοστό βιοαποδόμησης Fluorene σε όλα τα δείγματα στις 15 ημέρες	112
Εικόνα 9.11: Ποσοστό βιοαποδόμησης Phenanthrene σε όλα τα δείγματα στις 15 ημέρες.....	113
Εικόνα 9.12: Ποσοστό βιοαποδόμησης Dibenzothiophene σε όλα τα δείγματα για τις ημέρες 15 και 30	113
Εικόνα 9.13: Ποσοστό βιοαποδόμησης Chrysene σε όλα τα δείγματα, Days (0-100).....	114
Εικόνα 9.14: Ποσοστό βιοαποδόμησης Pyrene σε όλα τα δείγματα, Days 0-100	114



1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η ρύπανση των θαλασσών απασχολεί ολοένα και περισσότερο την επιστημονική κοινότητα και έχει αναδειχθεί σε μείζονος σημασίας θέμα σε διεθνές επίπεδο, ειδικά μετά από μια σειρά ναυτικών ατυχημάτων που συνέβησαν τις προηγούμενες δεκαετίες.

Ο όρος “θαλάσσια ρύπανση” χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 στη Διακήρυξη της Στοκχόλμης για την προστασία του περιβάλλοντος. Η Ομάδα Ειδικών στο Ζήτημα της Προστασίας του Θαλάσσιου Περιβάλλοντος ορίζει τη θαλάσσια ρύπανση ως: “κάθε άμεση ή έμμεση ανθρωπογενούς προέλευσης εισαγωγή ουσιών ή ενέργειας στο θαλάσσιο χώρο (συμπεριλαμβανομένων των εκβολών των ποταμών), η οποία έχει μια βλαβερή επίδραση στους ζώντες οργανισμούς ή είναι επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία ή εμποδίζει τη χρήση της θάλασσας (συμπεριλαμβανομένης της αλιείας) ή αλλοιώνει την ποιότητα του θαλασσινού νερού ή υποβαθμίζει τις δυνατότητες χρησιμοποίησής του για ψυχαγωγικούς σκοπούς”. Ο νόμος 743 του Ελληνικού Κράτους περί προστασίας του θαλάσσιου περιβάλλοντος, ορίζει ως θαλάσσια ρύπανση, τη παρουσία στη θάλασσα κάθε ουσίας, η οποία αλλοιώνει τη φυσική κατάσταση του θαλάσσιου ύδατος ή το καθιστά επιβλαβές για την υγεία του ανθρώπου ή την πανίδα.

Μια σημαντική πηγή θαλάσσιας ρύπανσης αποτελούν τα πετρελαιοειδή. Η ρύπανση αυτή με εκατομμύρια τόνους πετρελαίου γίνεται είτε σκόπιμα είτε μετά από κάποιο δυστύχημα, ενώ ένα μεγάλο μέρος της οφείλεται στην λειτουργική δραστηριότητα των πλοίων.

Η υποβάθμιση του θαλάσσιου περιβάλλοντος με πετρελαιοειδή έχει τεράστιες συνέπειες στο φυσικό περιβάλλον. Το πετρέλαιο ως ελαφρύτερο από το νερό επιπλέει στην επιφάνεια του. Από τη στιγμή που θα βρεθεί στη θάλασσα, αρχίζει μια αργή, φυσική διαδικασία οξείδωσης και βιοδιάσπασης του από μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να διασπούν υδρογονάνθρακες.

Το υπόλειμμα του πετρελαίου περίπου 3 μήνες μετά τη δημιουργία της πετρελαιοκηλίδας αποτελείται από ένα υδρόφοβο τμήμα, το οποίο συσσωματώνεται σε σβώλους και ένα υδρόφιλο τμήμα, το οποίο προσλαμβάνει μεγάλες ποσότητες νερού και μετατρέπεται σε ένα παχύρρευστο γαλάκτωμα. Οι σβώλοι κατακάθονται στο βυθό ή μεταφέρονται με τη βοήθεια ρευμάτων στις κοντινές ακτές μαζί με το παχύρρευστο γαλάκτωμα, όπου παραμένουν για λίγους μήνες ή και για χρόνια.

Λόγω απουσίας έντονων καιρικών φαινομένων στη Μεσόγειο, αλλά και λόγω της μεγάλης αλατότητας, η φυσική διάλυση μιας πετρελαιοκηλίδας δυσχεραίνεται και συνεπώς τεχνικές απορρύπανσης πρέπει να εφαρμοστούν.

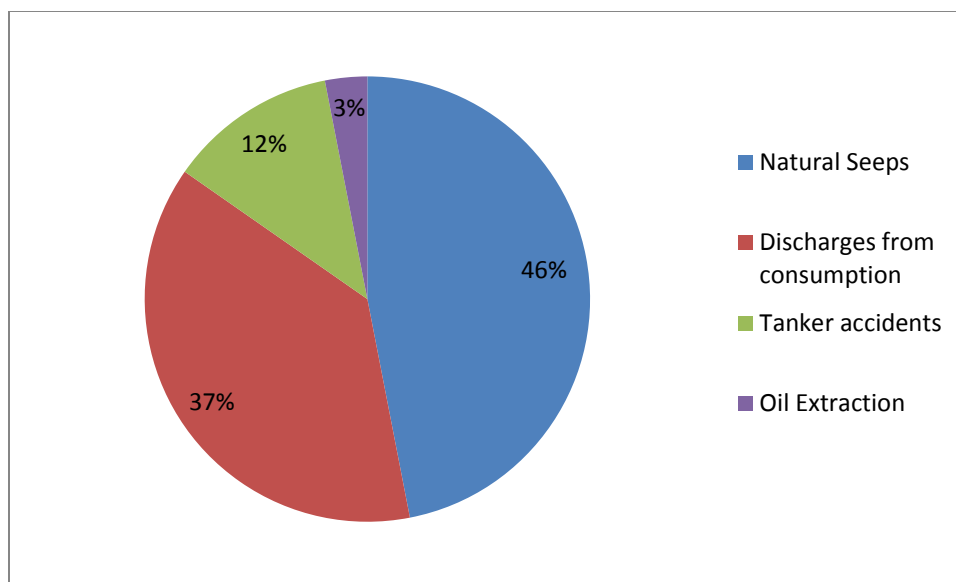
Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η βιοεξυγίανση ρυπασμένης άμμου με τη χρήση κόμποστ ή διαφόρων λιπασμάτων σε συνδυασμό με βιοτασιενεργές ενώσεις. Στα κεφάλαια που ακολουθούν παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου.



2 ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ, ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ

2.1 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων

Η κοινωνία μας συνεχίζει να στηρίζεται στη χρήση των υδρογονανθράκων πετρελαίου για τις ενεργειακές ανάγκες της. Παρά τις πρόσφατες τεχνολογικές προόδους, τα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες του αργού πετρελαίου και των προϊόντων του εμφανίζονται σε συχνή βάση κατά τη διάρκεια των διεργασιών εξαγωγής, μεταφοράς, αποθήκευσης και διανομής. Υπολογίζεται ότι, μεταξύ 1,3 και 8,8 εκατομμυρίων μετρικών τόνων του πετρελαίου απελευθερώνεται στο υδάτινο περιβάλλον κάθε έτος [1], των οποίων περισσότερο από 90% σχετίζεται άμεσα με τις ανθρώπινες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένης της σκόπιμης διάθεσης αποβλήτων. Αντίθετα με την κοινή αντίληψη, μόνο το 12% του πετρελαίου που απελευθερώνεται στο υδρόβιο περιβάλλον προέρχεται από τα ατυχήματα δεξαμενόπλοιων. [2]



Εικόνα 2.1: Πηγές εισαγωγής πετρελαίου στη θάλασσα



Ο Πίνακας 2.1 που ακολουθεί, συνοψίζει τις 20 μεγαλύτερες διαρροές πετρελαίου από ατυχήματα δεξαμενόπλοιων που συνέβησαν από το 1967 (TORREY CANYON) και έπειτα [3]. Αξίζει να σημειωθεί ότι 19 από τις 20 μεγαλύτερες διαρροές που έχουν καταγραφεί, έγιναν πριν το 2000. Πολλά από τα περιστατικά αυτά, σε αντίθεση με τα EXXON VALDEZ και HEBEI SPIRIT, δεν έχουν γίνει γνωστά, καθώς οι διαρροές δεν είχαν άμεσες επιπτώσεις στην ακτογραμμή παρά το μεγάλο όγκο πετρελαίου που ρύπανε το θαλάσσιο περιβάλλον.

Πίνακας 2.1: Οι 20 μεγαλύτερες καταγεγραμμένες διαρροές πετρελαίου

Position	Name	Year	Location	Spill Size(tones)
1	ATLANTIC EMPRESS	1979	Off Tobago, West Indies	287,000
2	ABT SUMMER	1991	700 nautical miles off Angola	260,000
3	CASTILLO DE BELLVER	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252,000
4	AMOCO CADIZ	1978	Off Brittany, France	223,000
5	HAVEN	1991	Genoa, Italy	144,000
6	ODYSSEY	1988	nautical miles off Nova Scotia	132,000
7	TORREY CANYON	1967	Scilly Isles	119,000
8	SEA STAR	1972	Gulf of Oman	115,000
9	IRENES SERENADE	1980	Navarino Bay, Greece	100,000
10	URQUIOLA	1976	La Coruna, Spain	100,000
11	HAWAIIAN PATRIOT	1977	300 nautical miles off Honolulu	95,000
12	INDEPENDENTA	1979	Bosphorus, Turkey	94,000
13	JAKOB MAERSK	1975	Oporto, Portugal	88,000
14	BRAER	1993	Shetland Islands, UK	85,000
15	AEGEAN SEA	1992	La Coruna, Spain	74,000
16	SEA EMPRESS	1996	Milford Haven, UK	72,000
17	KHARK	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	70,000
18	NOVA	1985	Off Kharg Island, Gulf of Iran	70,000
19	KATINA P	1992	Off Maputo, Mozambique	67,000
20	PRESTIGE	2002	Off Galicia, Spain	63,000
35	EXXON VALDEZ	1989	Prince William Sound, Alaska	37,000
131	HEBEI SPIRIT	2007	Tae'an, Republic of Korea	11,000



Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.2) παρουσιάζονται οι πετρελαιοκηλίδες που σχηματίστηκαν, καθώς και οι ποσότητες πετρελαίου που απελευθερώθηκαν από το 1970 έως το 2014. Τα στοιχεία προέρχονται από τη βάση δεδομένων του International Tanker Owners Pollution Federation's oil spill database [3].

Πίνακας 2.2: Αριθμός πετρελαιοκηλίδων και ποσότητες πετρελαίου τα έτη 1970-2014.

Year	7-700 tones	>700 tones	Quantity (tones)
1970	7	29	386,000
1971	18	14	144,000
1972	48	27	313,000
1973	28	31	159,000
1974	90	27	173,000
1975	96	20	351,000
1976	67	26	364,000
1977	70	16	276,000
1978	59	23	393,000
1979	60	32	636,000
1970s Total			3,195,000
1980	52	13	206,000
1981	54	7	48,000
1982	46	4	12,000
1983	52	13	384,000
1984	26	8	29,000
1985	33	8	85,000
1986	27	7	19,000
1987	27	11	38,000
1988	11	10	190,000
1989	32	13	164,000
1980s Total			1,175,000



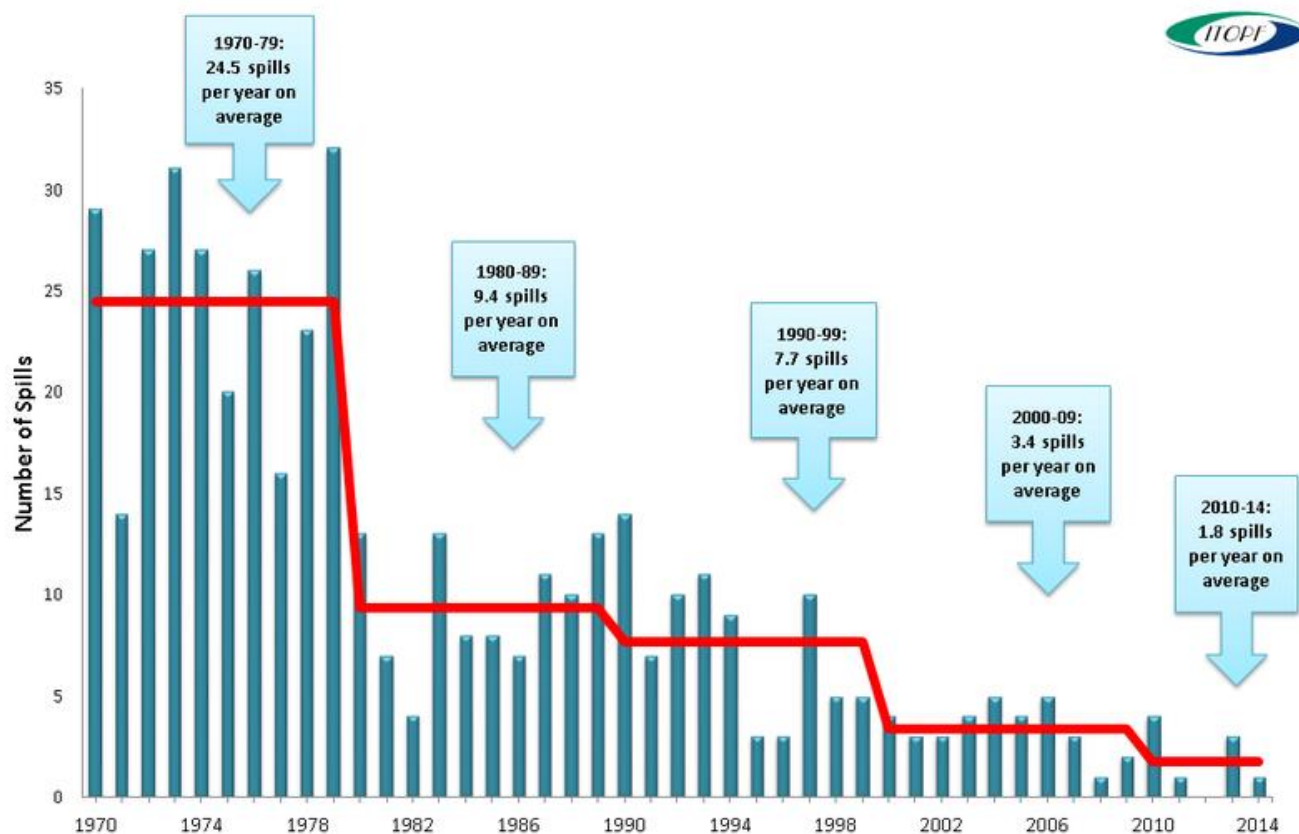
1990	50	14	61,000
1991	30	7	431,000
1992	31	10	167,000
1993	31	11	140,000
1994	26	9	130,000
1995	20	3	12,000
1996	20	3	80,000
1997	28	10	72,000
1998	25	5	13,000
1999	20	5	28,000
1990s Total			1,134,000
2000	21	4	14,000
2001	18	3	9,000
2002	11	3	66,000
2003	18	4	43,000
2004	19	5	16,000
2005	21	4	18,000
2006	11	5	22,000
2007	12	3	15,000
2008	7	1	2,000
2009	7	2	3,000
2000s Total			208,000
2010	5	4	12,000
2011	5	1	2,000
2012	7	0	1,000
2013	5	3	7,000
2014	4	1	4,000

Είναι αξιοσημείωτο ότι μερικά πολύ μεγάλα ατυχήματα που οδήγησαν σε σχηματισμό πετρελαιοκηλίδων είναι υπεύθυνα για το υψηλό ποσοστό πετρελαίου που διαρρέει στο περιβάλλον. Για παράδειγμα την δεκαετία του 1990 υπήρξαν 358 ατυχήματα με μέγεθος μεγαλύτερο των 7 τόνων, που απελευθέρωσαν 1140 χιλιάδες τόνους πετρελαίου, αλλά οι 830 χιλιάδες τόνοι (73%) από το σύνολο προήλθαν από μόλις 10 μεγάλα ατυχήματα, δηλαδή μόνο 3% των συνολικών ατυχημάτων της δεκαετίας. Ανάλογα την δεκαετία του 2000 υπήρξαν 179

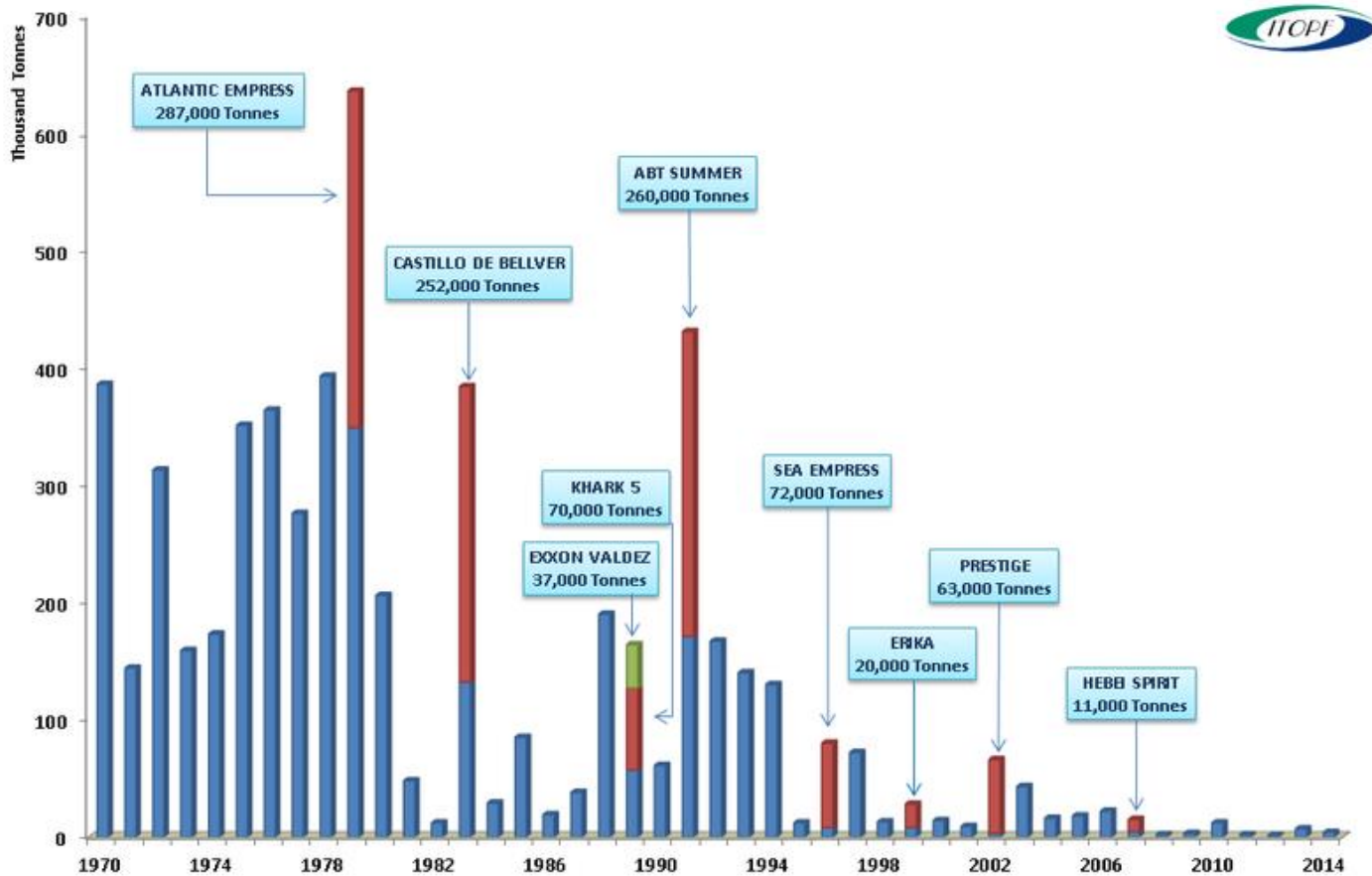


πετρελαιοκηλίδες 7 τόνων και άνω, που απελευθέρωσαν 208 χιλιάδες τόνους πετρελαίου από το οποίο το 55% προήλθε από μόνο 4 περιστατικά. Τέλος στα έτη 2010 με 2014 έγιναν 35 πετρελαιοκηλίδες με το 90% της ποσότητας του πετρελαίου να προήλθε από 9 ατυχήματα.

Οι ποσότητες πετρελαίου που καταλήγουν στη θάλασσα μπορούν συνεπώς να διαστρεβλωθούν σοβαρά από ένα μεμονωμένο μεγάλο περιστατικό. Αυτό διακρίνεται σαφώς από την εικόνα 1.3 το 1970 με το Atlantic Empress, το 1983 με τον Castillo de Bellver και το 1991 με το ABT Summer.



Εικόνα 2.2: Αριθμός πετρελαιοκηλίδων άνω των 700 τόνων (Πηγή ΙΤΟΠΦ)



Εικόνα 2.3: Αξιοσημείωτες ποσότητες πετρελαίου που διέρρευσαν από μεμονωμένα ατυχήματα (Πηγή ITOPF)

Οι θαλάσσιες ακτές είναι σημαντικοί δημόσιοι και οικολογικοί πόροι που αποτελούν το σπίτι για ποικίλα είδη της άγριας φύσης και παρέχουν δημόσια αναψυχή. Οι θαλάσσιες πετρελαιοκηλίδες, ιδιαίτερα τα ατυχήματα μεγάλης κλίμακας, έχουν θέσει σε μεγάλο κίνδυνο και έχουν προκαλέσει εκτενή ζημιά στα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα. Παραδείγματος χάριν, η πετρελαιοκηλίδα 37.000 τόνων αργού πετρελαίου North Slope στον Prince William Sound, της Αλάσκας, από το Exxon Valdez το 1989, οδήγησε στη θνησιμότητα χιλιάδων θαλασσοπουλιών και θαλάσσιων θηλαστικών, σε σημαντική μείωση του πληθυσμού πολλών οργανισμών και σε πολλές μακροπρόθεσμες περιβαλλοντικές επιδράσεις (Εικόνα 2.4) [4].



Εικόνα 2.4: Οι καταστροφικές συνέπειες της διαρροής του Exxon Valdez στο οικοσύστημα



2.2 Επιπτώσεις πετρελαϊκής ρύπανσης

Οι επιπτώσεις της ρύπανσης από πετρελαιοειδή στο θαλάσσιο αλλά και χερσαίο περιβάλλον εξαρτώνται από την ποσότητα, τον τύπο και την συγκέντρωση των υδρογονανθράκων που έχουν διαχυθεί στην περίπτωση ενός ατυχήματος καθώς και το σημείο εκδήλωσης και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν σε αυτό. Άλλοι παράγοντες αποτελούν η βιολογική σύσταση του υπό έκθεση περιβάλλοντος, η οικολογική σημασία των ειδών οργανισμών που ζουν και αναπτύσσονται σε αυτό και την ευαισθησία τους στην ρύπανση από το πετρέλαιο. Ορισμένα ελαφριά συστατικά του πετρελαίου, που είναι και πιο τοξικά, μπορεί να εξατμιστούν γρήγορα μετά την επαφή τους με το περιβάλλον, περιορίζοντας έτσι τον βαθμό έκθεσης του ανθρώπου, των ζώων και φυτών στον ρύπο παρά μόνο στην περιοχή του συμβάντος. Παρόλο που μερικοί οργανισμοί μπορεί να πεθάνουν από την άμεση επαφή με το πετρέλαιο, τα έμμεσα τοξικά αποτελέσματα είναι πιο διακριτά και με επιπτώσεις μεγάλης διάρκειας, όπως για παράδειγμα η διατάραξη των διατροφικών συνηθειών των οργανισμών. [5]

Οι επιπτώσεις στους οργανισμούς μπορούν να είναι οι παρακάτω:

- Πιθανή ύπαρξη ανοξικών συνθηκών και συνεπώς πρόκληση ασφυξίας μέχρι θανάτου σε θαλάσσιους οργανισμούς
- Παρεμπόδιση στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή των θαλάσσιων οργανισμών
- Διατάραξη της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς των οργανισμών
- Τοξικές επιδράσεις σε πλαγκτονικούς και βενθικούς οργανισμούς
- Βιοσυσσώρευση κάποιων υδρογονανθράκων μέσω της τροφικής αλυσίδας

Οι πιθανές επιπτώσεις μιας πετρελαιοκηλίδας εξαρτώνται από την ταχύτητα με την οποία ο ρύπος διαλύεται ή διαχύεται στο περιβάλλον μέσω φυσικών διεργασιών. Έτσι μπορεί να καθοριστεί η γεωγραφική έκταση της περιοχής που θα εκτεθεί, καθώς και αν οι ευαίσθητες περιβαλλοντικές περιοχές θα εκτεθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις του ρύπου και των τοξικών του συστατικών.

Επιπλέον τα χαρακτηριστικά της πετρελαιοκηλίδας είναι σημαντικά για τον καθορισμό των επιπτώσεων. Για παράδειγμα μία διαρροή με μεγάλες ποσότητες επίμονου πετρελαίου, όπως το βαρύ πετρέλαιο (HFO- Heavy Fuel Oil), έχει μεγάλη πιθανότητα να προκαλέσει εκτενή ζημιά στους οργανισμούς που ζουν στις ακτογραμμές προκαλώντας πνιγμό. Παρόλα αυτά η τοξικότητα του HFO και άλλων παράγωγων με μεγάλο ιξώδες που έχουν μικρή διαλυτότητα, είναι χαμηλή αφού τα συστατικά τους είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμα. Στην αντίθετη περίπτωση ελαφρύτερα κλάσματα, όπως η κηροζίνη, παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και προκαλούν βλάβες στους οργανισμούς μέσω της τοξικότητάς τους. Στην Εικόνα 2.5 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι επιπτώσεις διαφόρων κλασμάτων του πετρελαίου στους οργανισμούς. [6]



Εικόνα 2.5: Επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς διαφόρων κλασμάτων του πετρελαίου [Πηγή ITOPF]

Οι επιπτώσεις της πετρελαϊκής ρύπανσης στα φυτά, ζώα αλλά και στον άνθρωπο περιγράφονται πιο αναλυτικά στα κεφάλαια που ακολουθούν.

2.2.1 Επιπτώσεις του πετρελαίου στη χλωρίδα

Στη χλωρίδα ενός υδάτινου οικοσυστήματος που μπορεί να ρυπανθεί από πετρέλαιο κατατάσσονται τα διάφορα είδη παράκτιων φυτών όπως τα αρμυρίκια και τα βούρλα, όλα τα φύκη και το φυτοπλαγκτόν. Τα είδη αυτά χρησιμοποιώντας την ηλιακή ενέργεια και μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό σε απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ζωή και ανάπτυξη τους. Είναι σαφές ότι φυτά και άλγη πρέπει να έχουν ανεμπόδιστη πρόσβαση σε αυτά.

Σε περίπτωση ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος με πετρέλαιο όμως η διαδικασία της φωτοσύνθεσης αναστέλλεται καθώς αυτό επιπλέει στην επιφάνεια του νερού, δημιουργώντας μία μεμβράνη η οποία εμποδίζει την διέλευση του φωτός. Επιπλέον υπάρχει πιθανότητα το πετρέλαιο να καλύψει την επιφάνεια των φυλλωμάτων όπου πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση. Ακόμα η υποβάθμιση της ποιότητας του νερού, στην περίπτωση που αυτό εισχωρήσει στο παράκτιο έδαφος, είναι ικανή να προκαλέσει διατάραξη του μικροβιακού πληθυσμού που βρίσκεται στο ριζικό σύστημα των φυτών και να μειώσει την διαθεσιμότητα οξυγόνου.



2.2.2 Επιπτώσεις στην πανίδα

Η πανίδα που ενδεχομένως να επηρεαστεί από την δημιουργία μιας πετρελαιοκηλίδας αποτελεί επίσης ένα πολύ μεγάλο σύνολο οργανισμών. Περιλαμβάνει διάφορα θηλαστικά όπως τα δελφίνια και τις φάλαινες οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλο κίνδυνο έκθεσης όταν ανεβαίνουν στην επιφάνεια για να αναπνεύσουν, προσβάλλοντας το αναπνευστικό και οπτικό τους σύστημα. Οι φώκιες και οι θαλάσσιες δρύες, ζώα τα οποία περνούν και χρόνο εκτός θάλασσας είναι πιο πιθανό να συναντήσουν και να επηρεαστούν από μια πετρελαιοκηλίδα. Τα είδη αυτά ρυθμίζουν τη θερμοκρασία του σώματος τους μέσω της γούνας τους. Έτσι το πετρέλαιο που μπορεί να προσκολληθεί επάνω σε αυτή μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία του μηχανισμού ρύθμισης και συνεπώς θάνατο από υποθερμία ή υπερθερμία ανάλογα την εποχή του έτους. Η επαφή με το πετρέλαιο μπορεί να μειώσει επίσης τις ικανότητες όρασης και όσφρησης απαραίτητες για την επιβίωση τέτοιων ειδών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση που φαίνεται στην Εικόνα 2.6 όπου ένα νεογνό φώκιας έχει καλυφθεί από πετρέλαιο.



Εικόνα 2.6: Νεογνό φώκιας έπειτα την επαφή του με πετρέλαιο

Τα θαλασσοπούλια αποτελούν τον πιο ευπαθή οργανισμό, τα οποία σε περιστατικά πετρελαιοκηλίδων, μεγάλος τους αριθμός μπορεί να εξαλειφθεί. Η κάλυψη του φτερώματος τους από το πετρέλαιο αποτελεί το κυριότερο πρόβλημα για τα πτηνά αυτά, αφού η επαφή τους με τη θάλασσα είναι συχνή μιας και αποτελεί το βασικό μέρος εύρεσης τροφής. Το φτέρωμα λειτουργεί ως μόνωση καθώς παγιδεύεται ζεστός αέρας πάνω από το δέρμα. Η λειτουργία αυτή διαταράσσεται, επιτρέποντας στο θαλασσινό νερό να έρθει σε άμεση επαφή με το δέρμα με αποτέλεσμα την απώλεια θερμότητας και αναπόφευκτα το πτηνό να υποκύψει σε υποθερμία.



Επιπλέον στην προσπάθεια του να κρατηθεί ζεστό χρησιμοποιεί τα αποθέματα λίπους εξαντλώντας πλήρως τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να καταλήγει σε θάνατο από πνιγμό. Εκτός από την εξωτερική επίδραση του πετρελαίου, μπορεί να προκληθούν και αναπνευστικά προβλήματα από την πόση του. Στην Εικόνα 2.7 φαίνεται ο αδύναμος να αντιδράσει πελεκάνος μετά την επαφή του με πετρέλαιο.



Εικόνα 2.7: Πελεκάνος ανήμπορος να αντιδράσει

Παρόλη την ευαισθησία των νεογνών ψαριών σε μικρές συγκεντρώσεις πετρελαϊκών ρύπων τα ενήλικα ψάρια είναι πιο ανθεκτικά, καθώς ενστικτωδώς αποφεύγουν περιοχές που έχουν υποστεί ρύπανση. Βέβαια η διαδικασία και μόνο μετανάστευσης τους σε άλλη περιοχή για την εξεύρεση τροφής μπορεί να αποτελέσει περιορισμό για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη τους. Οι μόνες καταγεγραμμένες περιπτώσεις όπου υπάρχει μεγάλη θνησιμότητα ψαριών είναι σε περιοχές όπου υπάρχουν ιχθυοκαλλιέργειες κοντά στην πηγή ρύπανσης ή όπου υπάρχει αδυναμία μετακίνησης του πληθυσμού, όπως σε ποτάμια ή κλειστές λεκάνες.

2.2.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Εκτός από τα θαλάσσια ζώα και πτηνά, ο άνθρωπος δεν μπορεί να μείνει ανεπηρέαστος στην περίπτωση ενός ατυχήματος πετρελαίου. Γενικώς οι υδρογονάνθρακες έχουν ποικίλες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου ανάλογα με τον βαθμό έκθεσης του σε αυτούς. Στην περίπτωση συνεργειών που εργάζονται σε περιοχές απορρύπανσης, μερικές συνέπειες στον άνθρωπο αποτελούν οι πονοκέφαλοι, ερεθισμοί στα μάτια, δύσπνοια, ενοχλήσεις στη ρινική και



λαρυγγική κοιλότητα καθώς και δερματίτιδα. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητη η χρήση προστατευτικής μάσκας και ρουχισμού από την εισπνοή και άμεση επαφή με τον ρύπο. Επιπρόσθετα υπάρχει η πιθανότητα έμμεσης προσβολής του γενικότερου πληθυσμού μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων ψαριών η οστρακοειδών.

2.2.4 Επιπτώσεις στην οικονομία και τον τουρισμό

Η διακοπή διαφόρων ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων όπως, κολύμβηση, κωπηλασία, ψάρεμα και καταδύσεων σε περιοχές που έχουν ρυπανθεί από πετρέλαιο είναι συνήθως μικρής διάρκειας. Με τον καθαρισμό των ακτών οι δραστηριότητες μπορούν να επανέλθουν φυσιολογικά. Παρόλα αυτά, μπορούν να επέλθουν μακροχρόνιες επιπτώσεις στην περίπτωση όπου η δημόσια αντίληψη στρέφεται στον στιγματισμό της περιοχής. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μειωθεί η επισκεψιμότητα της τοποθεσίας πράγμα που στην συνέχεια επηρεάζει τις ξενοδοχειακές μονάδες, τα πρακτορεία, τα εστιατόρια και τους υπαλλήλους αυτών που ζημιώνονται σε μεγάλο βαθμό.

Επιπλέον περιοχές που στηρίζονται στην αλιεία και τις ιχθυοκαλλιέργειες πιθανόν να πληγούν σημαντικά από την εμφάνιση της μιας πετρελαιοκηλίδας πιθανότητα λόγω μόλυνσης του πληθυσμού ψαριών της περιοχής.



2.3 Τρόποι αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων σε παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα

Οι στρατηγικές που μπορούν να εφαρμοστούν για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος του πετρελαίου ή των προϊόντων αυτού αλλά και τα χαρακτηριστικά της περιοχής, όπως για παράδειγμα το κλίμα. Έχουν αναπτυχθεί και εξεταστεί διάφορες προσεγγίσεις και τεχνολογίες για την αντιμετώπιση τέτοιου είδους περιστατικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Εικόνα 2.9) που περιγράφονται εκτενώς σε επιστημονικά κείμενα όπως: *Understanding Oil Spills and Oil Spill Response* [7], *Shoreline Counter measure Manual* [8] και *Oil Spill Response in the Marine Environment* [9]. Στον πίνακα (Πίνακας 2.3) που ακολουθεί συνοψίζονται οι πιο κοινές τεχνολογίες αντιμετώπισης ανάλογα με την κατηγορία τους.



Εικόνα 2.9: Τεχνικές αντιμετώπισης – καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων



Πίνακας 2.3: Μέθοδοι καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων

Μέθοδοι Αντιμετώπισης	Τεχνολογία
1) Φυσικές Μέθοδοι	Φυσική Βιοεξυγίανση
2) Μη Χημικές Μέθοδοι	Booming
	Skimming
	Manual Removal (wiping)
	Mechanical removal
	Washing
	Sediment relocation/Surf-Washing
	Tiling
	In-Situ Burning
3) Χημικές Μέθοδοι	Dispersants
	Demulsifiers
	Solidifiers
	Surface film chemicals

2.3.1 Φυσικές Μέθοδοι

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



2.3.2 Μη Χημικές Μέθοδοι

Οι μη χημικές μέθοδοι συγκράτησης και αποκατάστασης του μαζικού ή ελεύθερου πετρελαίου αποτελούν την πρωταρχική επιλογή αντιμετώπισης στις Ηνωμένες Πολιτείες για τον καθαρισμό του θαλάσσιου περιβάλλοντος από πετρελαιοκηλίδες.

Οι συνήθεις χρησιμοποιούμενες μη χημικές μέθοδοι είναι οι ακόλουθες:

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



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

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

2.3.3 Χημικές Μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι, ιδιαίτερα αυτές που χρησιμοποιούν χημικές ενώσεις διασποράς (dispersants), έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως σε πολλές χώρες ως τεχνολογία αντιμετώπισης. Εντούτοις, οι χημικές μέθοδοι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω της διαφωνίας σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και της ανησυχίας περί τοξικότητας και μακροπρόθεσμων περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους [7].

Σημαντικοί υπάρχοντες χημικοί παράγοντες είναι οι ακόλουθοι:

- **Χημικές ενώσεις διασποράς:** παράγοντες διασποράς (dispersing agents), που περιέχουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες, χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια για να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη προτού το πετρέλαιο φθάσει και μολύνει την ακτή. Αυτή η πρακτική χρησιμοποιείται για να μειωθούν οι τοξικές επιδράσεις του πετρελαίου με τη διάλυση του σε μικρότερες συγκεντρώσεις και να επιταχυνθεί ο ρυθμός βιοδιάσπασης του με την αύξηση της αποτελεσματικής περιοχής επιφάνειάς του.
- **Demulsifiers:** Χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν το πετρέλαιο σε νερό (oil-in-water) δημιουργώντας γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά.
- **Solidifiers:** Οι χημικές ουσίες που ενισχύουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν το πετρέλαιο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση και για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης.



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

2.3.4 Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως τεχνολογία καθαρισμού

Παρόλο που οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η φυσική απομάκρυνση (physical removal) της πετρελαιοκηλίδας αποτελούν την πρώτη επιλογή για την αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών, σπανίως επιτυγχάνουν ολοκληρωμένο καθαρισμό της περιοχής. Σύμφωνα με το Office of Technology Assessment [10], οι τρέχουσες μηχανικές μέθοδοι συνήθως απομακρύνουν περίπου 10 με 15% του πετρελαίου μετά από την δημιουργία μία μεγάλης έκτασης πετρελαιοκηλίδας, αν και βέβαια έχουν σημειωθεί και μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης, αναλόγως με το περιβάλλον και τις κλιματικές συνθήκες.

Η βιοεξυγίανση αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, που χρησιμοποιείται κυρίως σαν δευτεροβάθμια επιλογή επεξεργασίας (secondary treatment option) του εναπομείναντος πετρελαίου. Ως βιοεξυγίανση ορίζεται “η διαδικασία προσθήκης υλικών σε ρυπασμένο περιβάλλον, με σκοπό την επιτάχυνση της φυσικής διαδικασίας της βιοδιάσπασης” [11]. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό των συστατικών του πετρελαίου μπορεί να διασπαστεί εύκολα στη φύση από τους μικροοργανισμούς [12], [13], [14]. Για τον λόγο αυτό η επιτυχία της εξαρτάται αποκλειστικά από την καθιέρωση και την διατήρηση συνθηκών που θα ευνοήσουν την λειτουργία των μικροοργανισμών και συνεπώς αύξηση της απόδοσης της ως τεχνολογία απορρύπανσης.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι είτε γηγενείς της ρυπασμένης περιοχής είτε να προέρχονται από την επιλεκτική προσθήκη καλλιεργειών που έχουν γίνει σε εργαστήρια.

Για τον λόγο αυτό η τεχνολογία της βιοεξυγίανσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις ακόλουθες:

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



Σε διάφορες επιστημονικές μελέτες, όπου γίνεται σύγκριση της βιοενίσχυσης με την βιοδιέγερση, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε κλίμακα εργαστηρίου όσο και στο πεδίο, υποδεικνύουν ότι η προσθήκη θρεπτικών ουσιών και μόνο, είχε μεγαλύτερο αποτέλεσμα στην αποδόμηση του πετρελαίου [15], [16], [17]. Αυτό συμβαίνει διότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να διασπάσουν το πετρέλαιο είναι σπάνια ο περιοριστικός παράγοντας, στην περίπτωση που υπάρχει επαρκές οξυγόνο, συγκρινόμενος με τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος τους.

2.3.5 Η τεχνική Landfarming

Η τεχνική Landfarming που τυπικά έχει χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση της λάσπης από τα διυλιστήρια πετρελαίου, μπορεί κάλλιστα να χρησιμεύσει στην αποκατάσταση ρυπασμένου από αργό πετρέλαιο θαλάσσιου εδάφους και ιζημάτων [18].

Το Landfarming, ή αλλιώς “εδαφική καλλιέργεια”, αποτελεί μια υπέργεια τεχνική αποκατάστασης εδαφών που μειώνει την συγκέντρωση των συστατικών του πετρελαίου μέσω διεργασιών όπως της εξάτμισης και της βιοδιάσπασης. Η τεχνική αυτή συνήθως περιλαμβάνει την εναπόθεση του ρυπασμένου εδάφους, που έχει απομακρυνθεί από την αρχική περιοχή της ρύπανσης, σε ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του εδάφους όπου θα γίνει η επεξεργασία. Στην συνέχεια μέσω αερισμού, την προσθήκη ή μη θρεπτικών συστατικών και νερού ενεργοποιείται η μικροβιακή δραστηριότητα [19]. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται επιτυχώς εδώ και 100 χρόνια στην αποκατάσταση εδαφών ρυπασμένα από υδρογονάνθρακες. Τα πιο ελαφριά συστατικά των υδρογονανθράκων του πετρελαίου απομακρύνονται μέσω της εξάτμισης και σε μικρότερο ποσοστό λόγω της βιολογικής διάσπασης. Από την άλλη μεριά, τα πιο βαριά συστατικά, που δεν εξατμίζονται, υπόκεινται σε βιολογική διάσπαση σε μικρότερα κλάσματα από την δράση των μικροοργανισμών, μια διαδικασία χρονοβόρα [20].

Παρόλα αυτά αποτελεί μια πιο ελκυστική τεχνική αποκατάστασης εδαφών λόγω του χαμηλού κόστους, της μικρής κατανάλωσης ενέργειας, του μικρού ρίσκου εξάπλωσης του ρύπου που μπορεί να προκαλέσει επιπλέον ρύπανση και τέλος των μικρών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που μπορεί να προξενήσει η εφαρμογή της [21]. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής παρουσιάζονται συνοπτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.4) [19], [21]. Επιπλέον αποτελεί μια τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί και Ex-Situ εάν το ρυπασμένο τμήμα του εδάφους έχει βάθος μεγαλύτερο από τα 1.7 μέτρα [19].



Πίνακας 2.4: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής Landfarming

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Εύκολος σχεδιασμός και εφαρμογή	Δύσκολη η απομάκρυνση ποσοστού μεγαλύτερου του 95% και πτώση των συγκεντρώσεων κάτω από 0,1 ppm
Σχετικά μικρός χρόνος κατεργασίας (6-24 μήνες υπό βέλτιστες συνθήκες)	Μπορεί να μην είναι αποτελεσματική για υψηλές συγκεντρώσεις συστατικών (>50.000 ppmTPH)
Μικρό κόστος κεφαλαίου και εξόδων διατήρησης λειτουργίας	Εφαρμόσιμη μόνο σε βιοδιασπόμενους ρύπους
Ικανότητα επεξεργασίας μεγάλου όγκου εδάφους	Απαιτείται μεγάλη έκταση
Μπορεί να εφαρμοστεί και ex-situ	Τα πτητικά συστατικά τείνουν να εξατμίζονται παρά να βιοδιασπώνται
Αποτελεσματική απέναντι σε οργανικά Συστατικά με αργού ρυθμούς αποδόμησης	Υπάρχει ρίσκο έκθεσης στον ρυπαντή
Μικρό περιβαλλοντικό αντίκτυπο	Απορροφητικά υλικά όπως ο πυλός μπορούν να μειώσουν την βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου και συνεπώς να μειώσουν την απόδοση της διεργασίας
Ενεργειακά αποδοτική	Το κόστος μπορεί να αυξηθεί δραστικά εάν περιλαμβάνονται διαδικασίες εκσκαφής

Είναι προφανές ότι για να γίνει δυνατή η εφαρμογή της τεχνικής Landfarming και η αποδόμηση του οργανικού ρύπου από τους μικροοργανισμούς πρέπει να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Αφού αποτελεί μια τεχνική που βασίζεται αποκλειστικά στην δράση αποδομητικών οργανισμών, αρχικά πρέπει να εξασφαλιστεί ένας επαρκής αριθμός μικροοργανισμών που παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για την διάσπαση του εκάστοτε ρύπου. Επιπλέον, η παρουσία θρεπτικών συστατικών σε αφθονία όπως το άζωτο, ο φώσφορος, το κάλιο και το θείο, είναι απαραίτητη προκειμένου να ενισχυθεί η ανάπτυξη και δράση των μικροοργανισμών. Τέλος, η ύπαρξη κατάλληλων συνθηκών είναι αναγκαία και πιο συγκεκριμένα η υγρασία, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, το pH του εδάφους ώστε αυτοί οι παράγοντες να μην είναι περιοριστικοί για την ανάπτυξη και τη δράση τους. Οι συντελεστές αυτοί και πως μπορούν να επηρεάσουν την ορθή λειτουργία της τεχνικής αναλύονται στο κεφάλαιο που ακολουθεί.



3 ΣΤΑΔΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ “ΕΔΑΦΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ” ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΟΥ ΡΥΠΟΥ

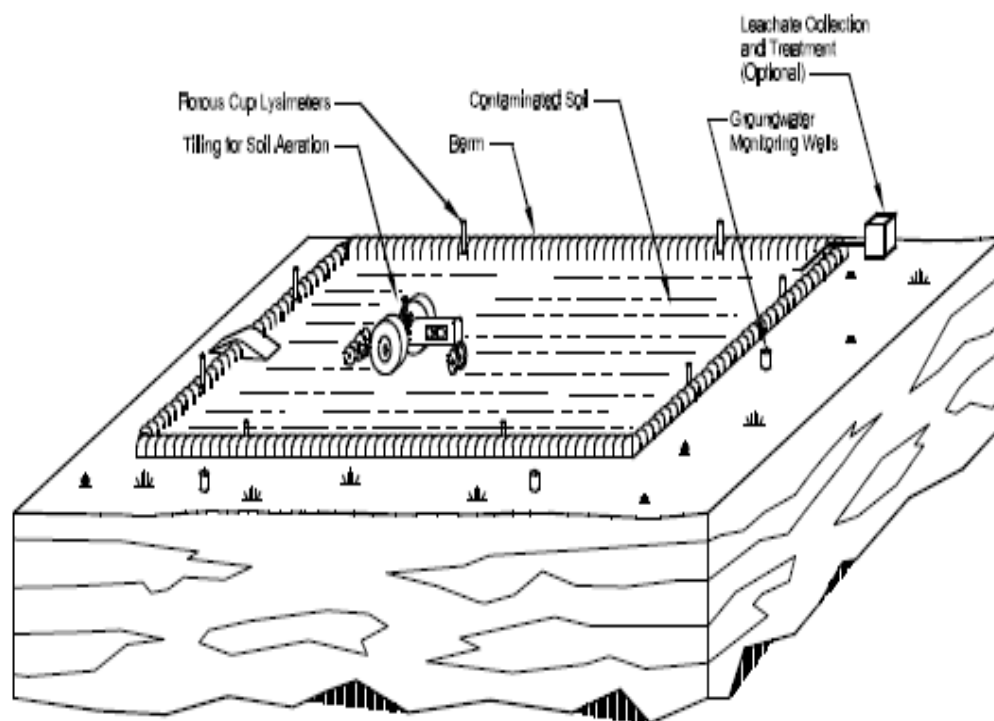
Για την εφαρμογή της εδαφικής επεξεργασίας ρυπασμένων εδαφών, έχουν αναπτυχθεί τα ακόλουθα βασικά στάδια:

- προετοιμασία πεδίου (καθάρισμα, διαχωρισμός χονδρόκοκκων σωματιδίων)
- προετοιμασία του προς επεξεργασία εδάφους (κοσκίνισμα, έλεγχος pH κ.α.)
- διάθεση του προς επεξεργασία εδάφους, ανάμιξη και προσθήκη αναγκαίων ουσιών (π.χ. νερού και θρεπτικών συστατικών)

Επιπρόσθετα λόγω της ύπαρξης κινδύνου μεταφοράς των εδαφικών ρύπων είτε στην ατμόσφαιρα λόγω εξάτμισης, είτε στα υπόγεια ύδατα λόγω διήθησης, είναι αναγκαία η εφαρμογή επιπρόσθετων μέτρων προστασίας για την εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής τα οποία περιλαμβάνουν:

- προσθήκη αδιαπέρατου διαχωριστικού στρώματος μεταξύ του υπόγειου υδροφορέα και της ζώνης επεξεργασίας
- κατασκευή συστήματος συλλογής στραγγισμάτων
- εγκατάσταση συστήματος ελέγχου των επιφανειακών απορροών
- προσθήκη επιφανειακού καλύμματος για την προστασία του εδάφους από τις καιρικές συνθήκες
- εγκατάσταση συστήματος επεξεργασίας των συλλεγόμενων πτητικών ρύπων [22]

Στην Εικόνα 3.1 που ακολουθεί εμφανίζεται μια τυπική εγκατάσταση επεξεργασίας εδάφους με landfarming.



Εικόνα 3.1: Εγκατάσταση επεξεργασίας εδάφους με την τεχνική Landfarming (EPA)



3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της τεχνικής Landfarming

Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, οι οποίες ανήκουν σε τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες:

1. τα χαρακτηριστικά του εδάφους,
2. τα χαρακτηριστικά του ρύπου και τέλος
3. τις κλιματικές συνθήκες.

Οι παράμετροι αυτές εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Εικόνα 3.1).

Πίνακας 3.1: Παράμετροι που επηρεάζουν την τεχνική του Landfarming

Χαρακτηριστικά εδάφους	Χαρακτηριστικά ρύπου	Κλιματικές συνθήκες
Πυκνότητα μικροβιακού πληθυσμού	Πτητικότητα	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
pH	Χημική σύσταση	Βροχόπτωση
Θερμοκρασία	Συγκέντρωση και τοξικότητα	Ένταση ανέμων
Συγκέντρωση θρεπτικών		
Υγρασία		
Πορώδες		



3.1.1 Χαρακτηριστικά εδάφους

➤ Πυκνότητα μικροβιακού πληθυσμού

Το χώμα φυσιολογικά περιέχει μεγάλο πλήθος ποικίλων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, άλγη, μύκητες, πρωτόζωα και ακτινομύκητες. Σε επαρκώς στραγγισμένα εδάφη, τα οποία είναι και τα καταλληλότερα για την εφαρμογή της τεχνικής Landfarming, αυτοί οι μικροοργανισμοί λειτουργούν υπό αερόβιες συνθήκες. Από αυτούς τους μικροοργανισμούς τα βακτήρια αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό και είναι βιοχημικά πιο ενεργά σε συνθήκες με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Τα βακτήρια χρειάζονται πηγές άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου για την ανάπτυξη των κυττάρων και μία πηγή ενέργειας για την διατήρηση των μεταβολικών λειτουργιών.

Η μεταβολική διαδικασία που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια για την παραγωγή ενέργειας απαιτεί έναν τερματικό αποδέκτη ηλεκτρονίων (Terminal electron acceptor-TEA) για την ενζυμική οξειδωση της πηγής άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα. Ανάλογα με το αν χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα ονομάζονται ετερότροφα ενώ αν χρησιμοποιούν ανόργανα συστατικά όπως το διοξείδιο του άνθρακα χαρακτηρίζονται ως αυτότροφα. Επιπλέον, αν τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο χαρακτηρίζονται αερόβιοι ενώ αν είναι άλλη ένωση, όπως τα νιτρικά, αποτελούν αναερόβιους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση που αξιοποιούνται το οξυγόνο αλλά και άλλες ενώσεις σαν TEA ονομάζονται επαμφοτερίζοντες. Για την εφαρμογή της τεχνικής του LandFarming σε πετρελαϊκούς ρύπους τα αερόβια και ετεροτροφικά βακτήρια είναι αυτά που συντελούν στην διαδικασία της αποδόμησης.

Για να γίνει δυνατή η αξιολόγηση της παρουσίας τέτοιων μικροοργανισμών πρέπει να διεξαχθούν εργαστηριακές αναλύσεις (καλλιέργειες) από δείγματα εδάφους όπου να διαπιστώνεται ο αριθμός των CFUs (Colony Forming Units) ανά γραμμάριο εδάφους. Ο αριθμός των CFUs των ετεροτροφικών μικροοργανισμών ανά γραμμάριο εδάφους πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 10^3 , προκειμένου να υπάρχει επιτυχής αποδόμηση. Μικρότεροι αριθμοί μπορεί να υποδηλώνουν την παρουσία τοξικών συγκεντρώσεων οργανικών ή ανόργανων ενώσεων. Αυτό βεβαίως δεν σημαίνει την αποτυχία της τεχνικής καθώς ο πληθυσμός μπορεί να ανακάμψει αν το έδαφος τροποποιηθεί ώστε να μειωθούν οι τοξικές συγκεντρώσεις.

➤ pH

Για την υποστήριξη της μικροβιακής ανάπτυξης, το pH του εδάφους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8, με το ουδέτερο, δηλαδή 7, να αποτελεί την βέλτιστη τιμή. Εδάφη με τιμές pH που ξεπερνούν τα όρια αυτά πριν την εφαρμογή της τεχνικής, απαιτούν την χρήση ρυθμιστικών ουσιών, όπως άσβεστο για την αύξηση ή θειάφι για την μείωση.



➤ Υγρασία

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους χρειάζονται υγρασία για την σωστή ανάπτυξη τους. Η υπερβολική βέβαια περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό, μπορεί να εμποδίσει την μεταφορά του οξυγόνου πράγμα που μειώνει την διαθεσιμότητα του σε αερόβιους μικροοργανισμούς όπου είναι απαραίτητο για την μεταβολική τους λειτουργία. Κατά κύριο λόγο, το έδαφος πρέπει να περιέχει υγρασία αλλά όχι σε σημείο που να στάζει. Το ιδανικό εύρος υγρασίας κατά βάρος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 12 και 30 τοις εκατό.

➤ Θερμοκρασία

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία. Η μικροβιακή δραστηριότητα των βακτηρίων, που αποτελούν τους σημαντικότερους αποδομητές της τεχνικής Landfarming, έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνεται δραματικά σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C, ενώ μπορεί να πάψει κάτω από του 5° C. Επιπρόσθετα μπορεί να μειωθεί και για μεγαλύτερες θερμοκρασίες από τους 45° C. Μεταξύ του εύρους 10 °C – 45 °C η μικροβιακή δραστηριότητα διπλασιάζεται ανά 10° C. Επειδή όμως η θερμοκρασία του εδάφους εξαρτάται από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η οποία αλλάζει ανάλογα την περίοδο του χρόνου, έχει οριστεί ως "περίοδος LandFarming" η εποχή του χρόνου όπου οι θερμοκρασίες αρμόζουν με αυτές όπου οι μικροοργανισμοί έχουν την μεγαλύτερη δυνατότητα ανάπτυξης.

➤ Συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών

Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται ανόργανα συστατικά όπως άζωτο και φώσφορο για την ανάπτυξη των κυττάρων και την διατήρηση της λειτουργίας των διαδικασιών βιοδιάσπασης. Τα θρεπτικά συστατικά μπορεί να είναι διαθέσιμα σε επαρκείς ποσότητες στο έδαφος, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις πρέπει να γίνει προσθήκη τους για να ευνοηθεί η δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Ωστόσο, υπερβολικές ποσότητες ορισμένων θρεπτικών μπορούν να καταστείλουν την μεταβολική διαδικασία. Η τυπική αναλογία άνθρακα: αζώτου: φωσφόρου για την βιοαποδόμηση πρέπει να βρίσκεται από 100: 10: 1 έως 100: 10: 0,5.

➤ Πορώδες

Το πορώδες του εδάφους επηρεάζει την διαπερατότητα, το περιεχόμενο υγρασίας, και την φαινομενική πυκνότητα του. Έτσι προκειμένου να διατηρηθούν επιπλέον παράγοντες όπως το διαθέσιμο οξυγόνο, η κατανομή θρεπτικών συστατικών και το περιεχόμενο νερού, το πορώδες του εδάφους πρέπει να ληφθεί υπόψη. Για παράδειγμα εδάφη που τείνουν να καταρρέουν, όπως άργυλος, είναι δύσκολο να αεριστούν επαρκώς μειώνοντας έτσι το διαθέσιμο προς του μικροοργανισμούς οξυγόνο. Επίσης η κατανομή των θρεπτικών συστατικών είναι ανομοιόμορφη ενώ η κατακράτηση νερού μπορεί να διαρκέσει περισσότερο μετά από μια βροχόπτωση.



3.1.2 Χαρακτηριστικά ρύπου

➤ Πτητικότητα

Η πτητικότητα του ρύπου, ο οποίος πρόκειται να αποδομηθεί μέσω του Landfarming είναι σημαντική καθώς οι πτητικοί ρύποι τείνουν να εξατμίζονται από την έκταση όπου εφαρμόζεται η τεχνική, κυρίως κατά την ανάδευση του χώματος, παρά να υπόκεινται σε βιοαποδόμηση από τους μικροοργανισμούς. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται ο κίνδυνος εξάπλωσης του ρύπου ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η απόδοση της τεχνικής.

➤ Χημική σύσταση

Η χημική δομή των ρύπων που βρίσκονται μέσα στο έδαφος όπου πρόκειται να εφαρμοστεί η Landfarming είναι σημαντική για τον καθορισμό του ρυθμού αποδόμησης. Παρόλο που όλα σχεδόν τα συστατικά του πετρελαίου είναι βιοαποδομήσιμα, όσο πιο πολύπλοκη είναι η χημική σύσταση τόσο πιο δύσκολη και αργή η βιολογική επεξεργασία.

➤ Συγκέντρωση και τοξικότητα

Η παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων του ρύπου μπορεί να είναι τοξική ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ικανών να τον αποδομήσει. Από την άλλη μεριά χαμηλή συγκέντρωση του είναι ικανή να μειώσει την δραστηριότητα των μικροοργανισμών αφού ο ρύπος αποτελεί κατά κύριο λόγο την πηγή άνθρακα.

➤ Κλιματικές συνθήκες

Οι τυπικές εγκαταστάσεις όπου γίνεται εφαρμογή της τεχνικής Landfarming είναι ακάλυπτες και για αυτό το λόγο εκτεθειμένες σε κλιματικούς παράγοντες όπως η βροχόπτωση, το χιόνι, ο άνεμος καθώς και την θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

➤ Θερμοκρασία περιβάλλοντος

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι σημαντική καθώς επηρεάζει άμεσα την θερμοκρασία του εδάφους. Όπως περιγράφηκε και προηγουμένως η θερμοκρασία του εδάφους επιδρά στην δραστηριότητα των μικροοργανισμών και επομένως στην βιοαποδόμηση. Η κατάλληλη θερμοκρασία εδάφους για την εφαρμογή της τεχνικής είναι μεταξύ 10°C και 45 °C.



➤ **Βροχόπτωση**

Το νερό της βροχής που πέφτει απευθείας ή καταλήγει στην τοποθεσία της εγκατάστασης όπου εφαρμόζεται Landfarming θα αυξήσει το περιεχόμενο υγρασίας του εδάφους και θα προκαλέσει διάβρωση. Όπως αναφέρθηκε η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται από την υγρασία του εδάφους. Στην περίπτωση έντονης βροχόπτωσης η υγρασία του εδάφους μπορεί να αυξηθεί πέρα του επιτρεπτού ορίου προσωρινά. Στο ακριβώς αντίθετο σενάριο, δηλαδή σε περίοδο ξηρασίας, η υγρασία του εδάφους μειώνεται και έτσι επιβάλλεται η διάβρεξη του εδάφους.

➤ **Ένταση ανέμων**

Η διάβρωση του εδάφους μπορεί να προκληθεί από έντονους ανέμους ή κατά την διάρκεια εργασιών ανάδευσης του χώματος στην τοποθεσία επεξεργασίας.



4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΡΓΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΥΠΟΙ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

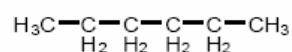
Το αργό πετρέλαιο και τα πετρελαιοειδή αποτελούν πολύ σύνθετα και μεταβλητά μίγματα μεμονωμένων ενώσεων με διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες. Η κατανόηση αυτών των ιδιοτήτων είναι σημαντική για τον καθορισμό της συμπεριφοράς μια πετρελαιοκηλίδας καθώς και την απαραίτητη τεχνική που θα αναπτυχθεί για τον περιορισμό και αντιμετώπιση της. Η απόδοση της τεχνικής βιοεξυγίανσης με χρήση εδαφικής καλλιέργειας, όπως αναπτύχθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων που αφορούν το ίδιο το πετρέλαιο, όπως για παράδειγμα τη σύσταση του, το ιξώδες, καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η ένταση των ανέμων κλπ.

4.1 Χημική σύσταση του αργού πετρελαίου και των προϊόντων του

Το αργό πετρέλαιο είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μίγμα δεκάδων χιλιάδων μεμονωμένων υδρογονάνθρακων (αλειφατικών και αρωματικών) καθώς και ενώσεων μην υδρογονανθρακικών που περιέχουν θείο, άζωτο, οξυγόνο, και διάφορα ίχνη μετάλλων. Το περιεχόμενο σε υδρογονάνθρακες μπορεί να είναι τόσο υψηλό ως 97% κατά βάρος σε ένα συμβατικό ελαφρύ παραφινικό αργό πετρέλαιο, ή περίπου στο 50% κατά βάρος σε ένα βαρύ αργό πετρέλαιο και λιγότερο από 30% κατά βάρος σε πίσσα ασφάλτου άμμου. Αυτές οι ενώσεις κυμαίνονται από μικρές, απλές, πτητικές, και διακριτές ενώσεις (π.χ. μεθάνιο και προπάνιο) σε εξαιρετικά μεγάλες, πολύπλοκες, μη πτητικές, κολλοειδείς μακρομοριακές (π.χ. ασφαλένια). Μερικές αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο αργό πετρέλαιο απεικονίζονται στην Εικόνα 4.1. Η κατανομή αυτών των ενώσεων προσδίδει ορισμένες φυσικές ιδιότητες στο πετρέλαιο, και είναι αυτές οι ιδιότητες (π.χ., η πυκνότητα ή το ιξώδες) με βάση των οποίων το πετρέλαιο ταξινομείται, αγοράζεται και πωλείται.



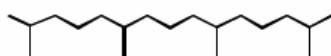
SATURATES



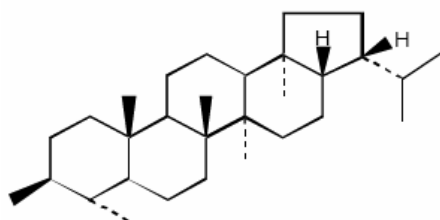
n-hexane



n-heptadecane ($\text{n-C}_{17}\text{H}_{36}$)



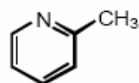
pristane ($\text{C}_{19}\text{H}_{40}$)



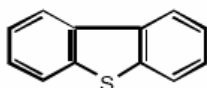
17α(H),21β(H)-hopane

RESINS

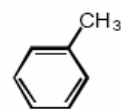
2-methylpyridine



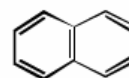
dibenzo-
thiophene



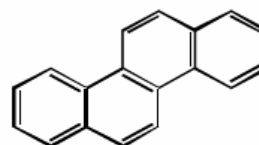
AROMATICS



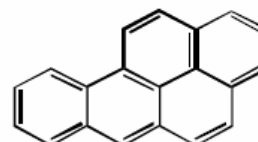
toluene



naphthalene

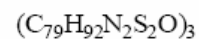


chrysene



benzo[a]pyrene

ASPHALTENES



Εικόνα 4.1: Αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που συναντώνται στο αργό πετρέλαιο

Τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες βασιζόμενοι στη διαφορετική διαλυτότητα τους στους οργανικούς διαλύτες [23].



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

4.2 Φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου

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

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

$$\text{API Gravity} = \frac{141.5}{\text{Specific Gravity (16 } ^\circ\text{C or 60 } ^\circ\text{F)}} - 131.5 \quad (4-1)$$

Τα πετρέλαια με μικρές πυκνότητες ή χαμηλές ειδικές πυκνότητες έχουν υψηλές API πυκνότητες. Το αργό πετρέλαιο έχει ειδική πυκνότητα με εύρος από 0,79 έως 1,00 (ισοδύναμες



API πυκνότητες από 10 έως 48) [24]. Η πυκνότητα πετρελαίου είναι ένας σημαντικός δείκτης της σύνθεσης πετρελαίου που χρησιμοποιείται συχνά για να προβλέψει τη τύχη του στο νερό.

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

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

4.3 Τύποι πετρελαίου

Η συμπεριφορά του πετρελαίου όταν βρεθεί στο νερό εξαρτάται από το ποιες διεργασίες όπως η καθίζηση και η διάλυση καθώς και σε τι βαθμό θα γίνουν. Η επίδραση της καθεμιάς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του πετρελαίου.

Οι διάφοροι τύποι του πετρελαίου έχουν διακριθεί βάσει της πυκνότητά τους. Τύποι πετρελαίου με μικρή πυκνότητα μπορούν να απομακρυνθούν πιο εύκολα. Βέβαια υπάρχουν και ελαφριά κλάσματα πετρελαίου (light), που λόγω της παρουσίας κεριών (waxes) στη σύστασή τους συμπεριφέρονται όμοια με βαρέα κλάσματα πετρελαίου (heavy).

Ο τρόπος με τον οποίο μία κηλίδα διαλύεται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό αντίστασής τους στη διάλυση. Ελαφρά κλάσματα πετρελαίου (light products), όπως η κηροζίνη (kerosene), εξατμίζονται και διαλύονται με φυσικό τρόπο γρήγορα, ώστε σπάνια να απαιτείται επέμβαση για τον καθαρισμό τους. Τέτοιοι τύποι ονομάζονται “non persistent oils”. Σε αντίθεση τύποι πετρελαίου με μεγάλο βαθμό αντίστασης στη διάλυση (persistent oils), όπως είναι αρκετοί



τύποι αργού πετρελαίου, διαλύονται με μικρότερο ρυθμό και συνήθως απαιτείται, είτε μηχανική, είτε ανθρώπινη επέμβαση για την απομάκρυνσή τους.

Οι κύριες φυσικές ιδιότητες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την αντίσταση σε διάλυση (persistence) του πετρελαίου στη θάλασσα είναι το ειδικό βάρος (specific gravity), η απόσταξη (distillation characteristics), το ιξώδες (viscosity) και το σημείο ροής (pour point) [24].

Με βάση συνεπώς τα χαρακτηριστικά αυτά το πετρέλαιο μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερις βασικές κατηγορίες:

- Ελαφρά πτητικά πετρέλαια (Light Volatile Oils): κυρίως τα ελαφρά κλάσματα πετρελαίου, όπως η κηροζίνη (kerosine) και η παραφίνη (paraffin).
- Μέτρια έως βαριά κλάσματα πετρελαίου (Moderate (Intermediate) to Heavy Oils): οι περισσότεροι τύποι αργού πετρελαίου και λοιποί τύποι πετρελαίου, όπως το πετρέλαιο ναυτιλίας (marine diesel) και τα ελαφρά λιπαντικά (light lubricating oils).
- Βαρέα κλάσματα πετρελαίου (Heavy Oils): τύποι πετρελαίου με υψηλό ποσοστό κεριών στη σύστασή τους και βαρέα λιπαντικά (heavy lubricating oils).
- Υπολειμματικά πετρέλαια (Residual Oils): υπολείμματα δεξαμενών καυσίμων πλοίων (bunker oils), αποχρωματισμένοι τύποι αργού πετρελαίου (weathered crude).

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 4.1) παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των παραπάνω τύπων πετρελαίου [25].

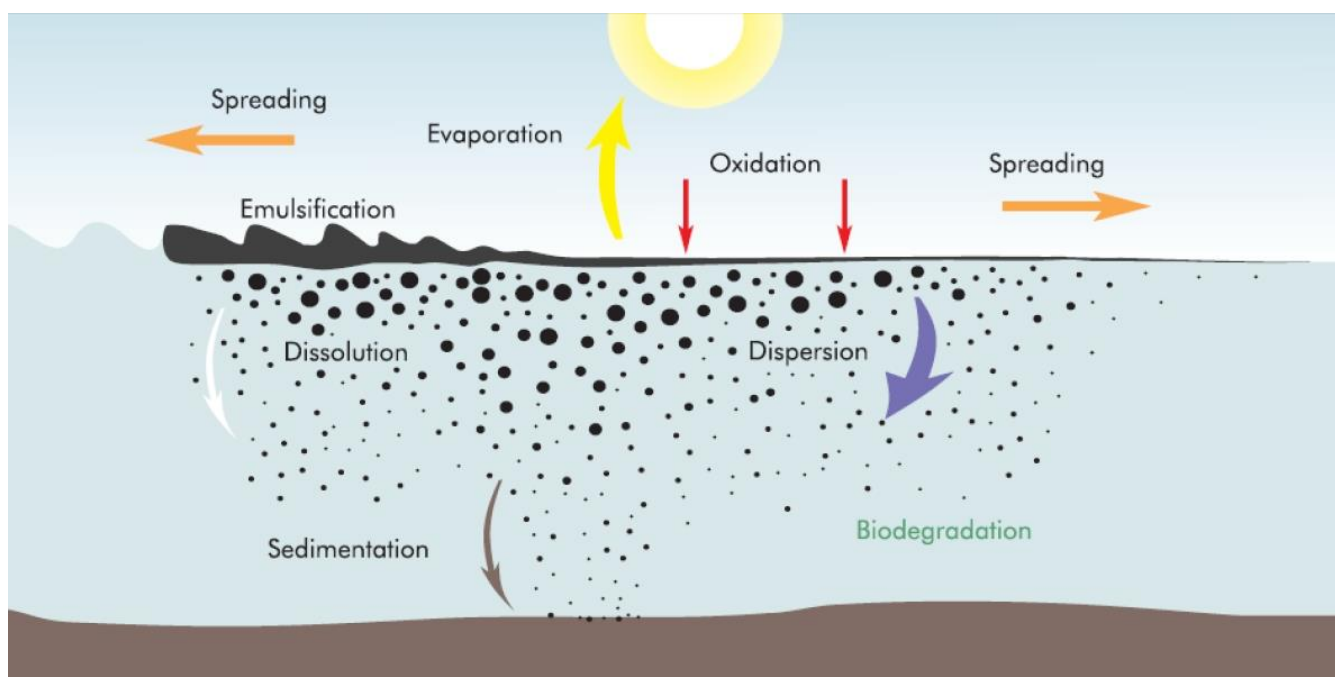
Πίνακας 4.1: Βασικά χαρακτηριστικά των τύπων πετρελαίου

Τύπος πετρελαίου	Εξάτμιση	Φυσική Διασπορά	Διαλυτότητα στο νερό	Αντίδραση με Χ.Δ.Ο.	Κολλώδεις	Βιολογικές επιπτώσεις
Light Volatile Oils	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Πολύ καλή	Καθόλου	Ιδιαίτερα τοξικό
Moderate to heavy Oils	Έως 50%	Ορισμένα συστατικά	Μέτρια	Καλή στα αρχικά στάδια	Λίγο	Ποικίλλει η τοξικότητα
Heavy Oils	Λιγότερο από 20%	Μικρή	Μικρή	Δύσκολη	Πολύ	Λιγότερο τοξικά
Residual Oils	Μικρή	Καθόλου	Πολύ μικρή	Καθόλου	Πάρα πολύ	Λίγο τοξικά



4.4 Τύχη του πετρελαίου στο περιβάλλον

Όταν το πετρέλαιο εισάγεται στο περιβάλλον, περνά αμέσως από διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές αλλαγές (Εικόνα 4.2). Αυτές οι διεργασίες γήρανσης αλλάζουν τη σύνθεση και τις ιδιότητες του πετρελαίου με τέτοιο τρόπο που μπορεί να επηρεάσει τις στρατηγικές αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων. Στην διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιείται ο όρος **“weathering”** ή αλλιώς **“γήρανση”** του πετρελαίου. Οι διεργασίες γήρανσης περιλαμβάνουν την εξάπλωση, την εξάτμιση, τη φυσική διασπορά, η γαλακτωματοποίηση, τη διάλυση, την φωτοχημική οξείδωση, την καθίζηση και τη βιοαποδόμηση. Αν και κάθε διεργασία συμβαίνει ταυτόχρονα με τις υπόλοιπες και στο σύνολό τους επηρεάζουν τη συμπεριφορά του πετρελαίου στο νερό, η σημασία της καθεμιάς στη διάρκεια ζωής της κηλίδας διαφέρει. Οι διεργασίες της εξάπλωσης, εξάτμισης, φυσικής διασποράς, γαλακτωματοποίησης και διάλυσης παίζουν πιο σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια ζωής της πετρελαιοκηλίδας, ενώ η φωτοχημική οξείδωση, η καθίζηση και η βιοαποδόμηση είναι μετέπειτα διεργασίες που καθορίζουν και την κατάληξη της πετρελαιοκηλίδας [26].



Εικόνα 4.2: Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου (Πηγή: ΙΤΟΡΡ)



Η διαδικασία γήρανσης του πετρελαίου περιλαμβάνει τις εξής διεργασίες:

Εξάπλωση (Spreading)

Εξάτμιση (Evaporation)

Διάλυση (Dissolution)

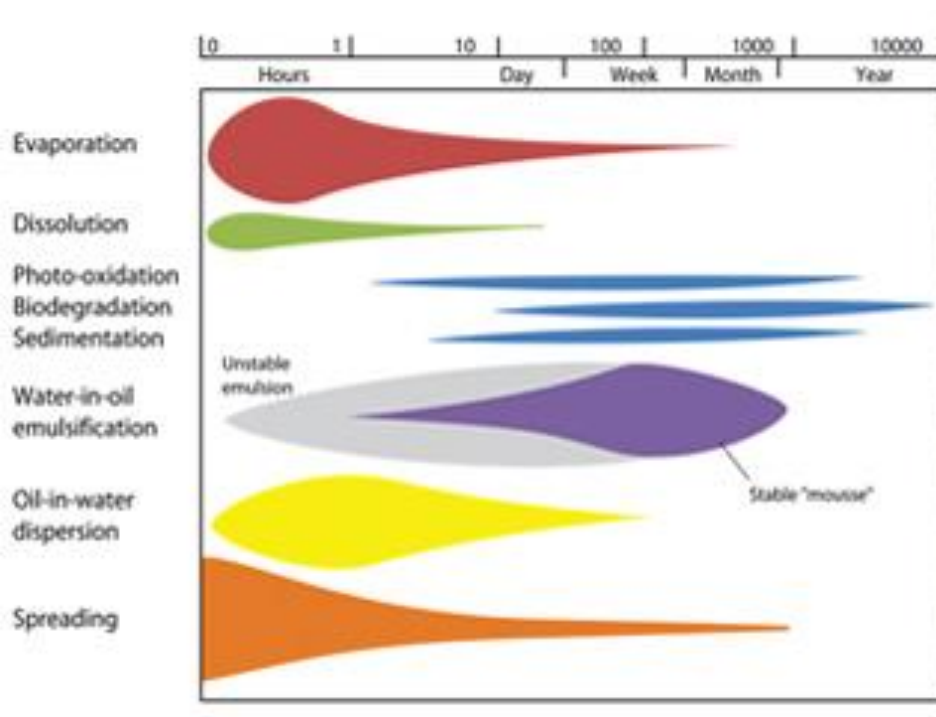
Φωτοοξείδωση (Photooxidation)

Διασπορά (Dispersion)

Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

Βιοδιάσπαση (Biodegradation)

Στην Εικόνα 4.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των παραπάνω διεργασιών στο πετρέλαιο όταν αυτό βρεθεί στο νερό.



Εικόνα 4.3: Διάρκεια και έκταση διεργασιών γήρανσης σε μία πετρελαιοκηλίδα (Πηγή: SINTEF)



5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η βιοαποδόμηση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν τον οργανικό ρύπο, μέσω μεταβολικών ή ενζυματικών διεργασιών, σε λιγότερο επικίνδυνα μη τοξικά συστατικά τα οποία στην συνέχεια ενσωματώνονται στους φυσικούς βιοχημικούς κύκλους τους. Η οργανική ύλη μπορεί να διασπαστεί με δύο τρόπους, αερόβια δηλαδή με την παρουσία οξυγόνου αλλά και αναερόβια.

Οι αναερόβιες διεργασίες διεξάγονται από αναερόβιους μικροοργανισμούς αλλά αυτή η διαδικασία βιοαποδόμησης είναι πολύ αργή. Οι μηχανισμοί αναερόβιας αποδόμησης λαμβάνουν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των αυξημένων πληροφοριών όσον αφορά τις συνθήκες περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται ο ρύπος αλλά και για την ταχεία εξάντληση του οξυγόνου που λαμβάνει χώρα [29]. Η αναερόβια βιοαποδόμηση ακολουθεί διάφορες βιοχημικές μεταβολικές οδούς που εξαρτώνται από τον δέκτη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται από τον μικροοργανισμό. Οι ρύποι που προέρχονται από το πετρέλαιο έχει αποδειχθεί ότι αποδομούνται υπό διαφορετικές αναερόβιες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου της μείωσης των νιτρικών, θεικών αλλά και δημιουργία μεθανογόνων συνθηκών. Οι μεταβολικές οδοί που αφορούν την αναερόβια αποδόμηση δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Για τον λόγο αυτό οι περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με την αναερόβια αποδόμηση υδρογονανθράκων γίνονται με τη χρήση καθαρών καλλιιεργειών ή ενισχυμένων σε ελεγχόμενα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας. Ως εκ τούτου η σημασία αυτών των αποτελεσμάτων για το περιβάλλον δεν είναι γνωστή και στοιχείο για την αναερόβια δράση των μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα έχει αναφερθεί σε λίγες περιπτώσεις [30].

Η ταχύτερη και πληρέστερη αποδόμηση της πλειονότητας των οργανικών ρύπων και συνεπώς του πετρελαίου λαμβάνει χώρα υπό αερόβιες συνθήκες. Οι υδρογονάνθρακες είναι ανθεκτικοί στην μικροβιακή αποδόμηση. Έτσι είναι αναγκαία η ενεργοποίηση τους ώστε να είναι δυνατή η δράση των μικροοργανισμών. Το οξυγόνο σε αυτή την περίπτωση αποτελεί το τερματικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και απαραίτητο μέσο για την ενεργοποίηση των υδρογονανθράκων μετατρέποντας τους σε οξυγονωμένα ενδιάμεσα προϊόντα που μπορούν στην συνέχεια να μεταβολιστούν ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια ανάλογα την δομή τους.

Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αποικοδομήσουν τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου και τις πετρελαίου και τις σχετικές χημικές ενώσεις, είναι ευρέως διαδεδομένοι τόσο στο θαλάσσιο όσο και στο παράκτιο και στο παράκτιο περιβάλλον. Επιστήμονες μικροβιολόγοι έχουν αναγνωρίσει 79 γένη αερόβιων μικροοργανισμών μικροοργανισμών που είναι αποτελεσματικοί αποικοδομητές υδρογονανθράκων στο φυσικό περιβάλλον [31]. Από περιβάλλον [31]. Από αυτά τα 79 γένη, υπάρχουν περισσότερα 500 μικροβιακά είδη βακτηρίων και μυκήτων που και μυκήτων που έχουν την δυνατότητα να αποικοδομούν υδρογονάνθρακες [31], [32]. Στον πίνακα (Πίνακας 5.1) που ακολουθεί παρουσιάζονται τα σημαντικότερα είδη μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο.

Το ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών των υδρογονανθράκων σε σχέση με τη συνολική μικροβιακή κοινότητα ποικίλει για κάθε οικοσύστημα [33]. Ένας παράγοντας που μπορεί να



μεταβάλλει το ποσοστό αυτό είναι η ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Συγκεκριμένα σε καθαρά οικοσυστήματα οι καταναλωτές των υδρογονανθράκων μπορεί να καταλαμβάνουν ποσοστό μικρότερο από το 1% της συνολική μικροβιακής κοινότητας, ενώ μετά την εμφάνιση πετρελαιοκηλίδας το ποσοστό αυτό φτάνει περίπου το 10%. Σε χρόνια επιβαρυνμένα περιβάλλοντα οι πληθυσμοί των αποδομητών του πετρελαίου μπορεί να καταλαμβάνουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά της μικροβιακής κοινότητας φτάνοντας μέχρι και το 100%.

Προκειμένου να γίνει δυνατή η διάσπαση του πετρελαίου σε απλούστερα συστατικά, είναι απαραίτητη η ποικιλότητα των μικροοργανισμών. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με την μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο αργό πετρέλαιο. Στη φύση, η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργατική δράση (consortia). Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον.

Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει προοδευτικές ή διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου. Έτσι παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση [34].

Πίνακας 5.1: Μικροβιακά είδη με την ικανότητα αποδόμησης υδρογονανθράκων [35]

Βακτήρια		Μύκητες	Ζυμομύκητες	Άλλη
Acinetobacter sp.	Lucila sp.	Alternaria sp.	Candida sp.	Chlamydomonas sp.
Alcaligenes sp.	Marinobacter sp.	Aspergillus sp.	Saccharomyces sp.	Chorella sp
Alcanivorax sp.	Metylophaga sp.	Chaetomium sp.		Dunaliella sp.
Alcanivorax sp.	Micrococcus sp.	Cladosporium sp.		
Aquaspirillum sp.	Microscilla sp.	Fusarium sp.		
Arthrobacter sp.	Mycobacterium sp.	Penicillium sp		
Azospirillum sp.	Neisseria sp.	Phanaerocheate sp.		
Bacillus sp.	Nocardia sp.	Pleurotus sp.		
Beggiatoa sp.	Novospingobium sp.	Rhizopus sp		
Cycloclasticus sp.	Oleiphilus sp.			
Cytophaga sp.	Planococcus sp.			
Corynebacterium sp.	Porpyrobactes			
Desulfotalea sp.	Pseudomonas sp.			
Desulfovibrio sp.	Rhodoplanes sp.			



Erythrobacter sp.	Rubrivivax sp.
Flavobacterium sp.	Sphingomonas sp.
Geobacillus sp.	Staphylococcus sp.
Geobacter sp.	Sulfitobacter sp.
Halochromatium sp.	Thioalcalovibrio sp.
Halomonas sp.	Xanthomonas sp.

Τα διάφορα συστατικά του πετρελαίου δεν παρουσιάζουν την ίδια δεκτικότητα στις επιθέσεις των μικροοργανισμών που τα αποδομούν. Με την αύξηση της πολυπλοκότητας της ένωσης, δηλαδή την ύπαρξη περισσότερων δεσμών και διακλαδώσεων, αυξάνεται και ταυτόχρονα η αντίσταση που προβάλλει. Γενικά η δυνατότητα αποδόμησης των διαφόρων υδρογονανθράκων ακολουθεί την εξής σειρά:

γραμμικά αλκάνια > διακλαδισμένα αλκάνια > χαμηλού M.B. αρωματικές ενώσεις > μονοαρωματικές ενώσεις > κυκλικά αλκάνια > πολυαρωματικές ενώσεις > ασφαλτένια [36], [37]

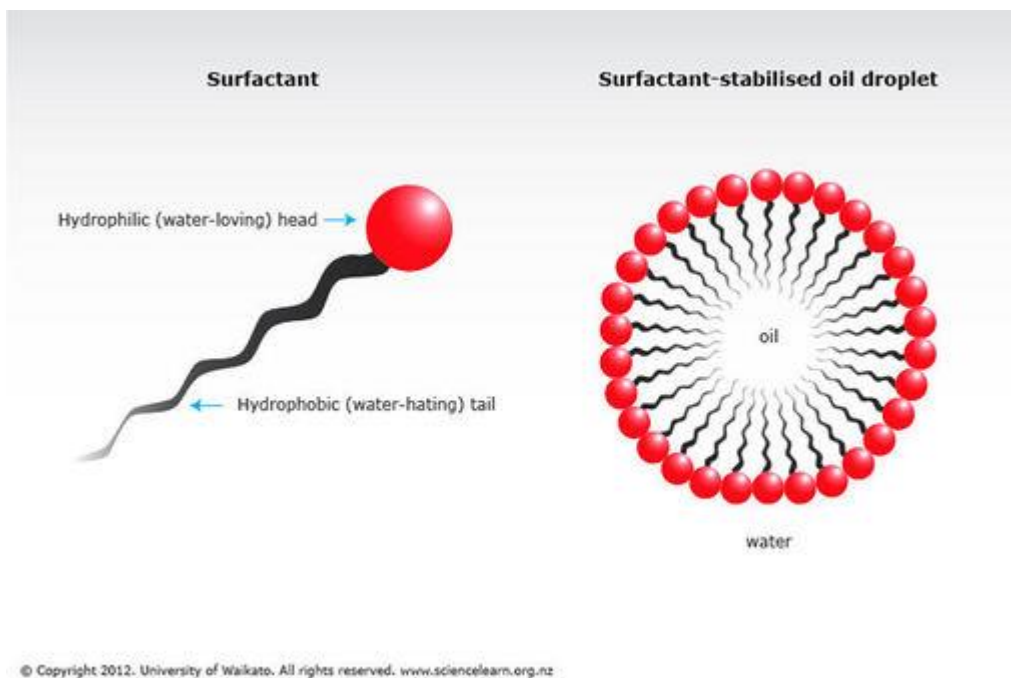
Η αποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς δεν αποτελεί μια διεργασία που λαμβάνει χώρα έξω από την περιοχή του κυττάρου και για αυτό το λόγο επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του. Για να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδόμησης οι μικροοργανισμοί πρέπει να συνδεθούν με το ρύπο και στην συνέχεια να τον προσλάβουν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό τους [37]. Δύο γενικές βιολογικές στρατηγικές έχουν αναφερθεί για την ενίσχυση της επαφής μεταξύ των μικροοργανισμών και του ρύπου: η μία περιλαμβάνει μηχανισμούς διάχυσης και η άλλη την διαλυτοποίηση ή γαλακτωματοποίηση των υδρογονανθράκων. Μικροοργανισμοί με μεγάλη υδροφοβικότητα στην επιφάνεια του κυττάρου τους, λόγω της ύπαρξης επιφανειακών πρωτεϊνών και λιπιδίων, μπορούν να προσκολληθούν επάνω στους υδρογονάνθρακες. Η δεύτερη στρατηγική περιλαμβάνει την παραγωγή εξωκυτταρικών ουσιών που διαλύουν ή δημιουργούν γαλακτώματα στο πετρέλαιο ενισχύοντας την μικροβιακή ανάπτυξη. Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται ως επιφανειοδραστικές (Surfactants).

5.1 Ο ρόλος των επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants)

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (Surfactants) είναι ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια των διαφόρων συστατικών και είναι ικανές να μειώσουν την επιφάνεια και την επιφανειακή τάση στις διεπιφάνειες των υγρών, στερεών και αερίων. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να αναμιχθούν ή να διασκορπιστούν εύκολα ως γαλακτώματα στο νερό ή σε άλλα υγρά. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως τοξικές στο περιβάλλον και μη-βιοδιασπάσιμες. Μπορούν να βιοσυσσωρεύονται και η παραγωγή τους, οι διεργασίες και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα. Καθώς οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται πιο αυστηροί



και η συνειδητοποίηση για την ανάγκη να προστατευθεί το περιβάλλον αυξάνεται, το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων συνεχώς αυξάνεται. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφυλες ενώσεις (amphiphilic compounds) μικροβιακής. Παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών. Είναι μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις [38]. Ενισχύουν την βιοαποδόμηση και απομάκρυνση των υδρογονανθράκων με δύο τρόπους. Ο πρώτος περιλαμβάνει την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του υποστρώματος μέσω της αύξησης της επιφάνειας αδιάλυτων συστατικών, προκαλώντας έτσι μεγαλύτερη κινητικότητα και συνεπώς βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου. Επιπλέον διευκολύνουν την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με τον ρύπο αυξάνοντας την υδροφοβικότητα της επιφάνειας του κυττάρου έτσι ώστε να γίνει δυνατή η προσκόλληση τους σε υδρόφοβες ενώσεις. Ακόμα μπορούν να ενισχύσουν την διεργασία αποδόμησης μέσω της κινητοποίησης (mobilization), διαλυτοποίησης (solubilization) ή γαλακτωματοποίησης (emulsification) του πετρελαίου όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Ο μηχανισμός της κινητοποίησης λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις μικρότερες της κρίσιμης συγκέντρωσης του μυκηλίου (Critical Micelle Concentration-CMC) που είναι το σύμπλεγμα των μορίων της επιφανειοδραστικής ουσίας που σχηματίζεται στην υδατινή φάση. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις οι BS μειώνουν την επιφάνεια και την επιφανειακή τάση μεταξύ του συστήματος αέρα/νερού και εδάφους/νερού. Λόγω της μείωσης της δύναμης μεταξύ των επιφανειών, η επαφή των επιφανειοδραστικών ουσιών με το σύστημα πετρελαίου/χώματος αυξάνεται και μειώνεται η τριχοειδής δύναμη που τα συγκρατεί μεταξύ τους. Στην αντίθετη περίπτωση όπου η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη της CMC η διαλυτοποίηση λαμβάνει χώρα. Οι υδροφοβικές ουρές των μορίων BS συνδέονται μεταξύ τους μέσα στο μυκήλιο ενώ τα υδροφιλικά κεφάλια τους βρίσκονται εκτεθειμένα στην υδατική φάση στο εξωτερικό μέρος. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται στο εσωτερικό ένα συμβατό για τις υδροφοβικές οργανικές ενώσεις περιβάλλον. Τέλος η γαλακτωματοποίηση δημιουργεί ένα υγρό, το γαλάκτωμα, που περιέχει μικρά σταγονίδια του ρύπου που επιπλέουν στο νερό. [39] Όσον αφορά τη μοριακή τους δομή οι επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προελεύσεως αποτελούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα και/ή υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες (fatty alcohol), αντιστοίχως από ένα υδρόφιλο τμήμα αποτελούμενο από μόνο-, ολιγό- ή πολυσακχαρίτες, πεπτίδια ή πρωτεΐνες.



Εικόνα 5.1: Τυπική δομή επιφανειοδραστικής ουσίας και μυκήλιοπου περιέχει το παγιδευμένο πετρέλαιο (University of Waikato-2012)

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (BS-BioSurfactants) κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες:

- Γλυκολιπίδια (glycolipids)
- Φωσφολιπίδια (phospholipids) και λιπαρά οξέα (fatty acids)
- Λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες (lipopeptide/lipoproteins)
- Πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις (polymeric surfactants)
- Σωματιδιακές επιφανειοδραστικές ενώσεις (particulate surfactants)

Στον πίνακα (

Πίνακας 5.2) που ακολουθεί εμφανίζονται οι κύριες κατηγορίες επιφανειοδραστικών ουσιών και των αντίστοιχων μικροοργανισμών που τις παράγουν. [40]



Πίνακας 5.2: Κατηγορίες BS και μικροοργανισμοί που τις παράγουν

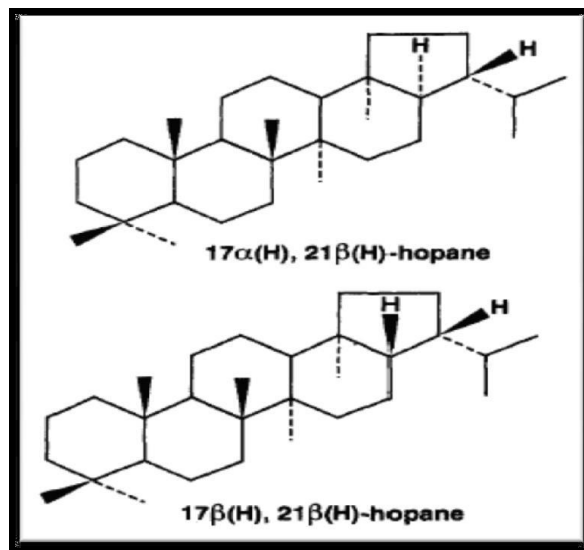
Κατηγορία/Τύπος BS	Μικροοργανισμός
Glycolipids	
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptides and lipoproteins	
Peptide-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidin	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids	
Fatty acid	<i>Corynebacterium lepus</i>
Neutral lipids	<i>Nocardia erythropolis</i>
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Polymeric surfactants	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carbohydrate-lipid-protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mannan-lipid-protein	<i>Candida tropicalis</i>
Particulate surfactant	
Vesicles	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>



5.2 Εκτίμηση του βαθμού αποδόμησης- Εφαρμογή βιοδεικτών (Biomarkers)

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, το πετρέλαιο με την είσοδο του στο περιβάλλον μπορεί να υποστεί πολλές αλλαγές στην δομή και τις συγκεντρώσεις των συστατικών του. Έτσι η εκτίμηση του βαθμού στον οποίο έχει επέλθει η βιοδιάσπαση τους αποτελεί ένα δύσκολο στόχο. Τα καθόλου ή πολύ αργά βιοδιασπώμενα συστατικά του πετρελαίου, αποκαλούμενα και βιοδείκτες, χρησιμοποιούνται για την προσέγγιση της έκτασης της βιοδιάσπασης, μέσω της αξιολόγησης των λόγων των συγκεντρώσεων των υδρογονανθράκων στόχων σε σχέση με την συγκέντρωση αυτών των σχεδόν αμετάβλητων συστατικών. Διευκολύνουν την εξαγωγή συμπερασμάτων που σχετίζονται με τον αν ο βαθμός της βιοαποδόμησης οφείλεται όντως στην αποδόμηση του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς και δεν είναι αποτέλεσμα άλλων φυσικών ή χημικών διεργασιών. Αποτελούν με λίγα λόγια το «δακτυλικό αποτύπωμα» του πετρελαίου που μένει αναλλοίωτο στο πέρασμα του χρόνου.

Οι πιο συνήθεις βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βιοαποικοδόμησης των αργών πετρελαίων είναι τα ισοπρενοειδή πριστανίο και φυτάνιο, τα στεράνια και τα πεντακυκλικά τριτερπάνια όπως τα χοπανοειδή. Τα ισοπρενοειδή πριστανίο και φυτάνιο αποτελούν βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα αρχικά στάδια μιας διεργασίας βιοαποικοδόμησης, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι σε προχωρημένα στάδια βιοδιασπώνται υπό φυσικές συνθήκες. Ο πιο διαδεδομένος βιοδείκτης είναι τα χοπάνια (hopanes) λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητάς τους. Ωστόσο η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή σε περιπτώσεις όπου το δείγμα πετρελαίου που μελετάται δεν έχει επηρεαστεί σημαντικά από τις φυσικές και χημικές διεργασίες γήρανσης. [41]



Εικόνα 5.2: Δομή χοπανίων [41]

6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ

6.1 Περίληψη μεθόδου

Η εξέταση της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίστηκε στο τροποποιημένο πρωτόκολλο της EPA. [42] Το πρωτόκολλο αυτό σχεδιάστηκε για τον καθορισμό της ικανότητας ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο, ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου που οφείλονται στη βιοδιάσπαση. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων καθώς και των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων γνωστοί ως PAHs.

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση της φάσης πετρελαίου αρχικά σε διχλωρομεθάνιο (DCM) ακολουθούμενη από αλλαγή του διαλύτη σε εξάνιο (Hexane). Για να ολοκληρωθεί το πρωτόκολλο δοκιμής απαραίτητη είναι η κανονικοποίηση των διαφόρων αναλυτών του πετρελαίου σε έναν μη-βιοδιασπώσιμο δείκτη, όπως C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή χοπάνιο. Η μέθοδος δοκιμής στοχεύει στα κανονικά αλκάνια τα οποία μπορούν να διασπαστούν σχετικά εύκολα και στα ανθεκτικότερα και τοξικά PAHs. Η κανονικοποίηση του σε C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή C30 17α(H), 21β (H)-χοπάνιο γίνεται σε μία βάση βάρους πετρελαίου δηλαδή mg δείκτη/kg πετρελαίου ή mg αναλύτη στόχου/ kg πετρελαίου. Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (GC/MS) λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Για τις ποσοτικές αναλύσεις το όργανο χρησιμοποιείται σε λειτουργία Selective Ion Monitoring (SIM)



Με ρυθμό ανίχνευσης μεγαλύτερο από 1.5 ανιχνεύσεις το δευτερόλεπτο προκειμένου να μεγιστοποιηθεί το εύρος της γραμμικής ποσοτικοποίησης και φυσικά η ακρίβεια του οργάνου. Η προετοιμασία των δειγμάτων δεν αποκλείει την ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων από το GC/MS σε λειτουργία Full Scanning ώστε να αξιολογηθούν ποσοτικά οι αλλαγές στη σύσταση του πετρελαίου που δεν ελήφθησαν από την προσέγγιση σε λειτουργία SIM. Επιπρόσθετα εκτελείται και μικροβιολογική ανάλυση πέρα από την χημική που αναφέρθηκε παραπάνω. Σκοπός της είναι ο έλεγχος και η παρακολούθηση της βιωσιμότητας των υπό μελέτη μικροβιακών πληθυσμών. Σε αυτή τη διαδικασία, οι μικροβιακές απαριθμήσεις των μικροοργανισμών που λειτουργούν ως βιοαποδομητές υδρογονανθράκων, εκτελούνται σε κάθε δειγματοληψία με την χρήση microtiter και τον προσδιορισμό του Most Probable Number (MPN) ενώ παράλληλα γίνεται καταγραφή των μικροβιακών πληθυσμών σε τριβλία. [43]

6.2 Προετοιμασία πετρελαίου και άμμου

6.2.1 Προετοιμασία Πετρελαίου

Αργό πετρέλαιο μετρίου βάρους (IFO-Intermediate fuel oil) από το Ιράν υπόκειται σε τεχνητή γήρανση με θέρμανση στους 200°C σύμφωνα με την καθορισμένη μέθοδο D86 της American Society for Testing and Materials (ASTM). Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η αφαίρεση του ελαφρύτερου κλάσματος υδρογονανθράκων του ακατέργαστου πετρελαίου πριν την έναρξη του πειράματος. Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη για την προσομοίωση της κατάστασης στην οποία θα βρίσκεται το πετρέλαιο σε μία ρυπασμένη ακτή. Έχει αποδειχθεί ότι περίπου το 50% των ελαφρύτερων συστατικών του πετρελαίου που αποτελούν και τα πιο τοξικά, εξατμίζονται στο μικρό χρονικό διάστημα των 24 ωρών από τη στιγμή της διαρροής του. [44]

Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά πετρελαίου

	Πριν την γήρανση	Μετά την γήρανση
Gravity	0.8232 g/cm ³	0.8886 g/cm ³
Special Gravity (SG)	0.8247 g/cm ³	0.89002 g/cm ³

6.2.2 Προετοιμασία άμμου και ρύπανση της με πετρέλαιο

Τα λιπάσματα χρησιμοποιήθηκαν σε καθαρή φυσική άμμο. Με τον όρο “καθαρή” εννοείται πως η άμμος δεν έχει ρυπανθεί βαριά από βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Συνεπώς η συλλογή της θα έπρεπε να γίνει σε περιβάλλον μακριά από κάποιο εμπορικό λιμένα ή γενικότερα περιοχής με έντονη ανθρωπογενή δραστηριότητα.



Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η άμμος συλλέχθηκε από την περιοχή του Αγίου Ονουφρίου αρχές του Μαρτίου 2014. Στη συνέχεια, η βρεγμένη άμμος μεταφέρθηκε στον εργαστηριακό χώρο όπου και κοσκινίστηκε χειροκίνητα διαμέσου κοσκίνων με διάμετρο πόρων 2mm. Η διαδικασία αυτή έγινε για την απομάκρυνση μεγαλύτερων σωματιδίων (χαλίκια, πέτρες) αλλά και τον καθαρισμό της από διάφορα απορρίμματα κυρίως πλαστικής φύσεως.

Η κοσκινισμένη άμμος ζύγιζε περίπου 12 kg με ποσοστό υγρασίας 20%, ποσοστό που προέκυψε έπειτα από καλή ανάμειξη και λήψη δείγματος. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε 1kg άμμου σε γυάλινα Pyrex διαστάσεων 20cm x 20cm x 6cm όπου και ρυπάνθηκε με 5 γραμμάρια επεξεργασμένου IFO. Η ανάμειξη του IFO με την άμμο έγινε με την βοήθεια διαλύματος πεντανίου/ DCM σε αναλογία 1:20 και όγκου ενός λίτρου. Ακολούθησε ανάμειξη του διαλύματος και της άμμου για ολοκληρωμένη ομογενοποίηση. Τέλος οι διαλύτες εξατμίστηκαν από την άμμο τοποθετώντας τα δοχεία σε ειδικούς απαγωγούς με αποτέλεσμα να έχουμε μια θεωρητική συγκέντρωση TPH ίση με 5000 mg/kg άμμου.

6.3 Καθορισμός των χαρακτηριστικών του χώματος

6.3.1 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Η ικανότητα συγκράτησης νερού καθορίστηκε με την τοποθέτηση δείγματος χώματος βάρους 20 γραμμαρίων σε χοάνες με φίλτρο Whatman 2V, οι οποίες ήταν τοποθετημένες σε προ-ζυγισμένες φιάλες των 250 ml, όπως περιγράφεται από τον Foster, 1995.

Η εξίσωση για τον υπολογισμό της ικανότητας συγκράτησης νερού είναι η παρακάτω.

$$\% \text{ Water Holding Capacity} = \frac{(100 - W_p) + W_i}{dwt} * 100 \quad (6-1)$$

Όπου:

Wp : το βάρος του νερού του φιλτραρισμένου νερού

Wi : το αρχικό βάρος νερού που περιέχεται στο δείγμα

dwt : το ξηρό βάρος του χώματος

Το έδαφος χαρακτηρίστηκε ως αμμώδες και με βάση την παραπάνω εξίσωση προέκυψε ότι η ικανότητα συγκράτησης νερού του χώματος είναι ίση με **33.73%**. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να παρεμποδίσει την παροχή οξυγόνου και ως αποτέλεσμα να μειώσει τον ρυθμό της βιοδιάσπασης. Στην αντίθετη περίπτωση, μικρή ποσότητα νερού μπορεί να αναστείλει την μικροβιακή δραστηριότητα. Το βέλτιστο ποσοστό υγρασίας για την υποστήριξη των μικροοργανισμών είναι μεταξύ 30% και 60% της χωρητικότητας του χώματος, δηλαδή στην περίπτωση αυτή μεταξύ 10.12% και 20.24%.



6.3.2 Περιεκτικότητα σε νερό και ξηρή μάζα χώματος

Η περιεκτικότητα σε νερό των δειγμάτων άμμου καθορίστηκε βαρομετρικά μετά από ξήρανση σε ειδικό φούρνο στους 105°C για διάρκεια μιας νύχτας. Η διαφορά της μάζας πριν και μετά την ξήρανση ισούται με τον νερό που περιέχει το δείγμα. Η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να υπολογιστεί είτε βαρομετρικά δηλαδή g νερού / g άμμου είτε ογκομετρικά (cm³ νερού / cm³ άμμου). (Wilke, 2005)

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

$$W_{dm} = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m_0} * 100 \quad (6-2)$$

$$W_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} * 100 \quad (6-3)$$

Όπου:

W_{dm} : Περιεκτικότητα μάζας (%)

W_{H_2O} : Περιεκτικότητα νερού (%)

m_0 : Μάζα άδειου δοχείου (g)

m_1 : Μάζα δοχείου μαζί με υγρή άμμο (g)

m_2 : Μάζα δοχείου μαζί με ξηρή άμμο (g)

6.4 Λιπάσματα και επιφανειοδραστικές ουσίες

Για την διεξαγωγή αυτού του πειράματος και την ενίσχυση της μικροβιακής δραστηριότητας των οργανισμών του χώματος χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά λιπάσματα σε διάφορους συνδυασμούς. Η ανάμειξη τους έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η αναλογία των πηγών άνθρακα : αζώτου : φωσφόρου ίση με 100:10:1.



6.5 Λεκιθίνη σόγιας

Παράγεται από καρπούς σόγιας με εξαγωγή και καθαρισμό των φωσφολιπιδίων που περιλαμβάνουν τα phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) και phosphatidylinositol (PI). Αποτελούν ουσίες επιφανειοδραστικές με ταυτόχρονη αμφοφιλική (έχοντας υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα) φύση που τις καθιστά ένα πολύ φθηνό παράγοντα για την ανάμειξη και διάλυση πρακτικά αδιάλυτων ουσιών. Μειώνοντας την επιφανειακή τάση λειτουργούν ως μέσο διασποράς ενώ όταν χρησιμοποιηθούν ανάμεσα σε δύο στερεές φάσεις διευκολύνουν την λίπανση και απελευθέρωση των ουσιών. Επιπλέον λειτουργούν και ως φυσικό λίπασμα πηγής φωσφόρου. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε υγρή λεκιθίνη της Sime Darby Unimills- Bolec ZT (IP). [45]

6.6 Oil Be Gone

Αποτελεί βιοδιασπώμενο επιφανειοδραστικό μίγμα σχεδιασμένο ειδικά για γαλακτοματοποίηση και διασπορά διαλυτών, καυσίμων, λαδιών και γράσων. Όταν εφαρμόζεται σε διαρροές καυσίμων, μειώνει την απελευθέρωση εύφλεκτων αναθυμιάσεων και των πιθανών κινδύνων τους. Επιπλέον η εφαρμογή του σε πετρελαιοκηλίδες σπάει την ιριδίζουσα ταινία που σχηματίζεται και διευκολύνει την απομάκρυνση των κατάλοιπων του πετρελαίου. Αποτελεί ουσία άοσμη, άχρωμη και προωθεί την ταχεία αποδόμηση των υδρογονανθράκων από φυσική αποδόμηση. [46]

6.7 Basfoliar 36 extra

Υγρό λίπασμα της COMPO Expert με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο μαγνήσιο και μαγγάνιο. [47]

Σύνθεση:

27% συνολικό άζωτο (18,7% καρβαμικό, 3,6% αμμωνιακό, 4,7 νιτρικό)
3% μαγνήσιο (MgO)

Ιχνοστοιχεία: 1% Mn, 0,02% Fe, 0,2% Cu, 0,01% Zn, 0,02% B, 0,005% Mo

6.8 AvantNatur 8-4-6

Υγρό οργανικό λίπασμα με υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα, 100% φυτικής προέλευσης εμπλουτισμένο με ανόργανο άζωτο, φώσφορο και κάλιο. [47]

Σύνθεση:

8,1% συνολικό άζωτο (3% σε οργανική μορφή, 1,8% νιτρικό, 1,1% αμμωνιακό και 2,2% ουρικό άζωτο)
4% P₂O₅



5% K₂O
5,7% ελεύθερα L-αμινοξέα
30% συνολική οργανική ουσία

6.9 Οργανικό Λίπασμα “ΑΓΡΟΣΥΝ”

Το “ΑΓΡΟΣΥΝ” είναι φυσικό οργανικό λίπασμα που παράγεται από κοπριά πουλερικών από την εταιρία “Πίνδος” χωρίς καμιά πρόσμιξη άλλων ουσιών. Αποτελεί πλήρως και σωστά ζυμωμένη κοπριά πουλερικών, απαλλαγμένη από ζιζάνια, μύκητες, έντομα και βλαβερούς μικροοργανισμούς, άοσμη και κατάλληλη για άμεση χρήση υπό την μορφή κόκκου (Pellets). [48]

Σύνθεση

Οργανική ουσία 70-80%	Μαγνήσιο (Mg) 0,9%
Υγρασία 13-16%	Σίδηρος (Fe) 0.5%
PH 7	Μαγγάνιο (Mn) 0.07%
Άζωτο (N) 3-5%	Ψευδάργυρος (Zn) 0,05%
Φώσφορος (P2 O5) 3-5%	Βόριο (B) 0,009%
Κάλιο (K2O) 3-4%	Χαλκός (Cu) 0.006%

Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν οι εξής:

1. ΑΓΡΟΣΥΝ+ Λεκιθίνη (Δείγμα AL)
2. ΑΓΡΟΣΥΝ + Λεκιθίνη + Oil Be Gone (Δείγμα ALB)
3. Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη (ΔείγμαB36L)
4. Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη + Oil Be Gone (Δείγμα B36LB)
5. Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη (Δείγμα ANL)
6. Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη + Oil Be Gone (Δείγμα ANLB)



7 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΔΟΜΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στο δείγμα ελέγχου, όπου δεν έχει γίνει καμία προσθήκη θρεπτικών συστατικών, καθώς και στα υπόλοιπα 6 υπό εξέταση λιπάσματα, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για μια περίοδο 100 ημερών. Αυτές περιλαμβάνουν την αρχική, όπου έγινε η προσθήκη των θρεπτικών ακολουθούμενη από την 15^η, 30^η, 45^η, 60^η και τέλος 100^η ημέρα. Στον πίνακα (Πίνακας 7.1) που ακολουθεί εμφανίζεται το χρονοδιάγραμμα του πειράματος.

Σε κάθε δειγματοληψία αφαιρούνταν η απαιτούμενη ποσότητα χρώματος ανάλογα με το είδος της ανάλυσης. Οι συγκεκριμένες διαδικασίες για τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, καθώς και τα υλικά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι στο διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των δειγματοληψιών τα πειράματα δεν έμεναν απερίθαλπτα. Καθημερινά η άμμος όλων των δοχείων αναδεύονταν ώστε να διατηρηθεί η ομοιογένεια του μίγματος άλλα και για να υπάρχει επαρκής ποσότητα οξυγόνου σε όλο το βάθος του δοχείου. Επιπλέον, υπήρχε καθημερινή διάβροχη της άμμου με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό προκειμένου να διατηρηθεί η υγρασία στα επιθυμητά επίπεδα. (Εικόνα 7.1)

Πίνακας 7.1: Ημερομηνίες δειγματοληψιών

	Δευτέρα	Τρίτη	Τετάρτη	Πέμπτη	Παρασκευ	Σάββατο	Κυριακή
Μάρτιος	28	29	30	31		1	2
	3	4	5	6	7	8	9
	10	11	12	13	14	15	16
	17	18	19	20	21	22	23
	24	25	26	27	28	29	30
Απρίλιος	31	1	2	3	4	5	6
	7	8	9	10	11	12	13
	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27
Μάιος	28	29	30	1	2	3	4
	5	6	7	8	9	10	11
	12	13	14	15	16	17	18
	19	20	21	22	23	24	25
	26	27	28	29	30	31	1
Ιούνιος	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	11	12	13	14	15
	16	17	18	19	20	21	22
	23	24	25	26	27	28	29
	30	1	2	3	4	5	6



Εικόνα 7.1: Εγκατάσταση διεξαγωγής των πειραμάτων

7.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή του πειράματος προκειμένου να καθοριστεί ο βαθμός στον οποίο οι μικροοργανισμοί είναι ενεργοί υπό τις δεδομένες συνθήκες, καθώς και να εκτιμηθεί ο πληθυσμός τους. Για τους λόγους αυτούς έγιναν δύο ειδών μικροβιακές αναλύσεις που περιλαμβάνουν την μέθοδο MPN με βάση τις οδηγίες της USEPA, και μία τυπική καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών σε τριβλία σε μονάδες CFU (ColonyFormingUnits). Η διαδικασία και τα απαραίτητα μέσα για κάθε τεχνική περιγράφεται στα επόμενα κεφάλαια.

7.1.1 Μέθοδος MPN (Most Probable Number)

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της βιωσιμότητας των υπό μελέτη μικροβιακών πληθυσμών που βρίσκονται μέσα στα δοχεία της άμμου, εκτελούνται μικροβιακές απαριθμήσεις των



βιοαποδομητών υδρογονανθράκων σε κάθε δειγματοληψία με την χρήση ενός microtiter MPN προσδιορισμού. Η δοκιμή αυτή στηρίζεται στη απόκριση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, που αποτελεί ένδειξη ενισχυμένης δραστηριότητας τους συγκρινόμενη με έναν έλεγχο μάρτυρα (blank).

7.1.1.1 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου- Bushnell Haas broth

Ο ζωμός Bushnell Haas που προετοιμάζεται με βάση την σχέση που περιγράφηκε από τους Bushnell και Haas, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ικανότητας των μικροοργανισμών να αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες. Δεν περιέχει πηγή άνθρακα, και για αυτό το λόγο είναι δυνατή η προσθήκη μιας εναλλακτικής πηγής που στην περίπτωση αυτού του πειράματος είναι το πετρέλαιο IFO-180.

Η διαδικασία παρασκευής του περιλαμβάνει την ανάμειξη 3,27 γραμμαρίων της φόρμουλας της Sigma-Aldrich που είναι διαθέσιμη στο εργαστήριο, με ένα λίτρο απιονισμένου νερού σε αποστειρωμένη ογκομετρική φιάλη. Μετά από επαρκή θέρμανση και ταυτόχρονη ανάδευση ώστε να επιτευχθεί ομογενοποίηση του μίγματος, τοποθετείται σε αποστειρωτικό κλίβανο για 15 λεπτά στους 121°C. Μετά την αποστείρωση αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να κρυώσει και χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται στο ψυγείο για μελλοντική χρήση. Το τελικό διάλυμα που παράγεται έχει την σύσταση που αναγράφεται στον ακόλουθο πίνακα ().

Πίνακας 7.2: Σύσταση θρεπτικού μέσου Bushnell-Haas

Συστατικό	Γραμμάρια ανά λίτρο
Φωσφορικό Κάλιο, Μονοβασικό	1
Φωσφορικό Κάλιο, Διβασικό	1
Νιτρική Αμμωνία	1
Θειικό μαγνήσιο, Επταένυδρο	0,2
Χλωριούχο ασβέστιο	0,02
Τριχλωριούχος Σίδηρος	0,05

7.1.1.2 Προετοιμασία δείγματος και αραιώσεις

Πριν την έναρξη της διαδικασίας, ζυγίζονται 5 γραμμάρια της ρυπασμένης άμμου από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε αποστειρωμένες ογκομετρικές φιάλες μαζί με 50 ml του διαλύματος Bushnell-Haas. Στην συνέχεια ακολουθεί ανάδευση τους στις 150 στροφές το λεπτό



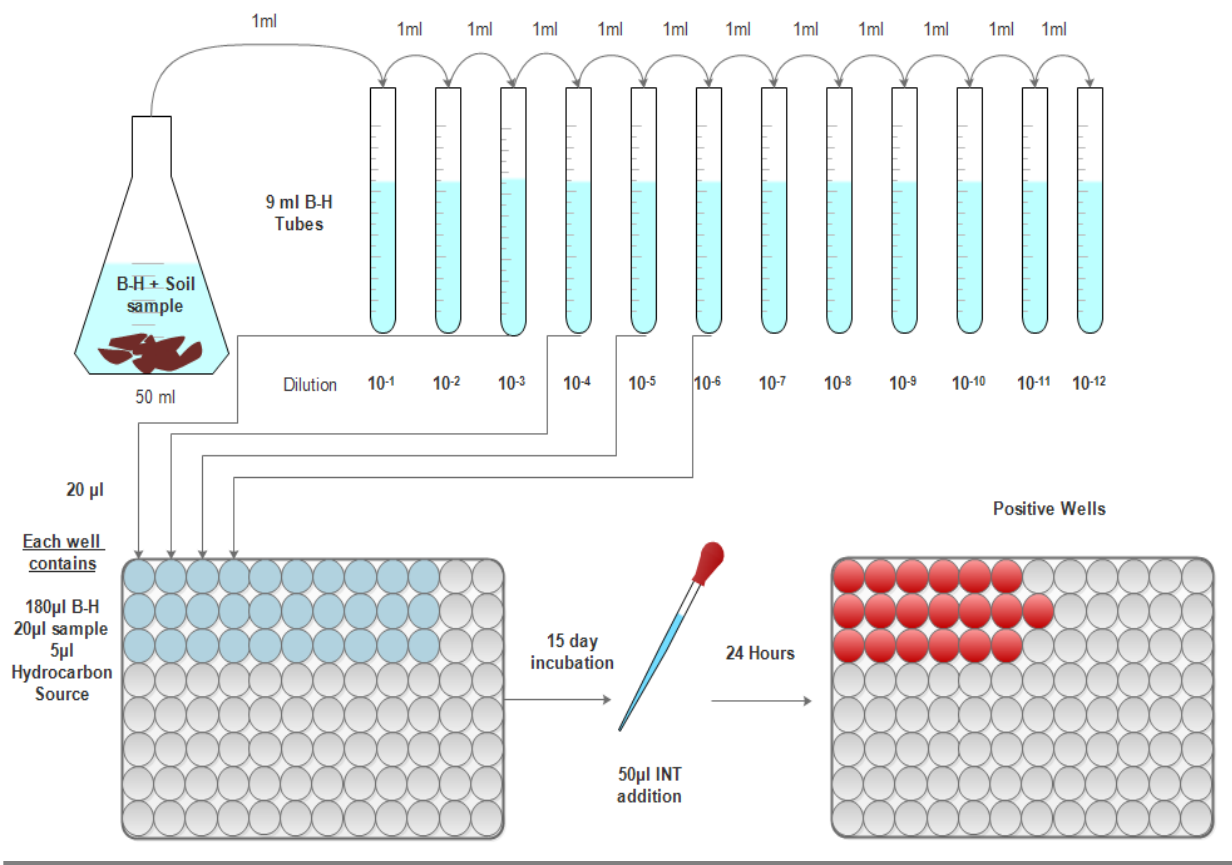
για 30 λεπτά. Τα δείγματα μεταφέρονται στον απαγωγό όπου 1 ml από κάθε φιάλη, που αντιπροσωπεύει ένα δείγμα, προστίθεται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα αραιώσεως που περιέχει 9 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου Bushnell-Haas. Οπότε προκύπτει ένα διάλυμα με αραιώση 1:10. Τέλος εκτελούνται τμηματικές αραιώσεις, με χρήση διαφορετικής αποστειρωμένης μύτης (tip) (1 mL της προηγούμενης αραιώσεως σε 9 mL καινούργιου αποστειρωμένου σωλήνα με Bushnell-Haas θρεπτικού) μέχρι την 10^{-12} αραιώση.

7.1.1.3 Εμβολιασμός των 96 microtiter well MPN plates

Αφού έχουν γίνει όλες οι επιθυμητές αραιώσεις ξεκινά η διαδικασία εμβολιασμού των αποστειρωμένων με UV ακτινοβολία MPN plates. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 180 μ L Bushnell-Haas θρεπτικού προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι
- 5 μ L αποστειρωμένου πετρελαίου προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι
- 20 μ L δείγματος από την επιθυμητή αραιώση προστίθενται πηγαίνοντας σε πιο μικρές αραιώσεις από τα αριστερά προς τα δεξιά. Οι δύο τελευταίες στήλες δεν συμπληρώνονται καθώς αποτελούν τα πηγάδια μάρτυρες. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές για κάθε αραιώση.

Μετά τον επιτυχή εμβολιασμό τα MPN plates τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο που διατηρεί σταθερή θερμοκρασία των 20°C για 15 ημέρες. Τέλος με το πέρας των 15 ημερών προστίθενται στα πηγαδάκια 50 μ L φιλτραρισμένης και αποστειρωμένης βαφής INT. Η χρώση των θετικών πηγαδιών, που φέρουν κόκκινο ή μωβ χρώμα, είναι σχετικά άμεση όπου και γίνεται η καταμέτρηση τους. Τα στοιχεία για το πόσες αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν και ποια πηγάδια εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα εισάγονται σε ειδικό πρόγραμμα της USEPA, το MPN Calculator για τον τελικό υπολογισμό του αριθμού MPN για κάθε δείγμα. Στην εικόνα (Εικόνα 7.2) που ακολουθεί παρουσιάζεται η διαδικασία των αραιώσεων και στην συνέχεια ο εμβολιασμός και η αναγνώριση των ενεργών πηγαδιών.



Εικόνα 7.2: Διαδικασία αραιώσεων και εμβολιασμού πηγαδιών

7.1.2 Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού σε τριβλία

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες και παρουσία θρεπτικών συστατικών αναπτύσσονται και σχηματίζουν ορατές στο γυμνό μάτι αποικίες, οι οποίες ονομάζονται και CFUs.

7.1.2.1 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου (Marine Agar)

Το Marine Agar χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων και παρασκευάζεται με βάση την σύσταση που έχει προταθεί από τον Zo Bell, ώστε να παρέχει εκτός όλων των απαραίτητων συστατικών για την ανάπτυξη τέτοιου είδους μικροοργανισμών παρόμοια σύσταση με το θαλασσινό νερό, σχεδόν αντιγράφοντας την σύσταση του.

Με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, 55.1 γραμμάρια της σκόνης Marine Agar προστίθενται σε 1L απιονισμένο νερό για την παρασκευή του μίγματος. Για τις ανάγκες του πειράματος



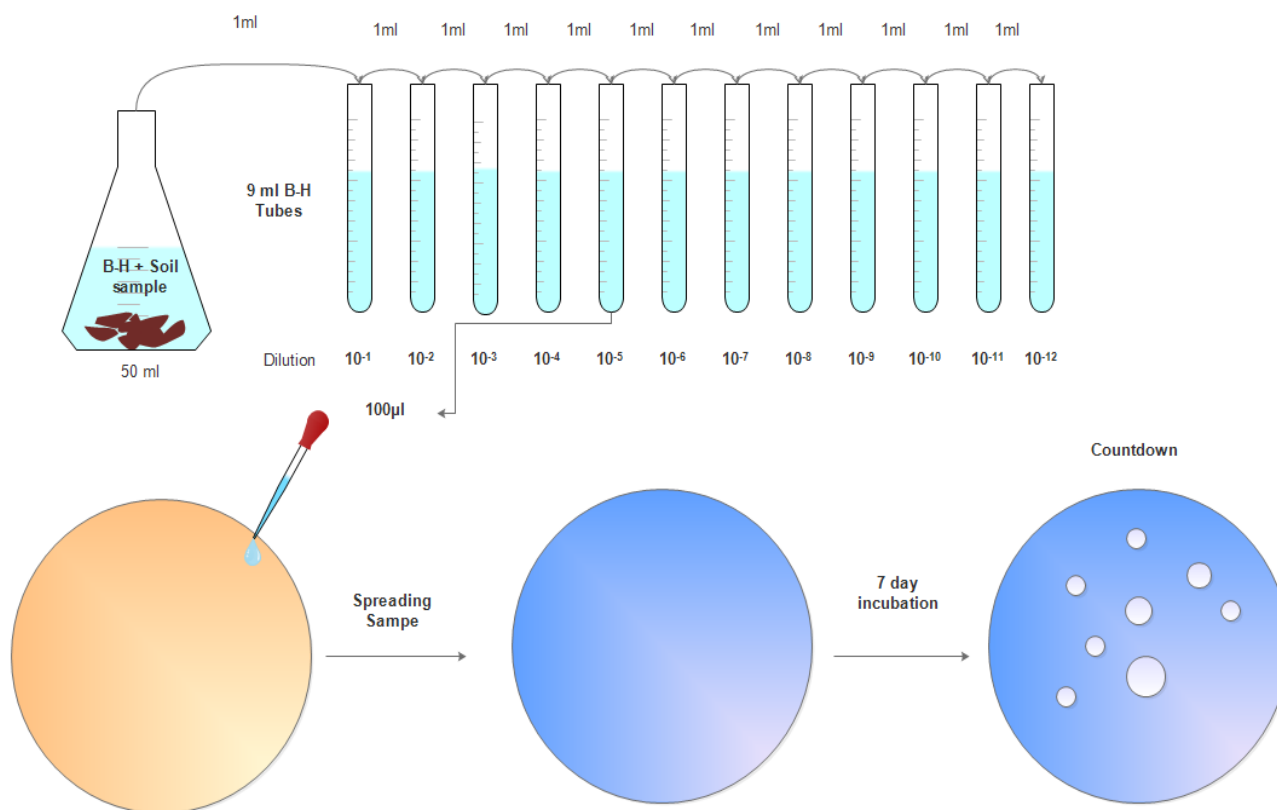
λιγότερη ποσότητα θεωρείται αρκετή. Συνεπώς, με αναγωγή της δοσμένης αναλογίας προστίθενται 11,02 γραμμάρια της σκόνης σε 200 ml απιονισμένου νερού το οποίο βρίσκεται σε φιάλες των 250 ml. Στην συνέχεια ακολουθεί η ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση του μίγματος με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Αφού έχει γίνει πλήρης διάλυση, η φιάλη τοποθετείται στον κλίβανο για αποστείρωση.

7.1.2.2 Προετοιμασία τριβλίων

Τα τριβλία που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τις μικροβιολογικές καλλιέργειες έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί στον απαγωγό με την βοήθεια ακτινοβολίας UV. Με το θρεπτικό υλικό (Marine Agar) που έχει βγει από τον κλίβανο αποστείρωσης γίνεται η στρώση των τριβλίων απλώνοντας το προσεκτικά στην βάση τους. Στην συνέχεια τα τριβλία αφήνονται μέσα στον απαγωγό ώστε να σταθεροποιηθεί το υλικό με την ψύξη του, και τέλος σκεπάζονται και αποθηκεύονται ανάποδα στο ψυγείο προκειμένου η υγρασία να συσσωρευτεί στο πάνω μέρος και να μην επηρεάσει με οποιονδήποτε τρόπο το θρεπτικό υλικό.

7.1.2.3 Εμβολιασμός των τριβλίων

Η διαδικασία εμβολιασμού των τριβλίων γίνεται παράλληλα με τον εμβολιασμό των πηγαδιών στην μέθοδο καθορισμού του MPN. Τα τριβλία που έχουν αποθηκευτεί στο ψυγείο αφήνονται στον απαγωγό ώστε να φτάσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν την έναρξη της διαδικασίας. Από τις κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί (επιλέχθηκαν αυτές των 10^{-5} και 10^{-6} στην πλειοψηφία) απλώνονται προσεκτικά 100 μL του δείγματος στην επιφάνεια του τριβλίου με το σταθεροποιημένο πια θρεπτικό υλικό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται δύο φορές για κάθε αραιώση. Με τεχνικές αποστείρωσης επαναλαμβάνεται ο εμβολιασμός και για τα υπόλοιπα δείγματα. Στην συνέχεια τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 20°C για μία εβδομάδα. Με το τέλος της εβδομάδας είναι δυνατή η καταμέτρηση των αποικιών που έχουν σχηματιστεί. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 7.3) εμφανίζεται η διαδικασία εμβολιασμού και καταμέτρησης των μικροβιακών αποικιών.



Εικόνα 7.3: Διαδικασία καταμέτρησης μικροβιακού πληθυσμού

7.2 Χημικές αναλύσεις

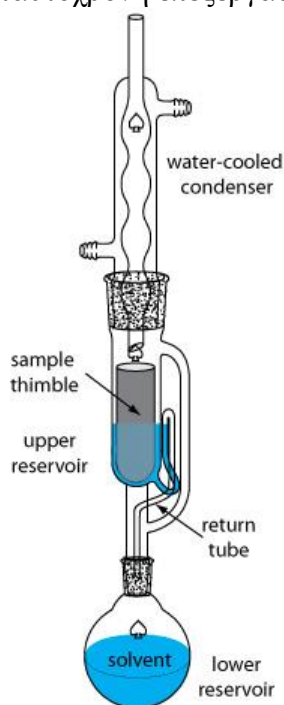
Η εκπόνηση αυτού του πειράματος και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας βιοαποδόμησης των πετρελαιοειδών δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την ποσοτικοποίηση της μεταβολής της συγκέντρωσης των διαφόρων συστατικών του πετρελαίου. Η τελική αναγνώριση και ποσοτικοποίηση τους πραγματοποιείται στον αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC/MS) με την προγενέστερη όμως επεξεργασία του πετρελαίου με μια σειρά διαδικασιών που αναλύονται παρακάτω.

7.2.1 Εκχύλιση δειγμάτων σε συσκευή Soxhlet

Δεδομένου ότι το πετρέλαιο βρίσκεται προσκολλημένο στην επιφάνεια του χώματος των διαφόρων δειγμάτων απαραίτητο βήμα αποτελεί ο διαχωρισμός του για περεταίρω επεξεργασία.



Η εκχύλιση αποτελεί μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους διαχωρισμού και στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Soxhlet που εφευρέθηκε το 1879 από τον Franz von Soxhlet. Χρησιμοποιείται κυρίως όταν η ουσία προς εξαγωγή (πετρέλαιο) έχει πολύ μικρή διαλυτότητα προς έναν διαλύτη ενώ η ακαθαρσία (χώμα - άμμος) είναι αδιάλυτη προς αυτόν. Η λειτουργία της είναι απλή και βασίζεται στην ανακυκλοφορία του διαλύτη (χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο) στην συσκευή μέσω διαδικασιών ατμοποίησης του, αρχικά από τον βραστήρα, και συμπύκνωσής των ατμών στην στήλη ψύξης. Η δομή μιας τυπικής συσκευής Soxhlet εμφανίζεται στην Εικόνα 7.4. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τέσσερις συσκευές Soxhlet για ταυτόχρονη επεξεργασία δειγμάτων.



Εικόνα 7.4: Συσκευή Soxhlet

7.2.2 Προετοιμασία δείγματος και εκχύλιση του

Το δείγμα χώματος που θα τοποθετηθεί στην συσκευή πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Για την ξήρανση του χρησιμοποιείται ενεργοποιημένο άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) που προκύπτει από την τοποθέτηση του σε κλίβανο στους 400°C για 4 ώρες. Η ξήρανση των 10 γραμμαρίων χώματος από εμπειρική συσχέτιση απαιτεί κατά μέσο όρο 20 γραμμάρια θειικού νατρίου, τα οποία αναδεύονται σε πλήρινα δοχεία. Στην συνέχεια τοποθετούνται 500 μl διαλύματος ανάκτησης υποκατάστατου (Surrogate Recovery Standard) που προετοιμάζεται με τον ακόλουθο τρόπο: 2000 ppm από d10-phenanthrene και 2000 ppm από 5 α -androsterane



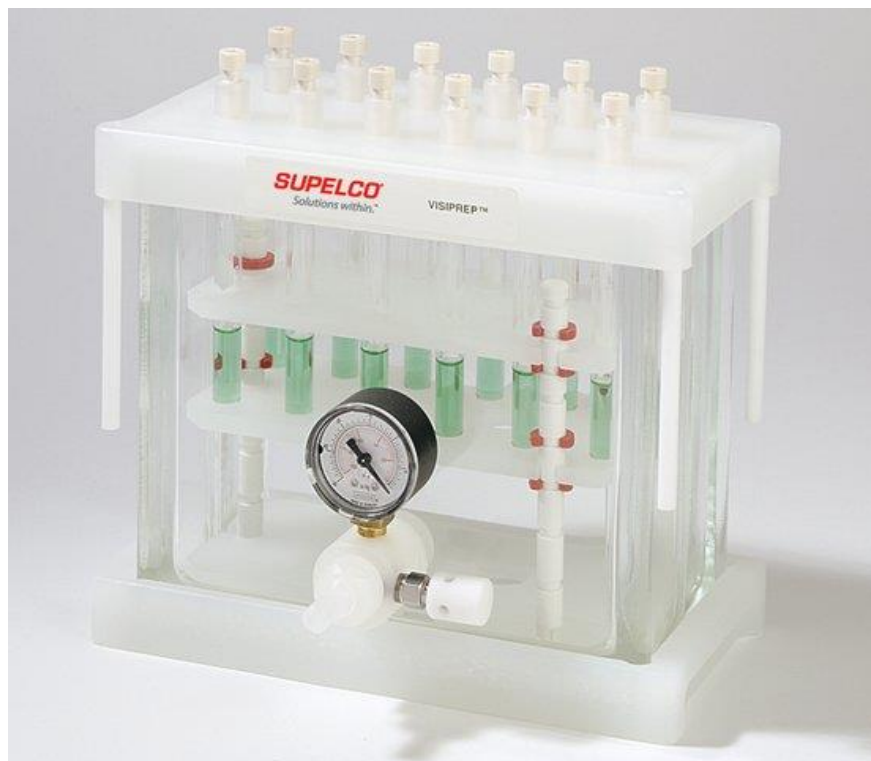
αναμειγνύονται σε μια ογκομετρική φιάλη των 5 ml και προστίθεται DCM μέχρι την χαραγή για να παραχθεί ένα αποθεματικό διάλυμα 400 ppm. Οι αλειφατικές ενώσεις θα πρέπει να διορθωθούν για ποσοστιαία ανάκτηση με το 5 α -androstane surrogate και οι αρωματικές ενώσεις με το d10-phenanthrene surrogate μετά την ανάλυση στο GC/MS. Έπειτα από εκτενή ανάμιξη το μίγμα τοποθετείται στα ειδικά κυλινδρικά δοχεία φτιαγμένα από χοντρό χαρτί φιλτραρίσματος (Thimbles) και καλύπτονται με υαλοβάμβακα. Το δείγμα είναι έτοιμο για εισαγωγή στον εκχυλιστήρα Soxhlet.

Στην συνέχεια τοποθετούνται στις σφαιρικές φιάλες της συσκευής περίπου 10 σφαιρίδια βρασμού (BoilingBalls) για ομαλή διάχυση της θερμότητας μαζί με 300 ml διχλωρομεθάνιο (DCM) από απόσταξη που αποτελεί το μέσο διάλυσης. Η φιάλη τοποθετείται επάνω στη συσκευή θέρμανσης και σε αυτή προσαρμόζονται ο εκχυλιστήρας Soxhlet που περιέχει το δείγμα και τέλος ο συμπυκνωτής ώστε να ολοκληρωθεί το κύκλωμα. Τέλος έχοντας συνδέσει όλα τα μέρη ξεκινά η θέρμανση της φιάλης και η κυκλοφορία νερού στο ψυκτήρα. Η διαδικασία της εκχύλισης κρατά κατά μέσο όρο 24 ώρες. Με την ολοκλήρωση της το εκχύλισμα αφήνεται να κρυώσει και τοποθετείται σε περιστροφικό μηχάνημα εξάτμισης (Rotary Evaporator) όπου εξατμίζεται ο διαλύτης. Το πετρέλαιο που έχει απομείνει μετά την εξάτμιση μεταφέρεται με χρήση πιπέτας και μικρής ποσότητας DCM σε προζυγισμένα φιαλίδια των 4ml τα οποία στην συνέχεια τοποθετούνται σε ξηραντήρα κενού για 24 περίπου ώρες ανάλογα με την ποσότητα DCM που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά. Τέλος τα φιαλίδια ζυγίζονται μαζί με το περιεχόμενο ώστε να προσδιοριστεί το βάρος του πετρελαίου που ανακτήθηκε.

7.2.3 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) - Κλασματοποίηση πετρελαίου

Η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελεί μία γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική για τον διαχωρισμό του κορεσμένου και αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου. Αποτελεί το προκαταρκτικό στάδιο πριν την τελική ανάλυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας. Η SPE είναι κατά πολύ αποτελεσματικότερη τεχνική από αυτή της εκχύλισης υγρού/υγρού καθώς επιτυγχάνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, είναι ταχύτατη και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για στερεά δείγματα τα οποία προηγουμένως έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη. [49] Με την χρήση της επιλύονται πολλά προβλήματα, όπως ο ατελής διαχωρισμός φάσεων, η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού όπως διαχωριστικές χοάνες αλλά και κυρίως για τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών. Μία τυπική διάταξη της SPE φαίνεται στην Εικόνα 7.5.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, για τον διαχωρισμό του κορεσμένου κλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το εξάνιο και για το αρωματικό κλάσμα το διχλωρομεθάνιο (DCM). Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει 12 θέσεις για τις στήλες διαχωρισμού οι οποίες μπορούν να στεγανοποιηθούν ανεξάρτητα. Η ροή του διαλύτη μέσα από αυτές πραγματοποιείται μέσω της βαρύτητας, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις όπου η εφαρμογή κενού είναι αναγκαία.



Εικόνα 7.5: Διάταξη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) [Πηγή: SigmaAldrich]

7.2.4 Προετοιμασία δείγματος - Διαδικασία SPE

Πριν την έναρξη της εκχύλισης στερεάς φάσης ζυγίζονται και μεταφέρονται 5-10 mg πετρελαίου από το δείγμα που έχει προέλθει στην εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet σε προζυγισμένα φιαλίδια των 4 ml όπου και διαλύεται με 1 ml εξανίου. Μετά την συναρμολόγηση της συσκευής και εισαγωγής των καινούργιων φιαλιδίων και στηλών πραγματοποιείται έκπλυση τους (Preconditioning) με 2ml εξανίου. Αφού όλο το εξάνιο έχει περάσει στο προσροφητικό υλικό της στήλης, τοποθετείται το δείγμα. Με το που περάσει όλο το δείγμα στην στήλη τοποθετούνται σταδιακά άλλα 4 ml εξανίου (2x2ml) για την ανάκτηση του πρώτου κλάσματος που αντιστοιχεί στους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (F1). Τα φιαλίδια του πρώτου κλάσματος απομακρύνονται και τοποθετούνται καινούργια για το δεύτερο κλάσμα των αρωματικών (F2) που προκύπτει με την χρήση 4 ml DCM (2x2ml). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής τα φιαλίδια που τώρα περιέχουν τα δύο κλάσματα του πετρελαίου τοποθετούνται για ξήρανση σε ρεύμα αζώτου.



Τέλος τα δύο κλάσματα μεταφέρονται για τελευταία φορά, με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για των διαχωρισμό τους, σε προζυγισμένα φιαλίδια των 2 ml που είναι κατάλληλα για εισαγωγή και ανάλυση στη συσκευή GC/MS. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντή κενού προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά και ζυγίζονται ξανά μετά το πέρας 24 ωρών.

7.2.5 Ανάλυση GC/MS

Τελευταίο στάδιο των χημικών αναλύσεων που αποσκοπούν στην τεκμηρίωση και αξιολόγηση του βαθμού αποδόμησης του πετρελαίου αποτελεί η εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο/φασματόμετρο μάζας (Εικόνα 7.6). Συγκεκριμένα ο αέριος χρωματογράφος (GC) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των διαφόρων συστατικών του δείγματος ενώ αντίστοιχα το φασματόμετρο μάζας (MS) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συστατικών αυτών. Η χρήση του GC/MS έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην χημική ανάλυση πετρελαιοειδών λόγω του μεγάλου αριθμού συστατικών που μπορεί να περιέχουν.



Εικόνα 7.6: Διάταξη συστήματος GC/MS [50]



7.2.6 Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία ανάλυσης GC/MS

Έχοντας παραλάβει τα δείγματα που περιέχουν τα κλάσματα των κορεσμένων (F1) και αρωματικών (F2) είναι απαραίτητη η εισαγωγή ενός εσωτερικού πρότυπου (Internal Standard) διαλύματος τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων. Προκειμένου να εξαχθούν ικανοποιητικές πληροφορίες για την αποδόμηση των συστατικών αυτών, τα δείγματα ποσοτικοποιούνται με την τεχνική του εσωτερικού προτύπου για το αλειφατικό και αρωματικό κλάσμα. Το εσωτερικό αυτό πρότυπο διάλυμα αποτελείται από: naphthalene-d8, phenanthrene-d10, crysene-d12 και perylene-d12. Επιπλέον για να διασφαλιστεί το γεγονός ότι η πτώση στους αναλυτές στόχους οφείλεται σε βιοαποδόμηση παρά από άλλες διεργασίες, είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων με την χρήση εσωτερικών δεικτών “Conserved Internal Marker”. Εσωτερικοί δείκτες που έχουν βρεθεί χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση είναι C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο και C₃₀17α(H),21β(H)-χοπάνιο. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του σχετικού συντελεστή απόκρισης (Relative Response Factor-RRF). Στην παρούσα εργασία ως δείκτης για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το C₃₀17α(H),21β(H)-χοπάνιο.

Η διαδικασία ανάλυσης του δείγματος στο GC/MS διεξάγεται ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

1. Στα φιαλίδια που περιέχουν τα F1-αλειφατικά και F2-κορεσμένα κλάσματα προστίθενται 1 ml εξάνιο και 1 ml DCM αντίστοιχα.
2. Σε αυτά τα διαλύματα στην συνέχεια προστίθενται 5 ml από το διάλυμα 200 ppm των εσωτερικών προτύπων, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 1 ppm. Το δείγμα είναι έτοιμο για ένεση στην συσκευή GC.
3. Ένα τυφλό δείγμα και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων για έλεγχο της απόδοσης του οργάνου.
4. Τα στοιχεία του δείγματος (όνομα, ποσότητα κ.λ.π.) εισάγονται στο πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου.
5. Στην συνέχεια το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 10 ppm αντί 40 ppm. Δημιουργείται μία καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 0,5-10 ppm. Η βαθμονόμηση των 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο δείγμα προκειμένου να προσδιοριστούν τα RRFs κάθε αναλύτη (Εικόνα 7.7) .
6. Για κάθε συστατικό υπολογίζονται οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο συστατικό με βάση τη εξίσωση:

$$RRF = (A_x * C_{is}) / (C_x * A_{is}) \quad (7-1)$$



Όπου :

RRF = Σχετικό συντελεστής απόκρισης

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

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

C_x = Συγκέντρωση του συστατικού που μετριέται (ng/μl)

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

7. Αναγνωρίζεται ο κάθε αναλύτης βασιζόμενοι στο πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν (Εικόνα 7.8)
8. Ποσοτικοποιείται ο κάθε αναλύτης χρησιμοποιώντας το εσωτερικό πρότυπο. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι αυτό που έχει χρόνο έκλουσης κοντά στον δοσμένο αναλύτη. (Εικόνα 7.9)

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

Εικόνα 7.7: Ταξινόμηση αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης [43]



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

Εικόνα 7.8: Προτεινόμενα ιόντα για τον κάθε αναλυτή στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS [43]



Compound	Reference compound	Compound	Reference compound
n-C10	n-C10	C2-naphthalene	Naphthalene.
n-C11	n-C11	C3-naphthalene	Naphthalene.
n-C12	n-C12	C4-naphthalene	Naphthalene.
n-C13	n-C13	Fluorene	Fluorene.
n-C14	n-C14	C1-fluorene	Fluorene.
n-C15	n-C15	C2-fluorene	Fluorene.
n-C16	n-C16	C3-fluorene	Fluorene.
n-C17	n-C17	Dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Pristane	Pristane	C1-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C18	n-C18	C2-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Phytane	Phytane	C3-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C19	n-C19	Phenanthrene	Phenanthrene.
n-C20	n-C20	Anthracene	Anthracene.
n-C21	n-C21	C1-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C22	n-C22	C2-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C23	n-C23	C3-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C24	n-C24	Fluoranthene	Fluoranthene.
n-C25	n-C25	Pyrene	Pyrene.
n-C26	n-C26	C1-pyrene	Pyrene.
n-C27	n-C27	C2-pyrene	Pyrene.
n-C28	n-C28	Chrysene	Chrysene.
n-C29	n-C29	C1-chrysene	Chrysene.
n-C30	n-C30	C2-chrysene	Chrysene.
n-C31	n-C31	Benzo(b)fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene.
n-C32	n-C32	Benzo(k)fluoranthene	Benzo(k)fluoranthene.
n-C33	n-C33	Benzo(e)pyrene	Benzo(e)pyrene.
n-C34	n-C34	Benzo(a)pyrene	Benzo(a)pyrene.
n-C35 C ₃₀ 17 α ,21 β -hopane	n-C35 C ₃₀ 17 α ,21 β -hopane	Perylene ideno(g,h,i)pyrene	Perylene ideno(g,h,i)pyrene.
5 α -androstane	5 α -androstane	Dibenzo(a,h)anthracene	Dibenzo(a,h)anthracene.
C1-naphthalene	Naphthalene	Benzo(1,2,3-cd)perylene	Benzo(1,2,3-cd)perylene.

Εικόνα 7.9: Αναλύτες και συστατικά αναφοράς



8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις αναλύσεις για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν την επεξεργασία των γραφημάτων που έγιναν στον αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας καθώς και τις αναλύσεις MPN και CFUs κατά την εξέλιξη του πειράματος. Όλοι οι υπολογισμοί για την αναγωγή των αποτελεσμάτων και κανονικοποίησης τους ως προ το χοπάνιο, δηλαδή η διάιρεση της ανιχνευόμενης συγκέντρωσης του συστατικού στόχου προς αυτή του χοπανίου, έγιναν σε υπολογιστικά φύλλα Excel για την διευκόλυνση και αυτοματοποίηση της διαδικασίας.

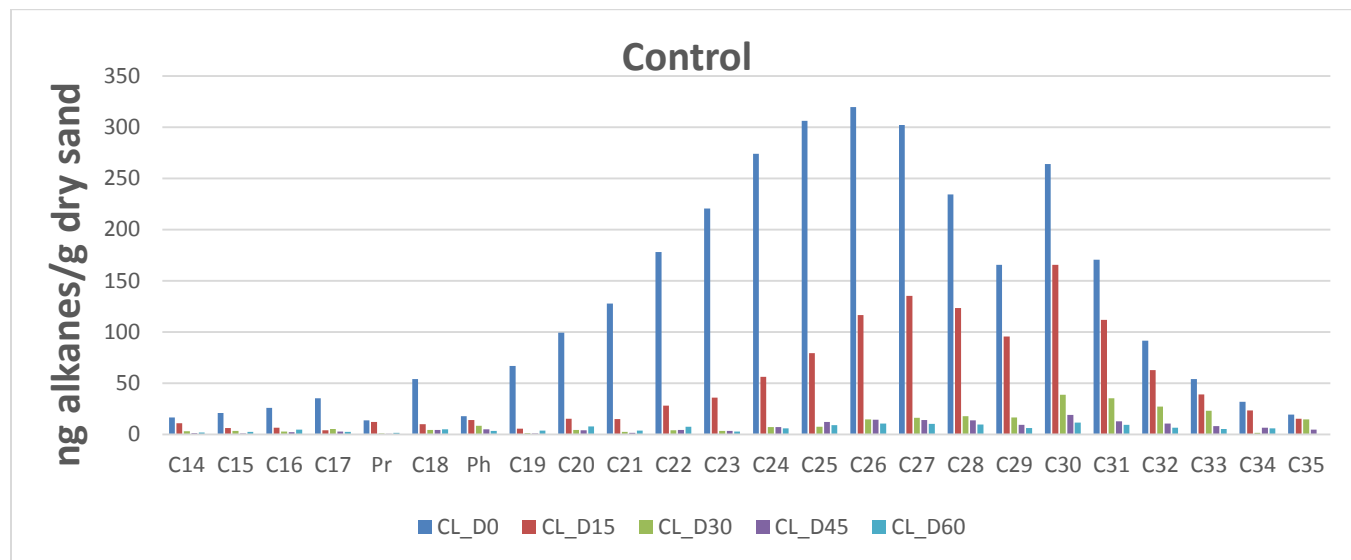
Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο θα εξεταστεί η απόδοση της τεχνικής του Land Farming στην αποδόμηση της ρυπασμένης με IFO-180 άμμου, με την χρήση διαφόρων συνδυασμών λιπασμάτων και επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα αποτελέσματα αυτά θα συγκριθούν τόσο μεταξύ τους όσο και με το δείγμα “μάρτυρα” (*Control*). Τα εξεταζόμενα δείγματα θα ονομαστούν με βάση τα ακρωνύμια τους σε : *AL, ALB, ANL, ANLB, B36L και B36LB*.

8.1 Δείγμα “Μάρτυρας” - Control

Το δείγμα αυτό αποτελεί το μέτρο σύγκρισης για τα υπόλοιπα καθώς είναι το μόνο στο οποίο δεν έγινε καμία προσθήκη λιπάσματος ή επιφανειοδραστικής ουσίας. Η μόνη παρέμβαση ήταν η τακτική ανάδευση του χώματος, καθώς και η προσθήκη απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού.



8.1.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος Control

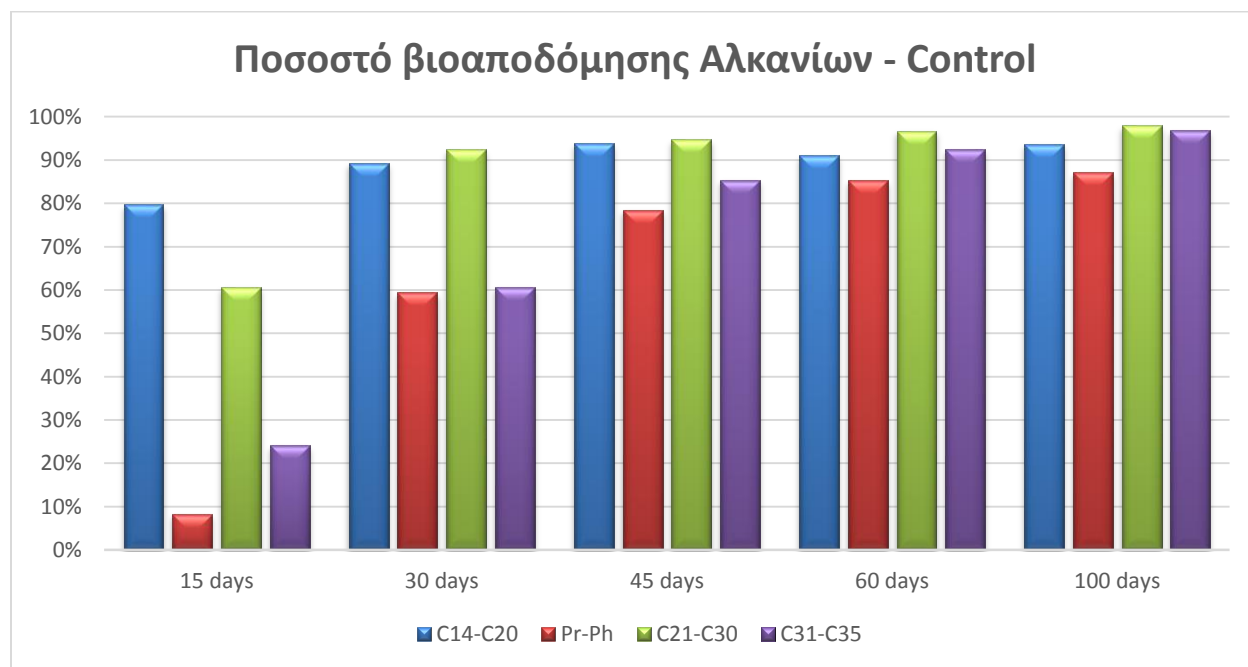


Εικόνα 8.1: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου . Δείγμα Control Days 0-100

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.1) απεικονίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των αλκανίων και ισοπρενοειδών κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο ανά γραμμάριο άμμου στο δείγμα ελέγχου για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας (0, 20, 45, 60 και 100).

Αρχικά, παρατηρώντας το διάγραμμα είναι εμφανές ότι το υπό εξέταση πετρέλαιο περιέχει κυρίως μεγάλες συγκεντρώσεις σε συστατικά μετρίου μοριακού βάρους (C20-C30) παρά σε ελαφρύτερα (C14-C17) και σε πολύ βαριά (C31-C35).

Παρά την μη προσθήκη θρεπτικών συστατικών η δράση των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του πετρελαίου λαμβάνει χώρα. Η μεγαλύτερη ποσότητα όλων των συστατικών απομακρύνεται στις πρώτες 15 ημέρες βλέποντας το ύψος της μπλε γραμμής συγκρινόμενο με αυτό της κόκκινης που αντιπροσωπεύει την δειγματοληψία των 15 ημερών. Παρόλα αυτά η αποδόμηση τους φαίνεται να συνεχίζεται μέχρι και τις 60 ημέρες σχεδόν για όλα τα συστατικά. Αναλυτικότερα οι παρατηρήσεις αυτές εμφανίζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 8.2).



Εικόνα 8.2: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος Control.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ο βαθμός της βιοαποδόμησης του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος Control χωρισμένα σε 4 κατηγορίες: τα ελαφριά (C14-C20), τα μετρίου (C21-C30) και μεγάλου μοριακού βάρους (C31-C35) αλκάνια καθώς και τα ισοπρενοειδή Pr-Ph σε σχέση με την αρχική τους συγκέντρωση.

Όσον αφορά τα ελαφρύτερα συστατικά (C14-C20) φαίνεται ότι πολύ μεγάλο ποσοστό αποδόμησης ίσο με 80% έχει επιτευχθεί στο πέρασμα των πρώτων 15 ημερών. Η αποδόμηση τους συνεχίζεται με μικρότερους ρυθμούς όπου σταθεροποιείται στις 45 ημέρες περίπου φτάνοντας το ποσοστό ίσο με 94%. Για τα μετρίου βάρους συστατικά (C21-C30) παρατηρείται ανάλογο αποτέλεσμα όπου στις 15 ημέρες έχει απομακρυνθεί περίπου 60%, ενώ στο τέλος του πειράματος η απομάκρυνση φτάνει το 98%.

Τα ισοπρενοειδή από την άλλη, δεν εμφανίζουν πολύ μεγάλη απομάκρυνση στην μέτρηση των 15 ημερών (8%). Παρόλα αυτά η ενεργοποίηση των μικροοργανισμών φαίνεται να ξεκινά την 30^η ημέρα με ποσοστό απομάκρυνσης 60%. Η βιοαποδόμηση τους αυξάνεται στην επόμενη δειγματοληψία των 45 ημερών όπου παραμένει πρακτικά σταθερή με τελικό ποσοστό απομάκρυνσης 87%.

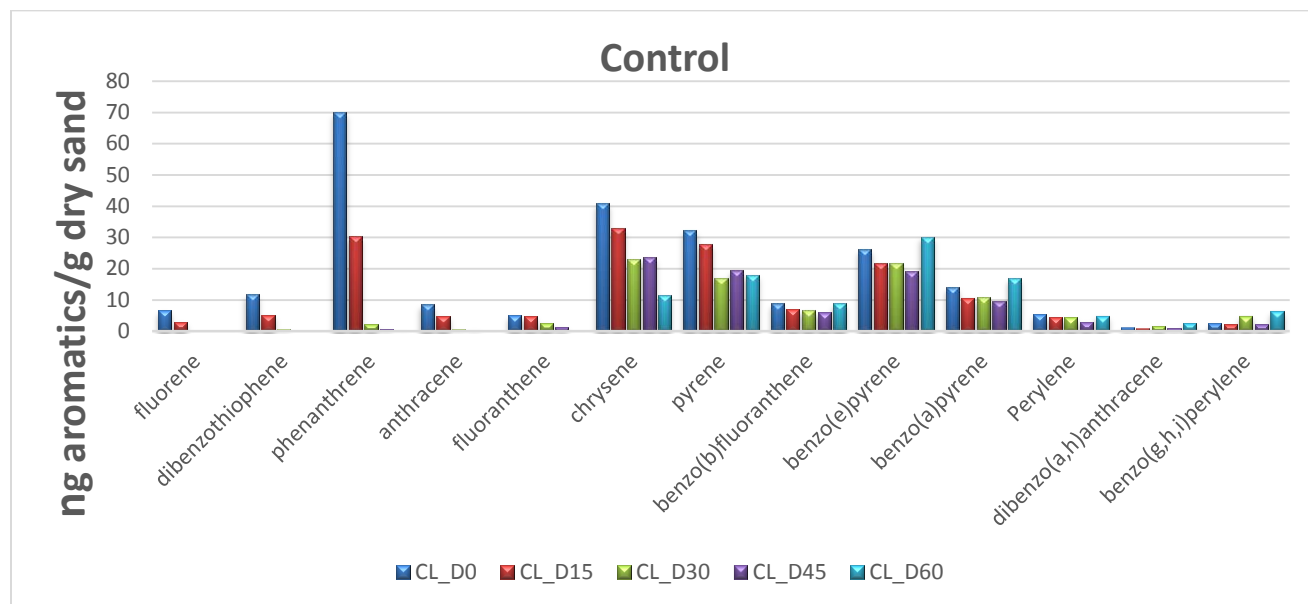
Τέλος τα βαρύτερα αλκάνια (C31-C35) ακολουθούν ανάλογη πορεία με αυτά των ισοπρενοειδών, όπου η βιοαποδόμηση τους στις 15 ημέρες είναι ίση με 24% ενώ αυξάνεται σταδιακά φτάνοντας το 96%.



Στην συνέχεια γίνεται περιγραφή των αποτελεσμάτων που αφορούν το αρωματικό κλάσμα του πετρελαίου.



8.1.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος Control



Εικόνα 8.3: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα Control Days (0-100)

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.3) φαίνεται η συγκέντρωση (κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο) ανά γραμμάριο ξηρής άμμου για κάθε συστατικού του αρωματικού κλάσματος για το δείγμα Control κατά την διάρκεια του πειράματος.

Δεν παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά απομάκρυνσης για όλα τα συστατικά. Τα περισσότερα παραμένουν πρακτικά σταθερά με μικρές μεταβολές που θεωρούνται αμελητέες. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του φαινανθρενίου (Phenanthrene) η απομάκρυνση που λαμβάνει χώρα είναι της τάξεως του 52% στις πρώτες 15 μέρες, η οποία αυξάνεται μέχρι την τελευταία δειγματοληψία στο 98%. Ανάλογα ποσοστά, περίπου ίσα με 50% υπάρχουν και για τα Fluorene και Dibenzothiophene για τις πρώτες 15 ημέρες. Τα χρυσένιο (Chrysene) και πυρένιο (Pyrene) ακολουθούν πιο ομαλή μείωση της τάξεως του 45% και 47% αντίστοιχα η οποία φαίνεται να σταθεροποιείται στην μέτρηση των 30 ημερών.

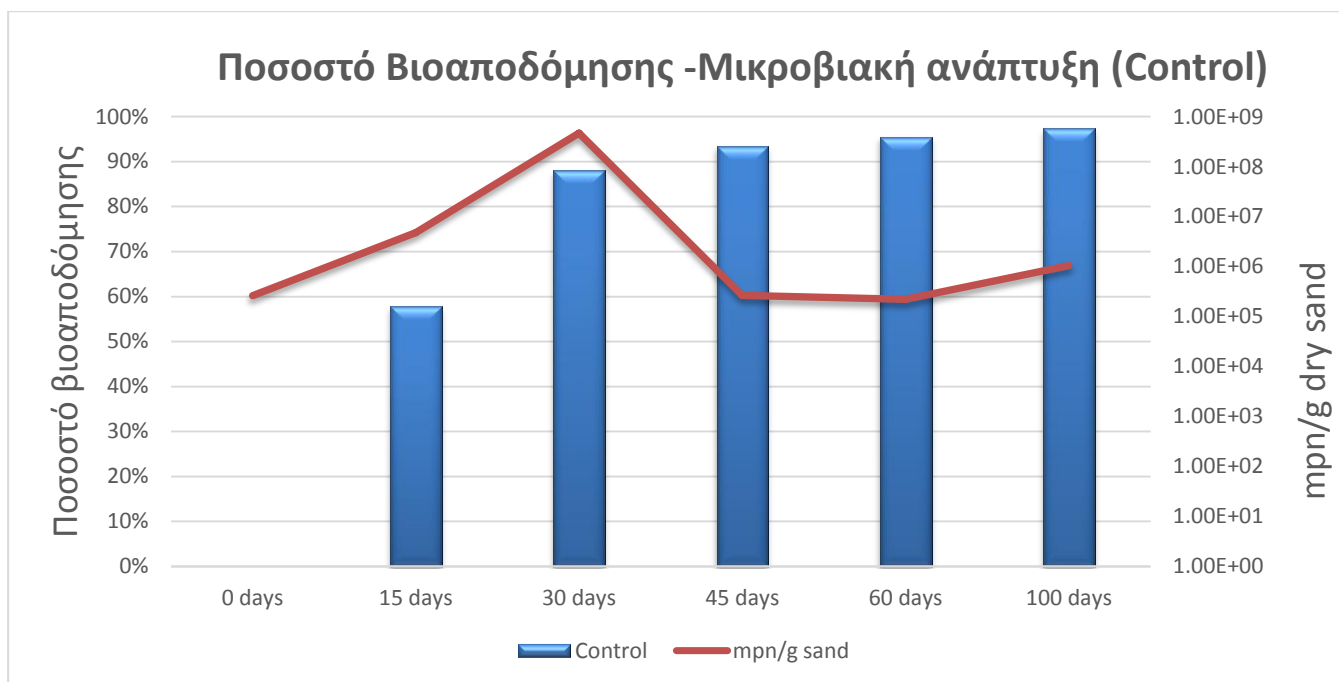
8.1.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος Control

Εισάγοντας τα δεδομένα που λήφθηκαν κατά την διαδικασία προσδιορισμού MPN και τη χρήση του προγράμματος της EPA, σε φύλλο Excel με έκφρασης τους ανά γραμμάριο ξηρής άμμου μπορεί να γίνει σύγκριση της ποσοστιαίας αποδόμησης του πετρελαίου σε συνάρτηση με τον



μικροβιακό πληθυσμό που το αποδομεί. Το συνδυαστικό αυτό διάγραμμα παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 8.4), όπου η κόκκινη γραμμή που αντιπροσωπεύει τον μικροβιακό πληθυσμό βρίσκεται σε λογαριθμική κλίμακα.

Παρατηρείται ότι η βιοαποδόμηση αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού μέχρι την 30^η ημέρα. Στην συνέχεια, όπως είναι φυσικό η μείωση του πληθυσμού έχει σαν αποτέλεσμα ο ρυθμός αποδόμησης να παραμένει σχεδόν σταθερός. Ο μικροβιακός πληθυσμός κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης του αυξάνεται κατά 2000 φορές μέχρι τις 30 ημέρες. Στην συνέχεια στην μέτρηση των 45 ημερών μειώνεται στα αρχικά επίπεδα όπου και παραμένει σχεδόν σταθερός παρουσιάζοντας μικρή αύξηση στο τέλος.



Εικόνα 8.4: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα Control

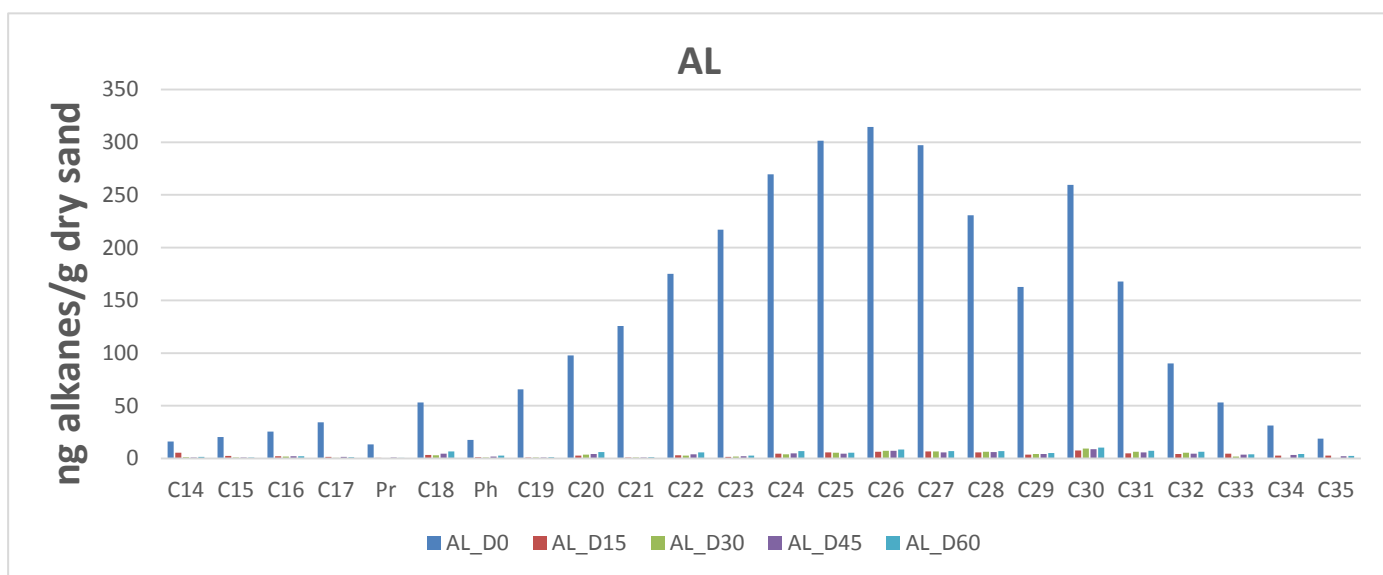


Για τα επόμενα δείγματα δεν πραγματοποιήθηκαν χημικές αναλύσεις για την αρχική ημέρα (Day 0) και συνεπώς σε κάθε δείγμα για Day 0 χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα του δείγματος μάρτυρα – Control.

8.2 Δείγμα [“ΑΓΡΟΣΥΝ” + Λεκιθίνη] ⇔ (AL)

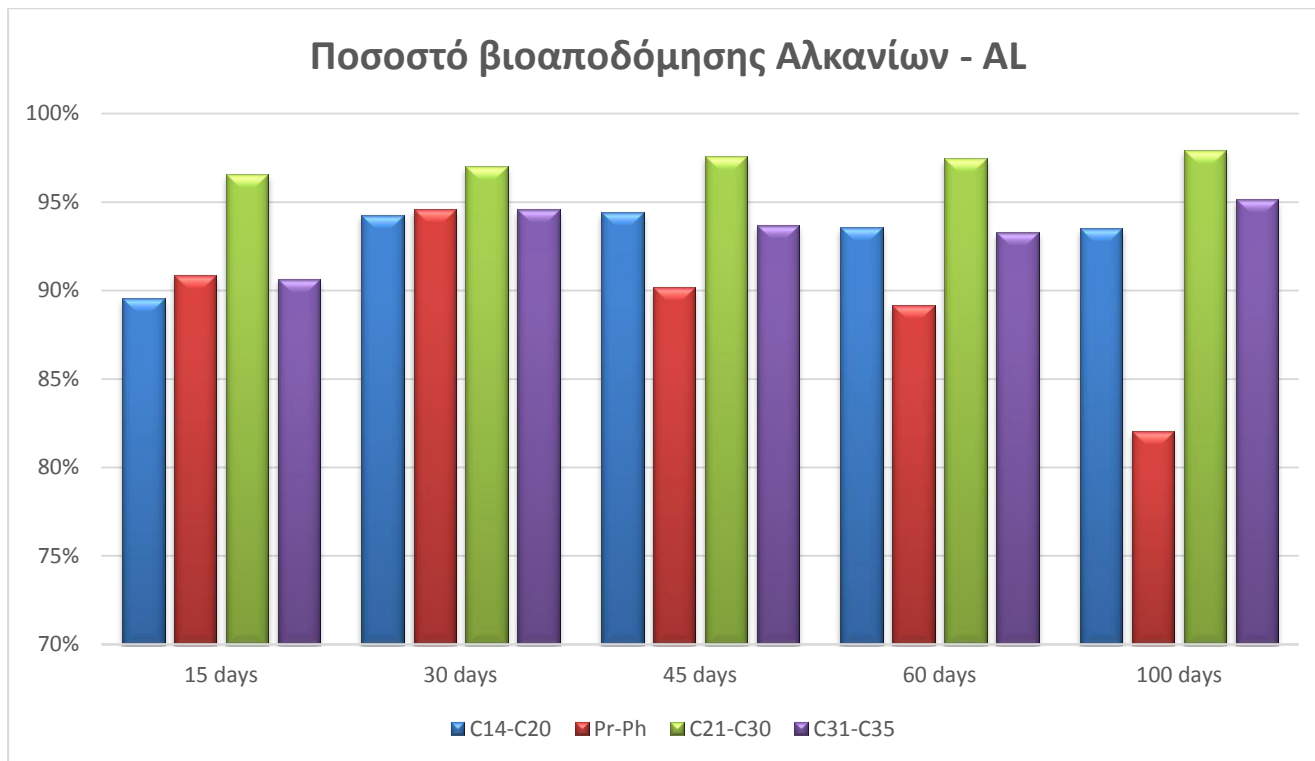
Στο δείγμα αυτό έγινε η προσθήκη φυσικού λιπάσματος από κοπριά πουλερικών “ΑΓΡΟΣΥΝ” σε συνδυασμό με λεκιθίνη σόγιας που λειτουργεί ως επιφανειοδραστική ουσία.

8.2.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος AL



Εικόνα 8.5: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου Δείγμα AL - Days (0-100)

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 8.5) φαίνεται η δραστική διαφορά του βαθμού αποδόμησης του δείγματος AL σε σχέση με το δείγμα ελέγχου - Control. Επιπλέον, παρατηρούνται πολύ μεγάλες πτώσεις σε όλα τα συστατικά του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου πράγμα που θα αναλυθεί μέσω του διαγράμματος που ακολουθεί.

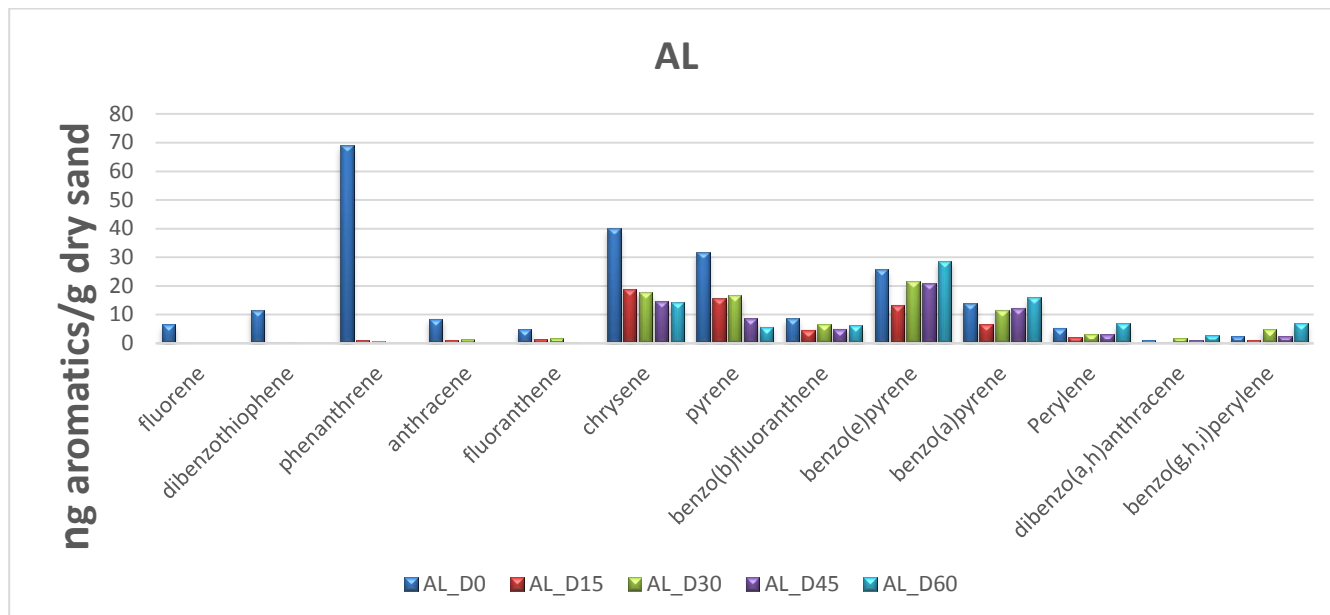


Εικόνα 8.6: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος AL

Σε όλα τα συστατικά του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου παρατηρείται ότι από τις πρώτες 15 ημέρες έχουν επιτευχθεί ποσοστά βιοαποδόμησης πλησίον του 90%. Στην συνέχεια ακολουθεί αύξηση της τάξεως του 5% στην μέτρηση των 30 ημερών. Τα ποσοστά αυτά διατηρούνται πρακτικά σταθερά μέχρι το πέρας των 100 ημερών. Τα συστατικά C21-C30 φαίνεται να υπόκεινται μια πιο άμεση αποδόμηση σε σχέση με τα υπόλοιπα. Η μείωση των Pr-Ph οφείλεται πιθανότατα στην αδυναμία διαχωρισμού των συστατικών κατά την ποσοτικοποίηση του από το γράφημα του φασματογράφου.



8.2.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος AL



Εικόνα 8.7: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα AL Days (0-100)

Στην Εικόνα 8.7 φαίνεται η ποσότητα (κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο) κάθε συστατικού του αρωματικού κλάσματος για το δείγμα AL κατά την διάρκεια του πειράματος.

Σε αυτό το κλάσμα του πετρελαίου παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά βιοαποδόμησης στην πλειοψηφία των συστατικών του. Συγκεκριμένα για τα Fluorene, Dibenzothiophene, Phenanthrene, Anthracene από τις πρώτες 15 ημέρες επιτυγχάνονται ποσοστά βιοαποδόμησης της τάξεως : 94%, 95%, 98% και 78% αντίστοιχα. Ωστόσο το πιο αξιόπιστο αποτελεί το Phenanthrene, καθώς υπάρχει επαρκής ποσότητα στο δείγμα και δεν υπάρχει πιθανότητα σφάλματος της μετρήσεως.

Το Chrysene παρουσιάζει μείωση κατά 53% τις πρώτες 15 ημέρες που αυξάνεται ελάχιστα μέχρι 65% στις 60 ημέρες.

Αναλόγως το Pyrene ξεκινά με 50% στις 15 ημέρες και 30 ημέρες, 71% στις 45 ημέρες καταλήγοντας σε 82% στο πέρας των 60 ημερών .

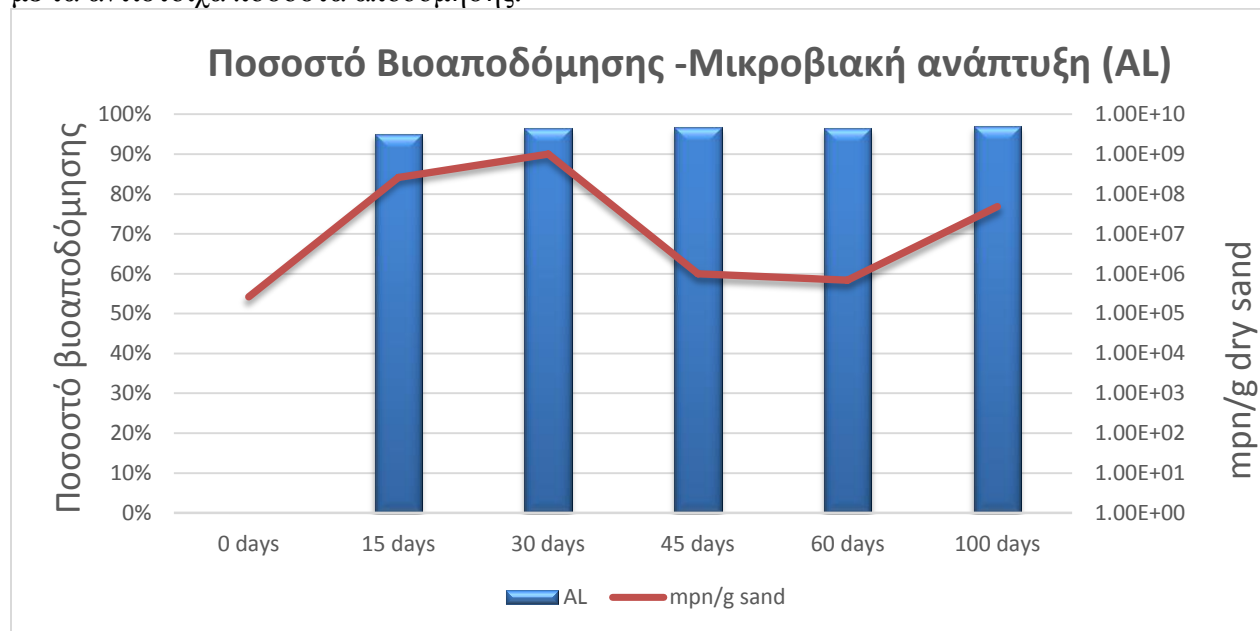
Τα υπόλοιπα συστατικά δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική διαφοροποίηση και παραμένουν σχεδόν σταθερά.

8.2.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος AL

Με έκφραση των αποτελεσμάτων, που λήφθηκαν από την διαδικασία προσδιορισμού MPN και του προγράμματος της EPA, ανά γραμμάριο ξηρής άμμου σε φύλλο Excel προκύπτει το



παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 8.8) όπου είναι δυνατή η συσχέτιση του μικροβιακού πληθυσμού με τα αντίστοιχα ποσοστά αποδόμησης.



Εικόνα 8.8: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα AL

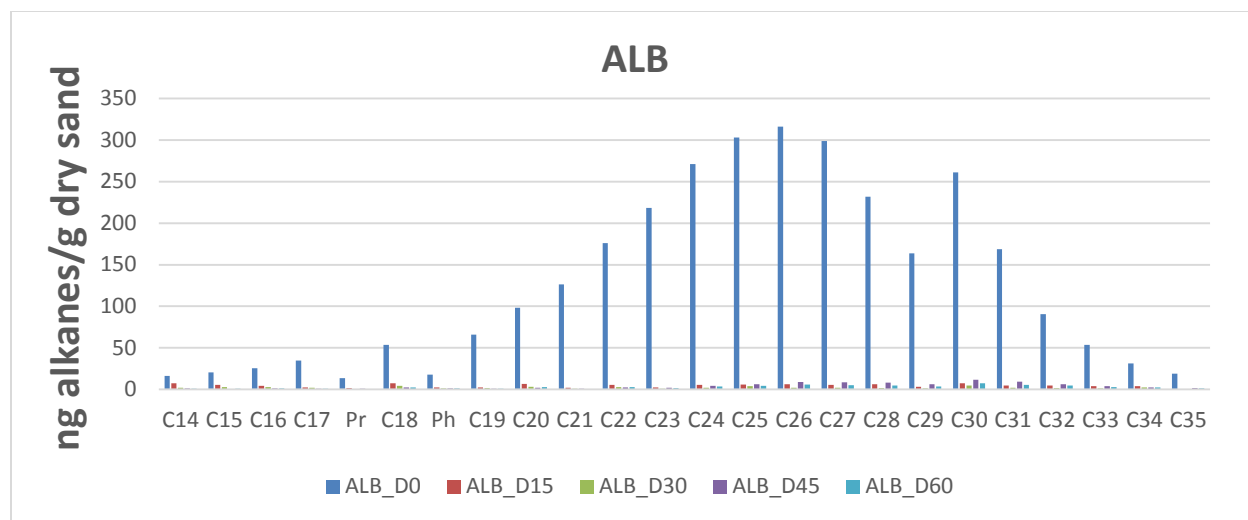
Παρατηρείται ότι κατά κύριο λόγο το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης λαμβάνει χώρα τις πρώτες 15 ημέρες των πειραμάτων και στην συνέχεια παρουσιάζει σταθερά ποσοστά καθώς μειώνεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών. Η ξαφνική ανάκαμψη του πληθυσμού στο πέρας των 60 ημερών πιθανότατα οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί ξεκίνησαν να καταναλώνουν άλλες μορφές υδρογονανθράκων όπως για παράδειγμα μερικά συστατικά του αρωματικού κλάσματος.



8.3 Δείγμα [“ΑΓΡΟΣΥΝ”+ Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (ALB)

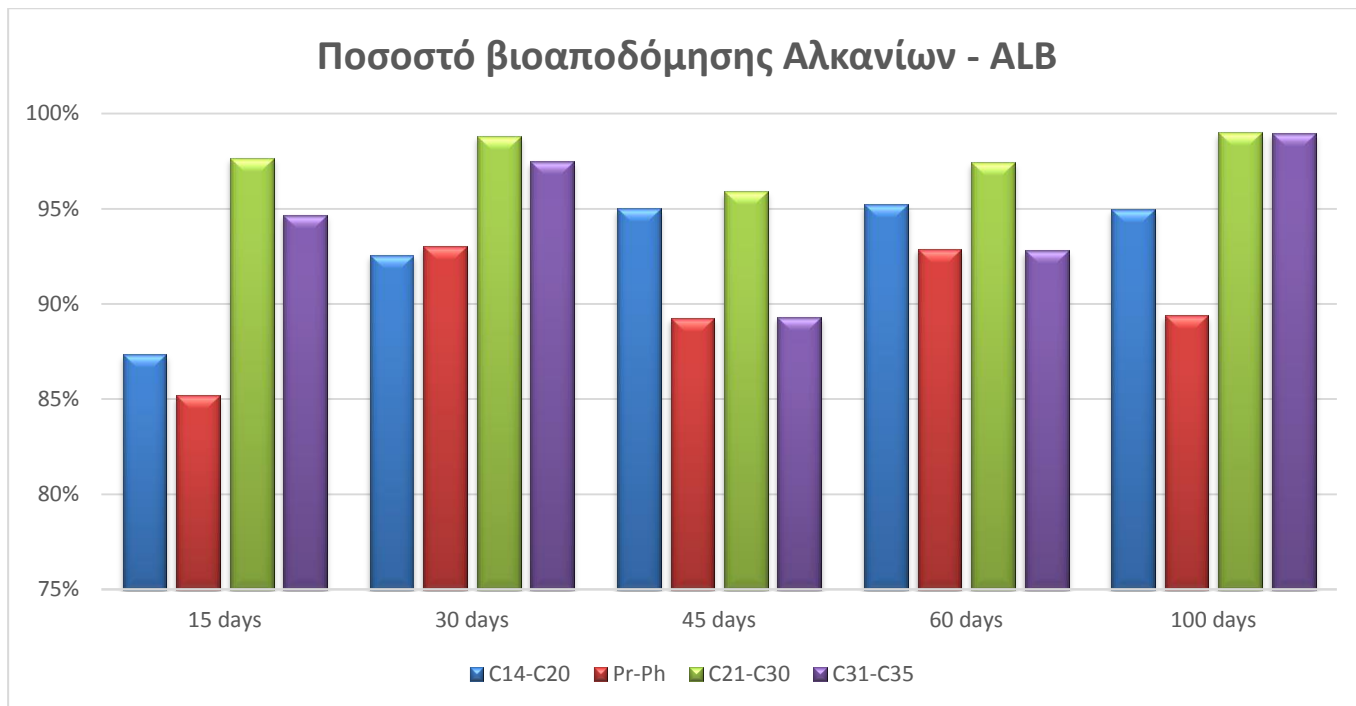
Το δείγμα αυτό αποτελεί βελτίωση του AL με την προσθήκη ενός επιπλέον ειδικά σχεδιασμένου επιφανειοδραστικού μίγματος ουσιών.

8.3.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ALB



Εικόνα 8.9 Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ALB - Days (0-100)

Εδώ και πάλι εμφανής η πολύ μεγάλη μείωση στην συγκέντρωση όλων των συστατικών του κορεσμένου κλάσματος πετρελαίου για το δείγμα ALB. Τα ποσοστά βιοαποδόμησης είναι και σε αυτή την περίπτωση πολύ υψηλά πράγμα που αποδεικνύεται και από το διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 8.10).



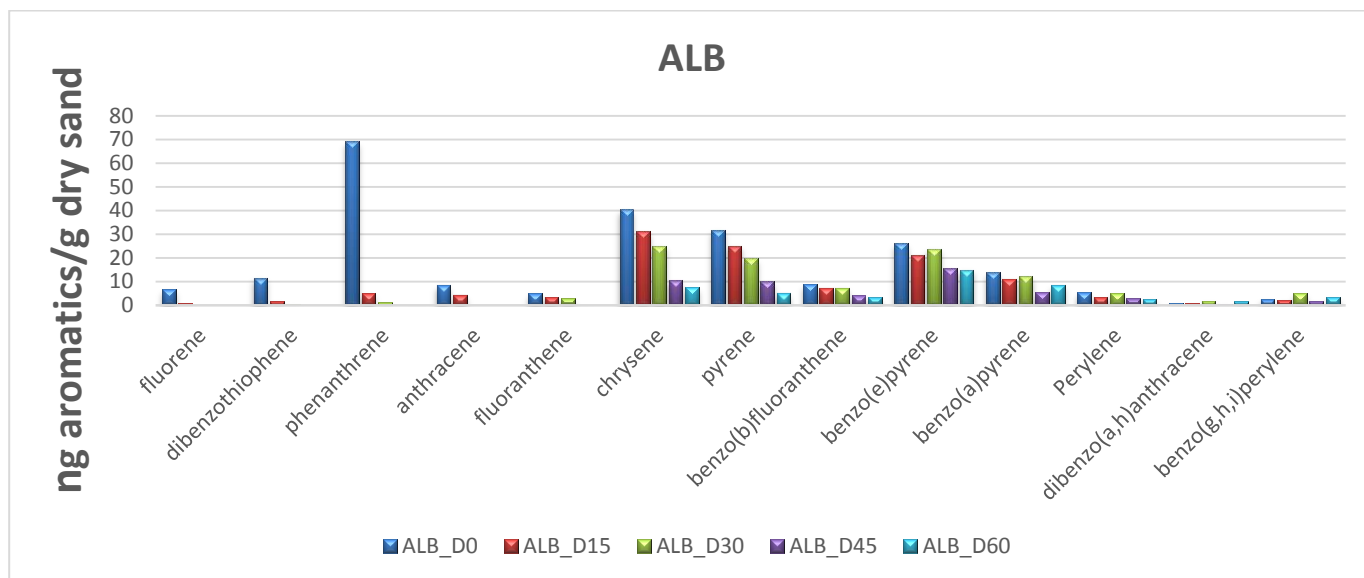
Εικόνα 8.10: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ALB

Παραπάνω φαίνεται (Εικόνα 8.10) ο βαθμός αποδόμησης κάθε κατηγορίας συστατικών του κορεσμένου κλάσματος (ελαφριού, μετρίου και μεγάλου μοριακού βάρους αλκανίων και ισοπρενοειδών) ως προς την αρχική ποσότητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Για όλα τα συστατικά παρατηρούνται αξιοσημείωτα ποσοστά αποδόμησης κυρίως στις 15 ημέρες. Συγκεκριμένα για τα πιο ελαφριά συστατικά (C14-C21) η αποδόμηση ανέρχεται στο 87% αρχικά καταλήγοντας στο 95% την 100^η ημέρα μετρήσεων. Τα μετρίου βάρους (C22-C30) αρχικά αποδομούνται κατά 97% ποσοστό που παραμένει σταθερό μέχρι το τέλος. Τα μεγάλου βάρους (C31-C35) φαίνεται και αυτά παρόλη την ανθεκτικότητά τους να εμφανίζουν ποσοστό έως και 98%. Ανάλογο γεγονός ισχύει και για τα ισοπρενοειδή που αποδομούνται κατά μέσο όρο 88%.



8.3.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ALB

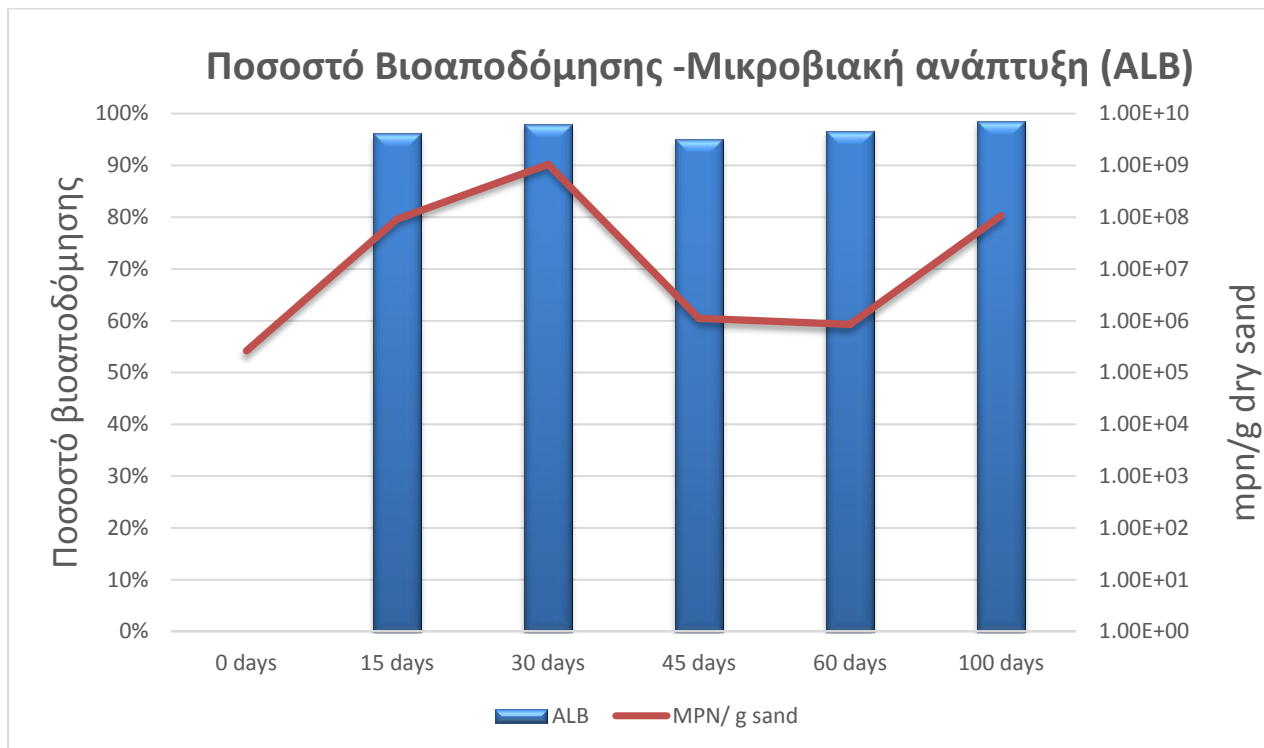


Εικόνα 8.11: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ALB Days (0-100)

Σε αυτή τη περίπτωση και πάλι παρατηρείται αποδόμηση των αρωματικών ενώσεων του πετρελαίου. Πιο συγκεκριμένα για το Phenanthrene στην μέτρηση των 15 ημερών επιτυγχάνεται αποδόμηση 92%. Το Chrysene παρουσιάζει ομαλή αποδόμηση με ποσοστά 13%, 22%, 57% και 70% για τις πρώτες 60 ημέρες. Ανάλογα, το Pyrene αποδομείται σε ποσοστά 21%, 38%, 69% και 83% για τις ημέρες 15, 30, 45 και 60 αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα συστατικά εκτός από κάποιες αμελητέες αυξομειώσεις παραμένουν σταθερά και αμετάβλητα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

8.3.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης- Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ALB

Το διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 8.12) παρουσιάζει τη συσχέτιση του ποσοστού αποδόμησης με τον μικροβιακό πληθυσμό για το δείγμα ALB. Ανάλογο φαινόμενο με αυτό του δείγματος AL παρατηρείται όπου ως επί το πλείστον η βιοαποδόμηση λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια των 15 πρώτων ημερών όπου υπάρχει αυξητική τάση του μικροβιακού πληθυσμού. Στην συνέχεια το ποσοστά αποδόμησης παραμένουν σχεδόν σταθερά καθώς η μεγάλη αρχική μείωση του υποστρώματος έχει πιθανότατα αναδειχθεί σε περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα μέχρι τις 30 ημέρες ο μικροβιακός πληθυσμός αυξάνεται κατά 4000 φορές, ενώ στην πάροδο των δεκαπέντε επόμενων ημερών επανέρχεται στα αρχικά του επίπεδα. Τέλος παρατηρείται επάνοδος του μετά την 60^η ημέρα.



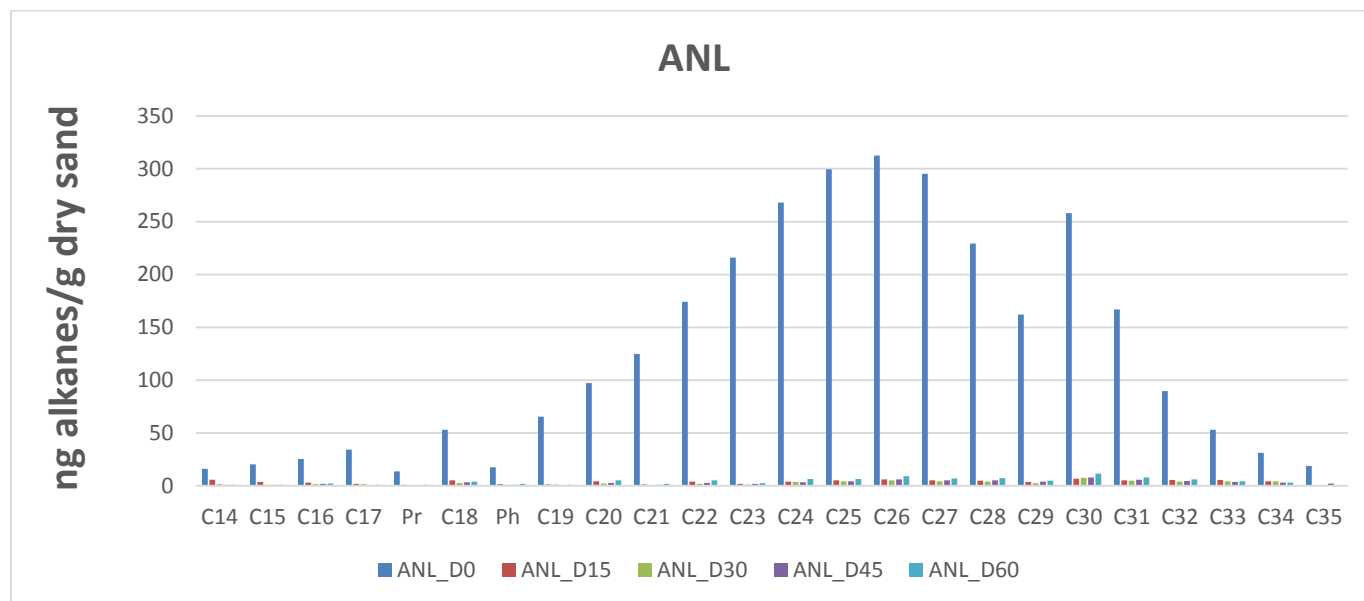
Εικόνα 8.12: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ALB

8.4 Δείγμα [Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη] ⇔ (ANL)

Στο δείγμα αυτό έχει γίνει προσθήκη υγρού οργανικού λιπάσματος Avant Natur σε συνδυασμό με λεκιθίνη σόγιας.

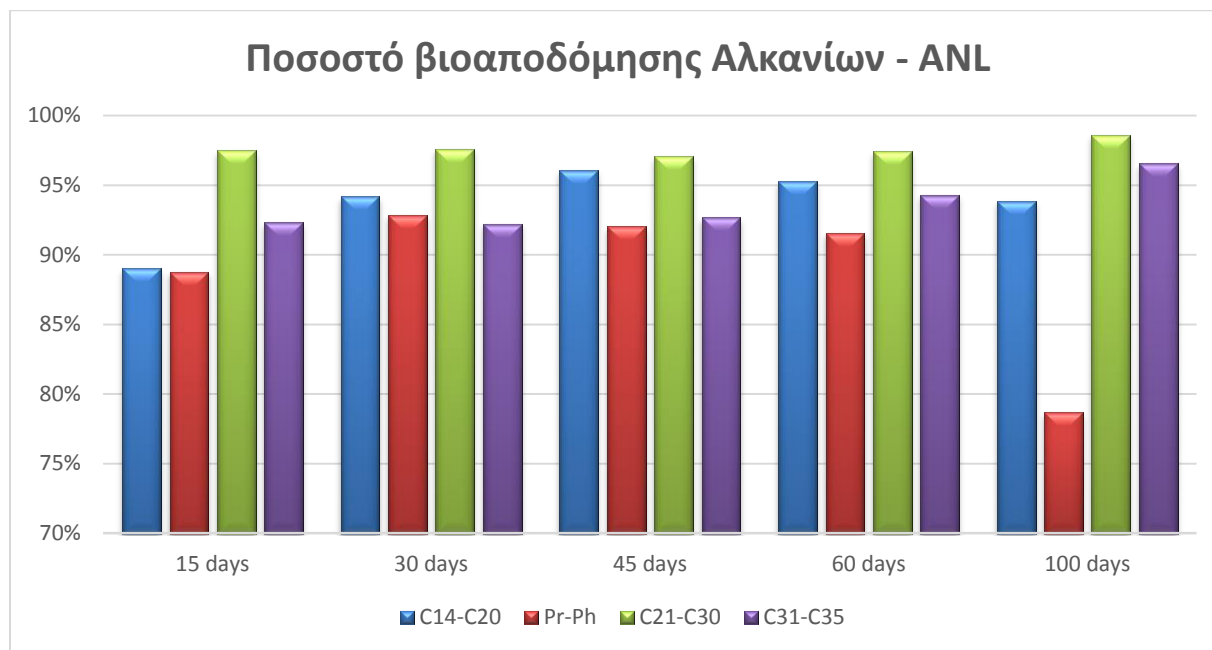


8.4.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ANL



Εικόνα 8.13 Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANL - Days (0-100)

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.13) σε αυτό το δείγμα είναι εμφανής η μεγάλη μείωση της ποσότητας όλων των συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου ακόμα και στα μεγάλα μοριακού βάρους. Για την επιπλέον κατανόηση του παρατίθεται το επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 8.14) όπου γίνεται ομαδοποίηση των συστατικών και του ποσοστού αποδόμησης τους.

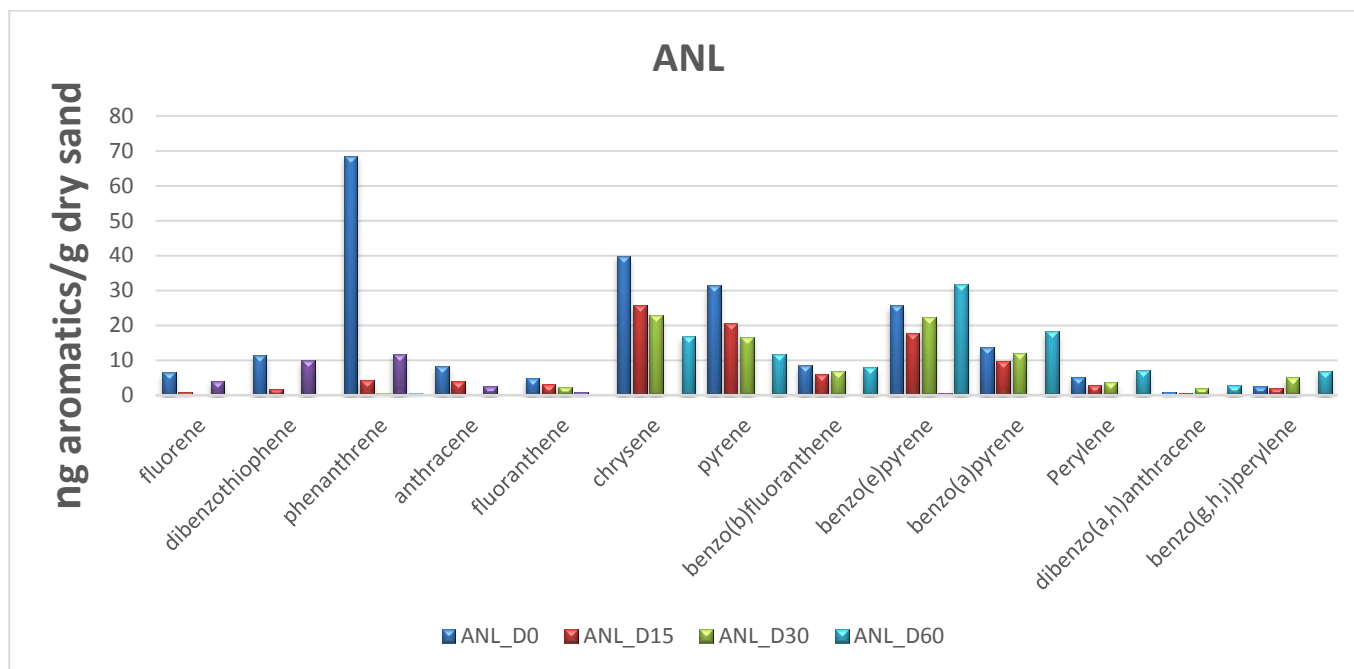


Εικόνα 8.14: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ANL

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.14) παρατηρείται και ότι κατά κύριο λόγο το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης για όλες τις κατηγορίες συστατικών επιτυγχάνεται άμεσα στις πρώτες 15 ημέρες με μικρές αυξήσεις για τα C14-C20 και Pr-Ph. Συγκεκριμένα το μικρού μοριακού βάρους συστατικά (C14-C20) αποδομούνται σε ποσοστό 89%, τα μετρίου μοριακού βάρους (C21-C30) κατά 97%, τα μεγάλου μοριακού βάρους (C31-C35) κατά 92% ενώ τα ισοπρεονειδή (Pr-Ph) αγγίζουν το 89%. Τα ποσοστά αυτά παραμένουν πρακτικά σταθερά μέχρι το πέρας των πειραματικών μετρήσεων.



8.4.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ANL



Εικόνα 8.15: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANL - Days (0-100)

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.15) εμφανίζεται η κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο μεταβολή της ποσότητας των συστατικών του αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου για το δείγμα ANL.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέτρηση του αρωματικού κλάσματος για τις 45 ημέρες του δείγματος ANL είναι πιθανότατα εσφαλμένη καθώς έγινε πρόσμιξη του δείγματος με υπολείμματα της πιπέτας που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά του. Για τον λόγο αυτό δεν συμπεριλαμβάνεται στο παραπάνω διάγραμμα.

Το Phenanthrene παρουσιάζει ποσοστό αποδόμησης ίσο με 88% για την μέτρηση της 15^η ημέρας, ενώ στην συνέχεια φαίνεται η ολοκληρωτική αποδόμηση-απομάκρυνση του. Ανάλογα ποσοστά ισχύουν και για τα Fluorene.

Το Chrysene εμφανίζει ομαλότερο ρυθμό αποδόμησης ξεκινώντας με 35% για τις 15 ημέρες φτάνοντας σε ποσοστό 57% την 60^η ημέρα.

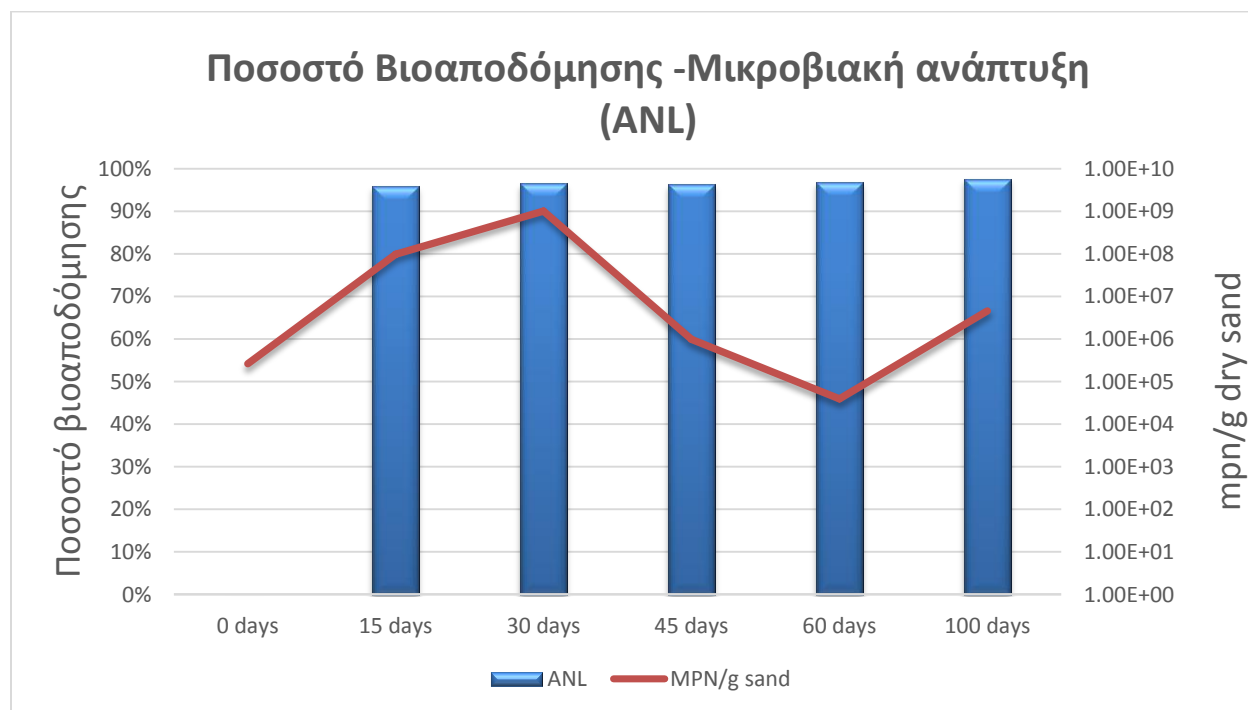
Με ανάλογο τρόπο το Pyrene παρουσιάζει ποσοστά αποδόμησης 35%, 47% και 52% για τις ημέρες δειγματοληψίας 15, 30, και 60 αντίστοιχα.

8.4.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ANL

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 8.16) γίνεται σύγκριση του βαθμού αποδόμησης του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ANL με τον μικροβιακό πληθυσμό του συγκεκριμένου δείγματος σε μονάδες MPN ανά γραμμάριο ξηρής άμμου σε λογαριθμική κλίμακα.



Σε αυτό το δείγμα παρατηρείται η ίδια τάση όπου στο σύνολο της η αποδόμηση λαμβάνει χώρα στις 15 πρώτες ημέρες κατά την εκθετική αύξηση του πληθυσμού, ενώ στην συνέχεια διατηρείται στα ίδια επίπεδα καθώς υπάρχει πτωτική τάση του μικροβιακού φορτίου. Η εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί άνοδο του πληθυσμού κατά περίπου 4000 φορές και στην συνέχεια πτώση του σε μικρότερο από το αρχικό επίπεδο και επάνοδο προς το τέλος των πειραμάτων.



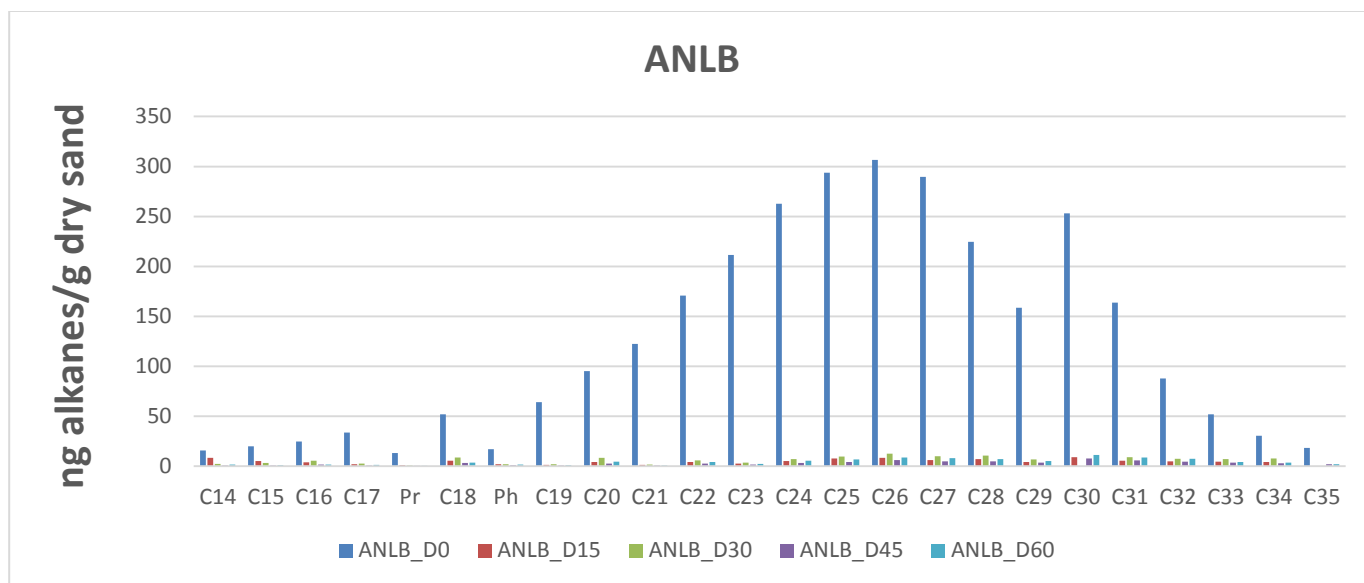
Εικόνα 8.16: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ANL



8.5 Δείγμα [Avant Natur 8-4-6 + Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (ANLB)

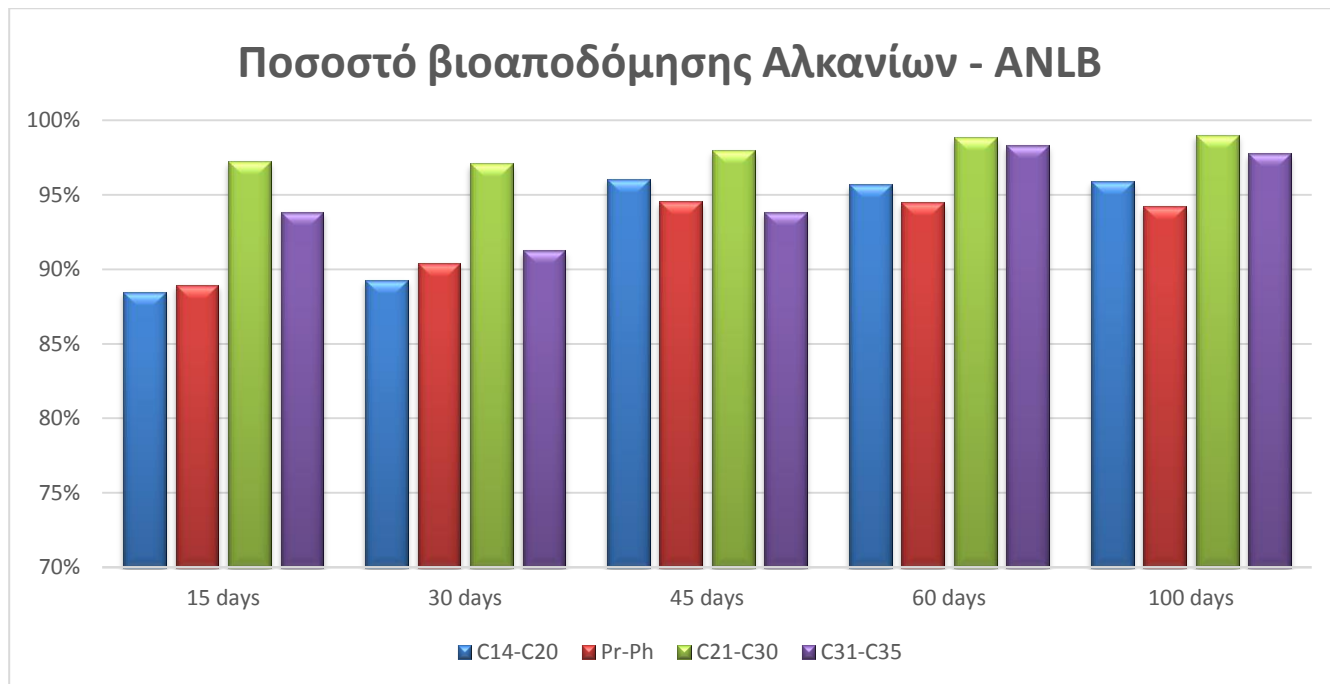
Το δείγμα αυτό είναι πανομοιότυπο με το προηγούμενο (ANL) με εξαίρεση την προσθήκη ενός επιπλέον ειδικά σχεδιασμένου επιφανειοδραστικού μίγματος ουσιών, Oil Be Gone.

8.5.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος ANLB



Εικόνα 8.17: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANLB - Days (0-100)

Στην Εικόνα 8.17 απεικονίζεται η μεταβολή της ποσότητας των αλκανίων και ισοπρενοειδών κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο για το δείγμα ANLB για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας (0, 20, 45, 60 και 100). Η μεγάλη μείωση είναι εμφανής για όλα τα συστατικά του κορεσμένου κλάσματος. Η ποσοστιαία μείωση ανά κατηγορία ουσιών παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 8.18).

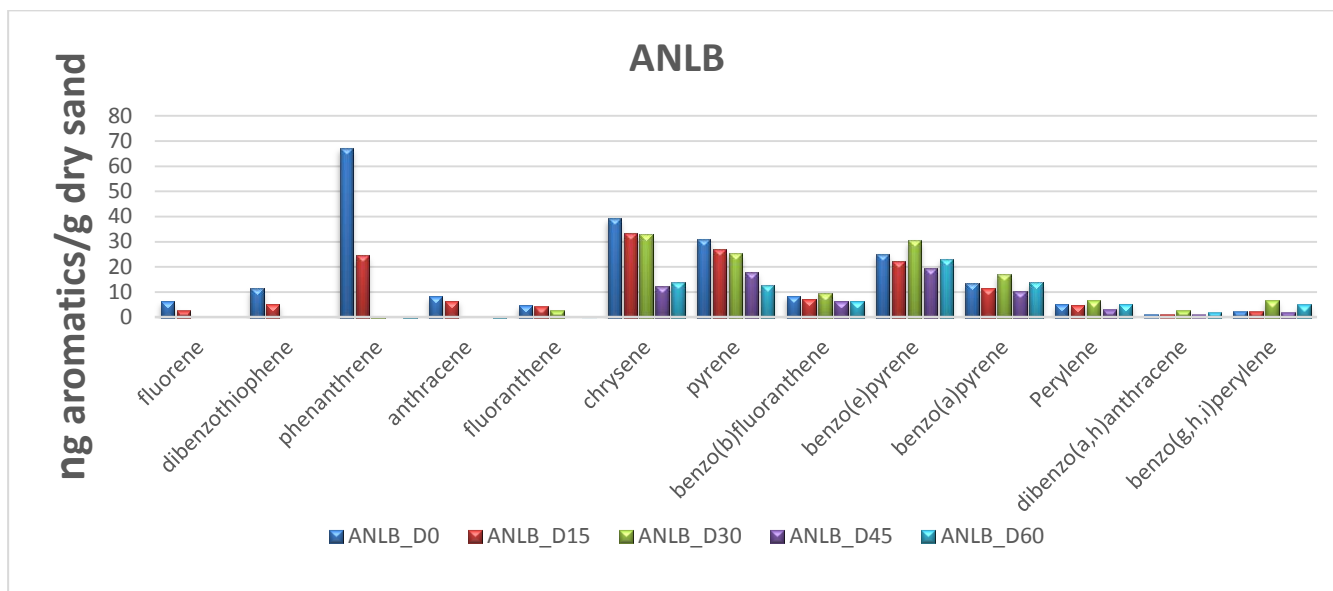


Εικόνα 8.18: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος ANLB

Όλα τα συστατικά υπόκεινται σε αποδόμηση κατά κύριο λόγο τις πρώτες 15 ημέρες με τα ελαφριά συστατικά (C14-C20) σε ποσοστό 88% και φτάνοντας το 96%, τα μετρίου βάρους (C21-30) σε ποσοστό 97% μέχρι και 99%, τα μεγάλου βάρους (C31-C35) σε ποσοστό 93% φτάνοντας το 98% και τέλος τα ισοπρενοειδή με ποσοστό 89% φτάνοντας το 94% κατά την τελευταία πειραματική μέτρηση. Είναι εμφανής η γρηγορότερη αποδόμηση των Pr-Ph.



8.5.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος ANLB



Εικόνα 8.19: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα ANLB - Days (0-100)

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.19) εμφανίζεται η κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο μεταβολή της συγκέντρωσης των συστατικών του αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου για το δείγμα ANLB σε όλη την διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων.

Το αρωματικό κλάσμα του πετρελαίου φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση να υπόκειται ορισμένη αποδόμηση άλλα όχι σε τόσο μεγάλη έκταση όπως εκείνη που εμφανίστηκε στο κορεσμένο κλάσμα.

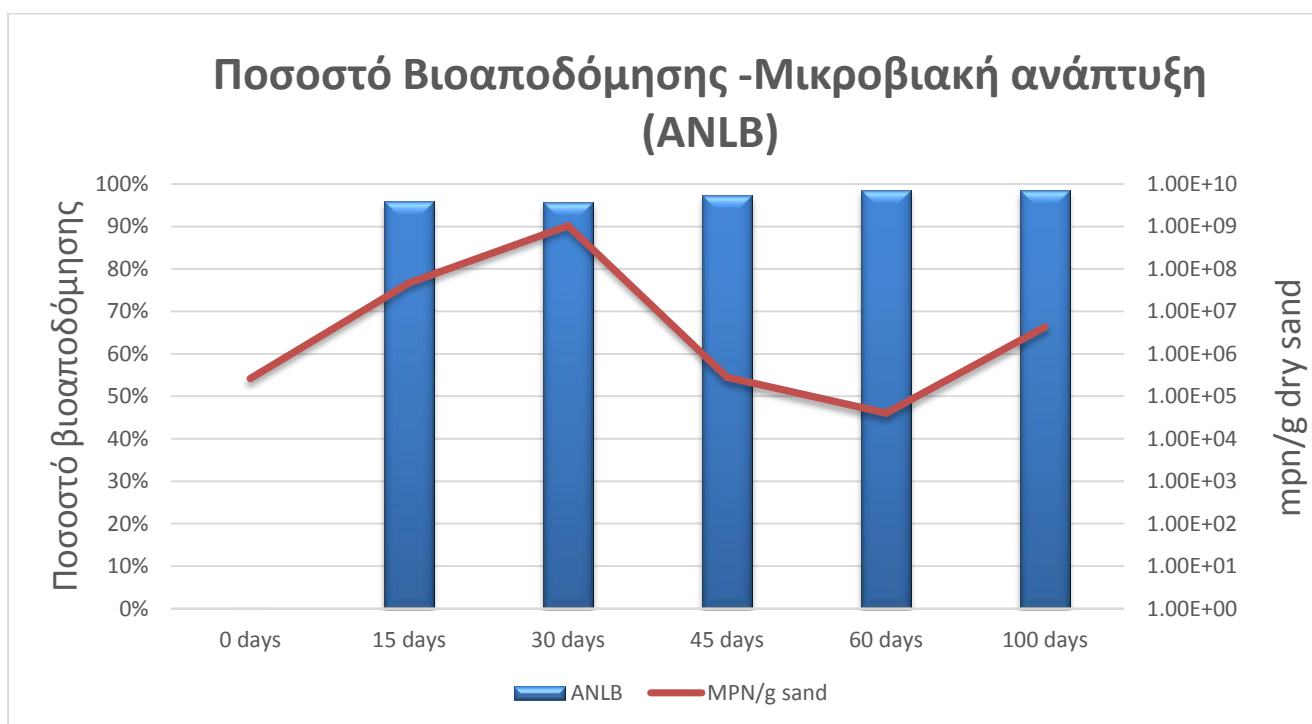
Το Phenanthrene μειώνεται κατά 58% στις πρώτες 15 ημέρες. Επιπλέον το Chrysene ακολουθεί μειώσεις της τάξεως του 14%, 17% για την 15^η και 30^η ημέρα αντίστοιχα, ενώ παραμένει κατά μέσο όρο στο 65% για τις υπόλοιπες ημέρες. Ακόμα το Pyrene εμφανίζει μείωση την 15^η ημέρα 12% η οποία αυξάνεται σε 18%, 41% και 58% στις επόμενες πειραματικές μετρήσεις. Τα υπόλοιπα συστατικά παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα με ορισμένες αυξομειώσεις.

8.5.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος ANLB

Με έκφραση και πάλι των αποτελεσμάτων, που λήφθηκαν από την διαδικασία προσδιορισμού MPN και του προγράμματος της EPA, ανά γραμμάριο ξηρής άμμου σε φύλλο Excel προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα όπου είναι δυνατή η συσχέτιση του μικροβιακού πληθυσμού με τα



αντίστοιχα ποσοστά αποδόμησης για το δείγμα ANLB. Όπως και με τα υπόλοιπα δείγματα η αποδόμηση φθάνει το ποσοστό του 96% κατά τις πρώτες ημέρες όπου υπάρχει αύξηση του μικροβιακού φορτίου. Στην συνέχεια το ποσοστό αυτό παραμένει σταθερό με μικρή αύξηση προς το τέλος όπου ο πληθυσμός ανακάμπτει. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μικροβιακός πληθυσμός παρουσίασε πανομοιότυπο ρυθμό αύξησης με αυτό του δείγματος ANL γεγονός που επικυρώνει την πανομοιότυπη σύσταση σε θρεπτικά των δειγμάτων αυτών.



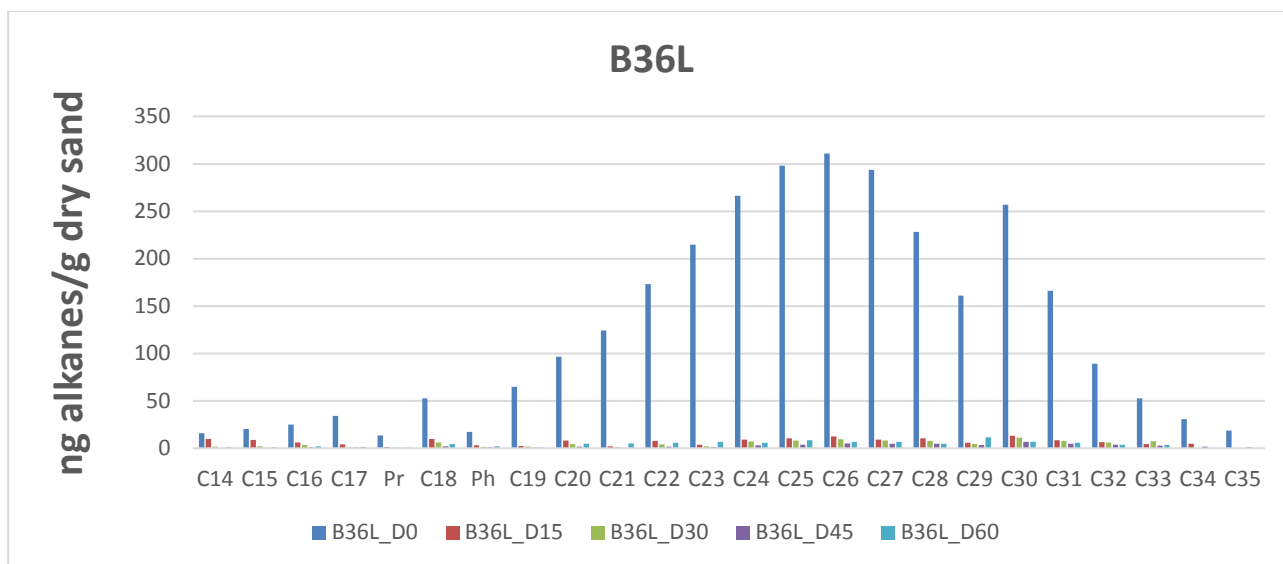
Εικόνα 8.20: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα ANLB



8.6 Δείγμα [Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη] ⇔ (B36L)

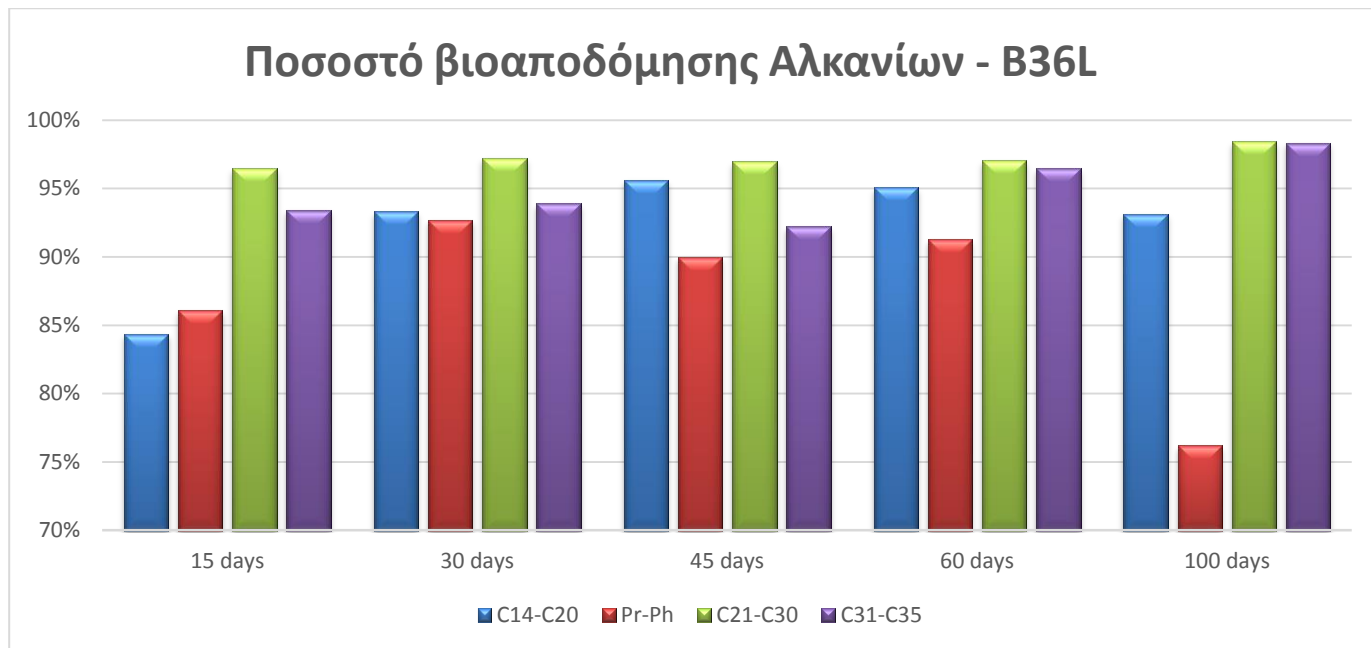
Το δείγμα αυτό αποτελεί συνδυασμό του υγρού λιπάσματος Besfoliar 36 Extra μαζί με την λεκιθίνη σόγιας.

8.6.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος B36L



Εικόνα 8.21: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36L - Days (0-100)

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.21) στο δείγμα B36L είναι εμφανής η μεγάλη μείωση της ποσότητας όλων των συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου σε όλο το εύρος του μοριακού βάρους τους. Για επιπλέον ανάλυση δημιουργείται το επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 8.22) όπου γίνεται ομαδοποίηση των συστατικών και καταγραφή του ποσοστού αποδόμησης τους.

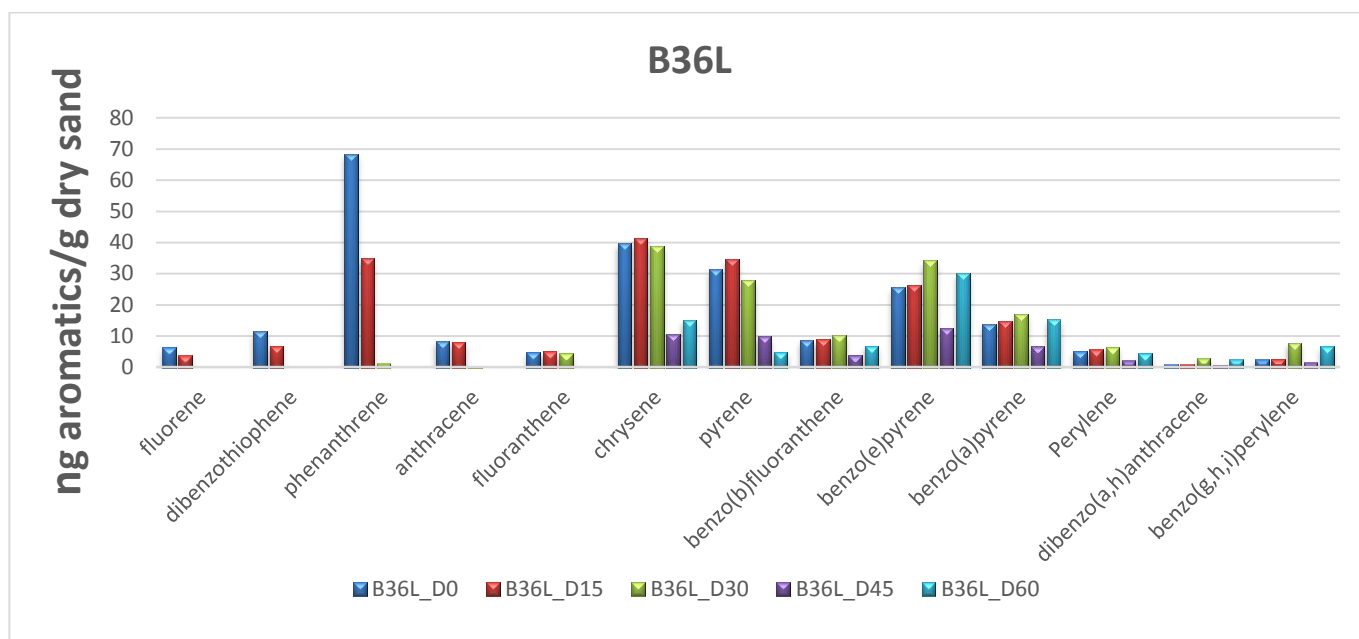


Εικόνα 8.22: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος B36L

Είναι εμφανές ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης συμβαίνουν στις 15 ημέρες και έπειτα ακολουθούν ελαφρώς αυξανόμενη η σταθερή πορεία. Συγκεκριμένα τα μικρού μοριακού βάρους (C14-C20) αποδομούνται σε ποσοστό 84% φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στις 60 ημέρες με ποσοστό 95%, τα μετρίου μοριακού βάρους (C21-C30) κατά 97% που παραμένει σχεδόν σταθερό και τα μεγάλου μοριακού βάρους (C31-C35) κατά 93% που αυξάνεται έως 98%. Τα ισοπρενοειδή (Pr-Ph) μειώνονται κατά 86% μέχρι και 98% στην 60^η ημέρα. Η μέτρηση των 100 ημερών μπορεί να θεωρηθεί εσφαλμένη καθώς φαίνεται να ανιχνεύεται μεγαλύτερη ποσότητα τους σε σχέση με την μέτρηση των 15 ημερών.



8.6.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος B36L



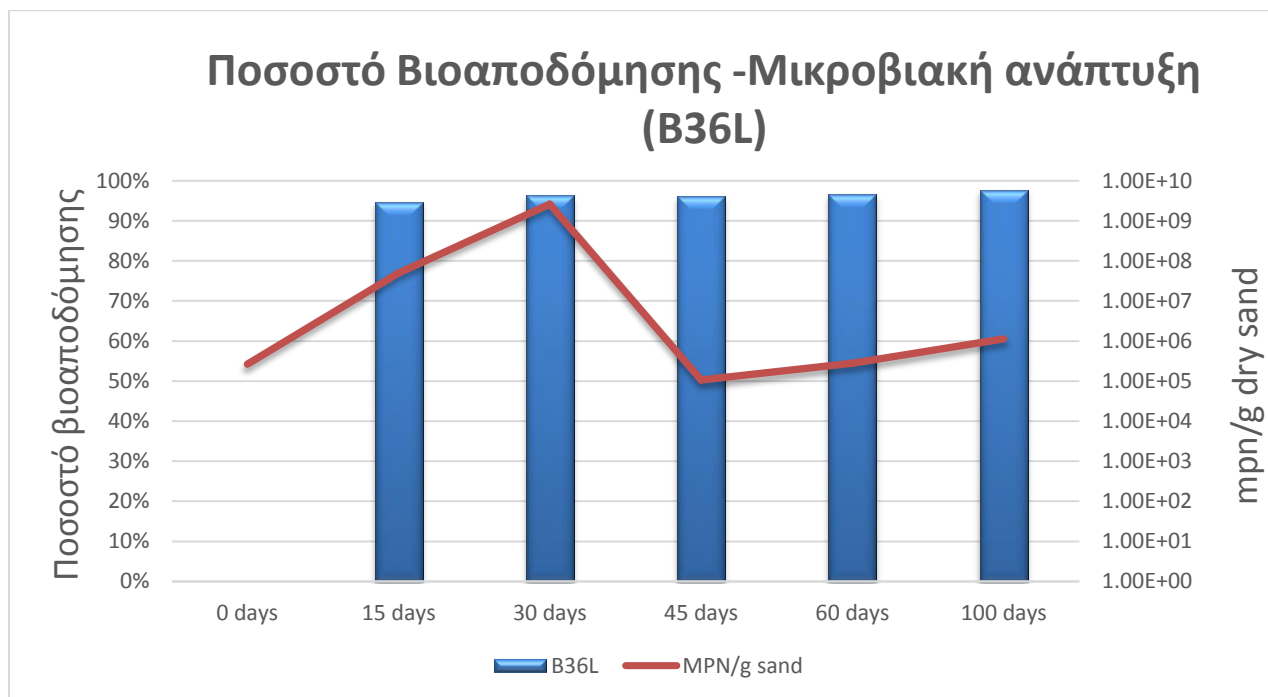
Εικόνα 8.23: : Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36L - Days (0-100)



Σε γενικές γραμμές σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8.23) φαίνεται να υπόκεινται σε αποδόμηση τα αρωματικά συστατικά του δείγματος. Αρχικά τα Fluorene, Dibenzoehtiorphene και Phenanthrene αποδομούνται κατά 44%, 42% και 50% τις πρώτες 15 ημέρες ενώ στις επόμενες μετρήσεις δεν ανιχνεύονται καθόλου, πιθανότατα λόγω φυσικής απομάκρυνσης τους. Το Chrysene κατά τις πρώτες 30 ημέρες δεν εμφανίζει καμία αποδόμηση, αντιθέτως παρατηρείται μείωση του κατά 65% που παραμένει σταθερή μέχρι την μέτρηση των 60 ημερών. Επιπρόσθετα παρατηρείται για το Pyrene, που αν εξαιρεθούν η μικρή αύξηση την 15^η ημέρα, η αποδόμηση του φαίνεται να ξεκινά την 30^η σε ποσοστό μείωσης 68% που συνεχίζει να αυξάνεται σε 84% για τη μέτρηση των 60 ημερών.

8.6.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος B36L

Το μεγαλύτερο ποσοστό των συστατικών του πετρελαίου αποδομείται κατά την φάση της εκθετικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών που όπως φαίνεται (Εικόνα 8.24) κορυφώνεται στις αναλύσεις που έγιναν την 30^η ημέρα, με βάση τις οποίες το μικροβιακό φορτίο αυξάνεται έως και 10,000 φορές. Στην συνέχεια το ποσοστό αποδόμησης παραμένει σταθερό στο υψηλό ποσοστό του 95% κατά μέσο όρο όπου και ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αρχίζει να μειώνεται. Όπως φαίνεται η επάνοδος του μικροβιακού πληθυσμού γίνεται μετά το πέρας των 45 ημερών, πιθανότατα λόγω ανάπτυξης της ικανότητας του να καταναλώνει άλλου είδους πηγές άνθρακα όπως ορισμένα βαρύτερα συστατικά του πετρελαίου που είναι πιο δύσκολο να αποδομηθούν είτε συστατικά του αρωματικού κλάσματος.



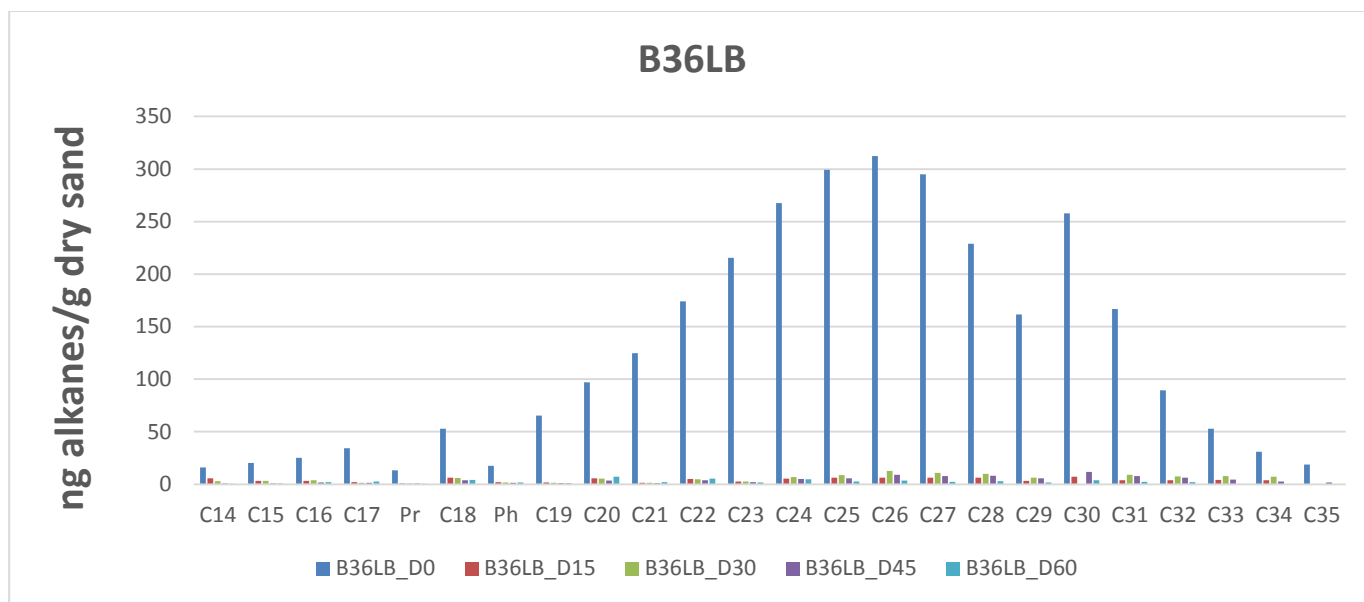
Εικόνα 8.24: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα B36L



8.7 Δείγμα [Besfoliar 36 Extra + Λεκιθίνη + Oil Be Gone] ⇔ (B36LB)

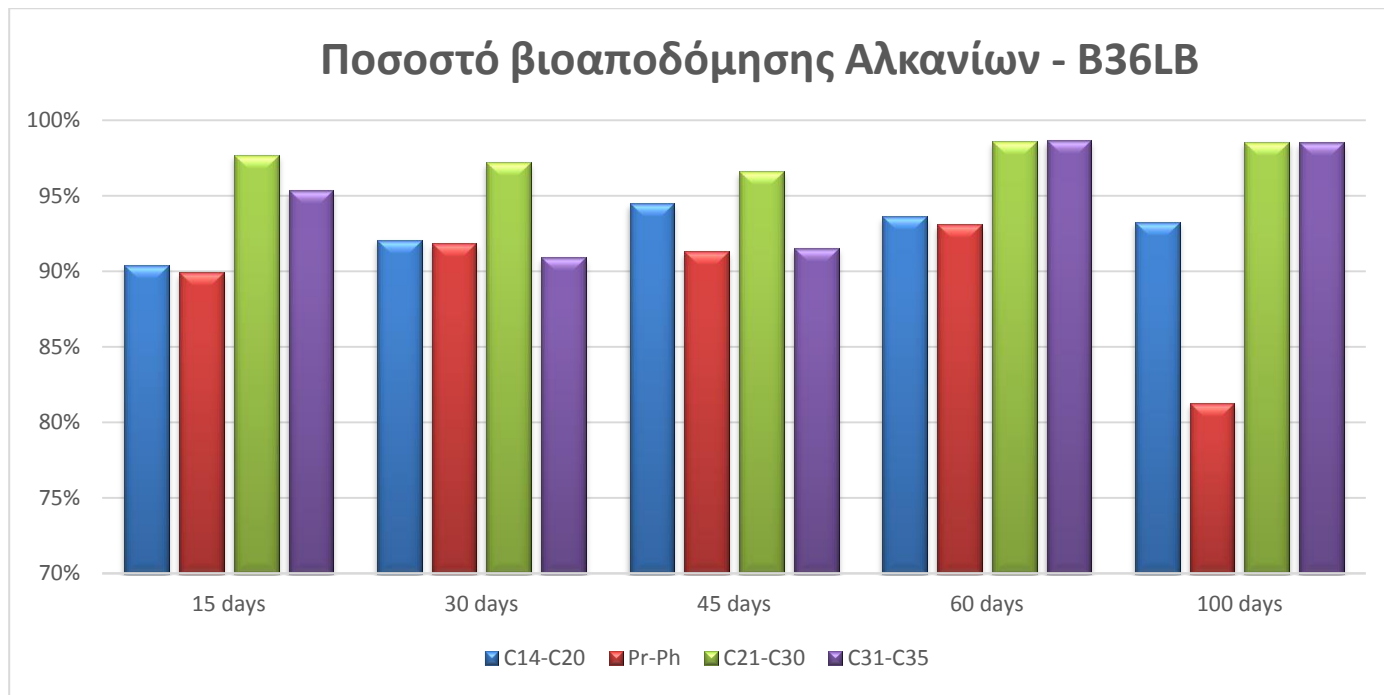
Το δείγμα αυτό διαθέτει το ίδιο λίπασμα και λεκιθίνη με το δείγμα B36L με την επιπλέον προσθήκη ειδικού επιφανειοδραστικού μίγματος ουσιών Oil Be Gone.

8.7.1 Ανάλυση GC/MS Αλκανίων δείγματος B36LB



Εικόνα 8.25: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση αλκανίων και ισοπρενοειδών ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36LB – Days (0-100)

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος (Εικόνα 8.25) είναι εμφανής η μεγάλη αποδόμηση όλων των συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος B36LB. Τα ποσοστά αποδόμησης είναι πολύ υψηλά γεγονός που είναι ορατό σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 8.26).



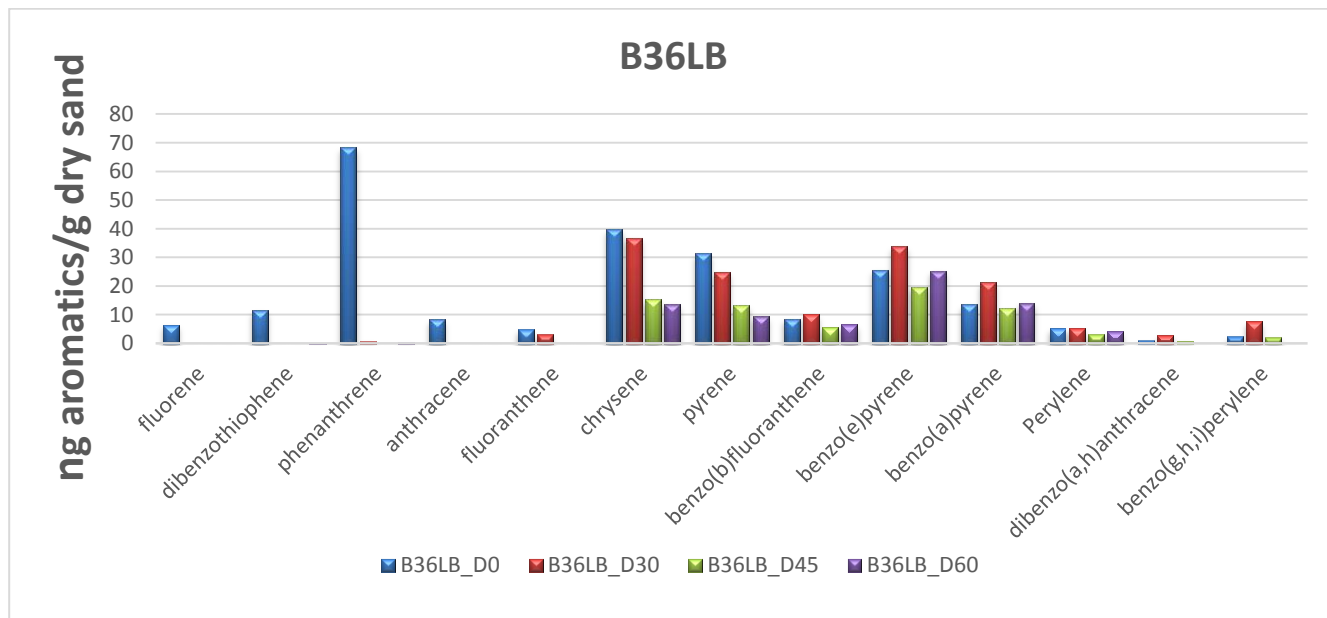
Εικόνα 8.26: Ποσοστά βιοαποδόμησης κατηγοριοποιημένων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος του δείγματος B36LB

Στο διάγραμμα αυτό (Εικόνα 8.26) ο βαθμός βιοαποδόμησης (άξονας x) κάθε κατηγορίας συστατικών (μικρού, μετρίου και υψηλού μοριακού βάρους και ισοπρενοειδή) είναι υπολογισμένος ως προς την αρχική ποσότητα τους για κάθε ημέρα δειγματοληψίας.

Η βιοαποδόμηση σε όλες τις κατηγορίες φτάνει το μέγιστο σχεδόν ποσοστό τις πρώτες 15 ημέρες. Συγκεκριμένα τα C14-C20 μαζί με τα Pr-Ph φτάνουν το 90% ενώ τα C21-C30 τι 98% και τα C31-C35 το 95% με μικρές αυξομειώσεις μέχρι το τέλος των δειγματοληψιών του πειράματος. Η μετρήσεις των Pr-Ph για την 100^η ημέρα διαφέρουν λόγω δυσκολίας προσδιορισμού της καμπύλης στο χρωματογράφημα.



8.7.2 Ανάλυση GC/MS αρωματικού κλάσματος δείγματος B36LB



Εικόνα 8.27: Κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Δείγμα B36LB - Days (0-100)

Σημειώνεται ότι για αυτό το δείγμα δεν συμπεριλαμβάνεται η πειραματική μέτρηση για το αρωματικό κλάσμα των 15 ημερών λόγω ατυχήματος κατά την μεταφορά του και απώλεια μικρής αλλά ακαθόριστης ποσότητας. Το γεγονός αυτό δεν είναι περιοριστικό στην εξαγωγή συμπερασμάτων.

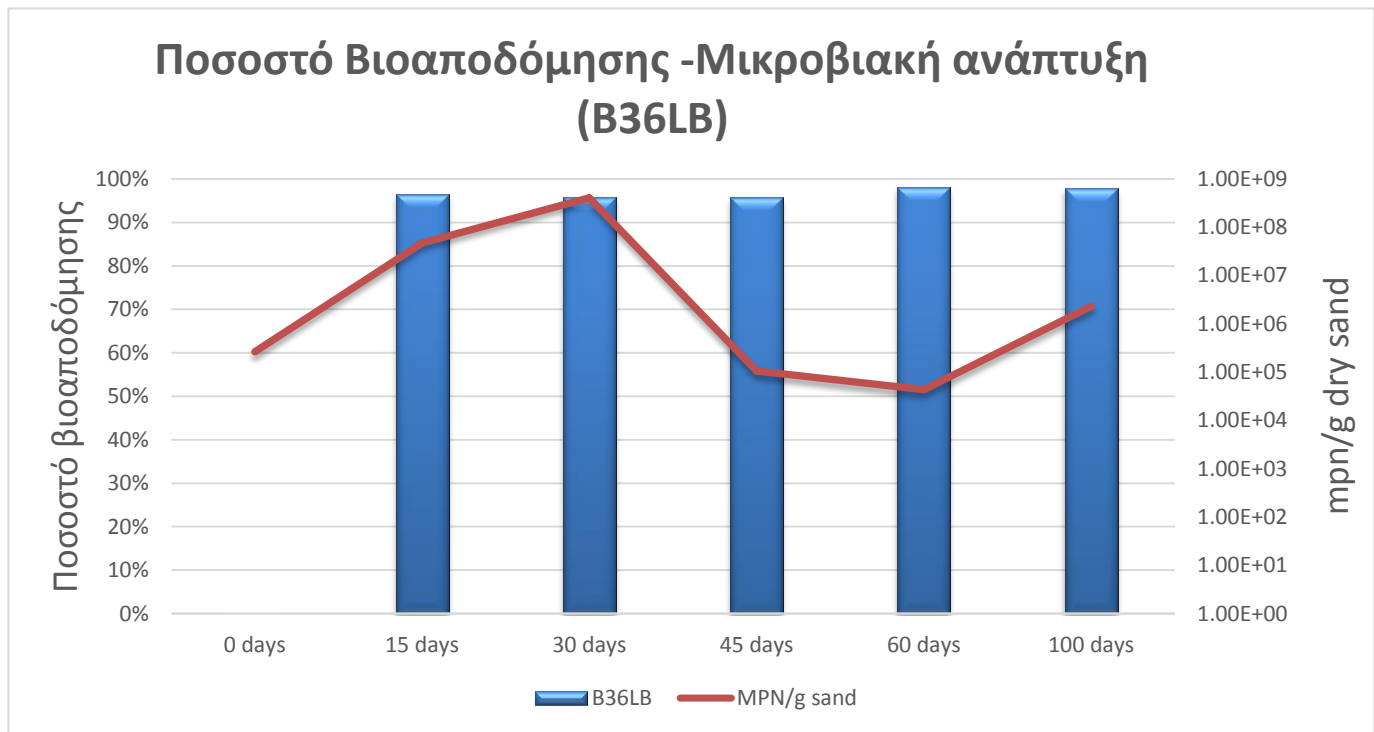
Σε αυτή την περίπτωση η πλειοψηφία των συστατικών του κλάσματος φαίνεται να υπόκειται σε βιοαποδόμηση. Τα Fluorene και Dibenzothiophene έπειτα την αρχική ανίχνευση τους παύουν να υφίστανται. Το Phenanthrene αποδομείται κατά 98% μετά τις 30 ημέρες. Επιπλέον το Chrysene εμφανίζει αποδόμηση ξεκινώντας με 7% την ημέρα 30 και αυξάνεται στο 61 και 65% στις μετρήσεις των 45 και 60 ημερών. Αναλόγως το Pyrene εμφανίζει ποσοστό βιοαποδόμησης ίσο με 20% την ημέρα 30 που αυξάνεται σε 57% στις 45 ημέρες καταλήγοντας σε 70% στις 60 ημέρες.

8.7.3 Σύγκριση Βιοαποδόμησης-Μικροβιακού πληθυσμού δείγματος B36LB

Σε αυτή την περίπτωση, σε συμφωνία με τις προηγούμενες, παρατηρείται ότι ο μέγιστος βαθμός βιοαποδόμησης λαμβάνει μέρος κατά την αύξηση του μικροβιακού φορτίου του δείγματος, δηλαδή από την αρχική ημέρα μέχρι και την 30^η όπου από εκεί και έπειτα η βιοαποδόμηση παραμένει στα ίδια επίπεδα με την παράλληλη μείωση των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα το



ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 96% κατά μέσο όρο. Σε αυτή τη φάση οι μικροοργανισμοί αυξάνονται έως και 1500 φορές σε σχέση με την αρχική μέτρηση ενώ στην συνέχεια αρχίζουν να μειώνονται μέχρι και την 60^η ημέρα όπου ξεκινά και πάλι η αύξηση του πληθυσμού τους.



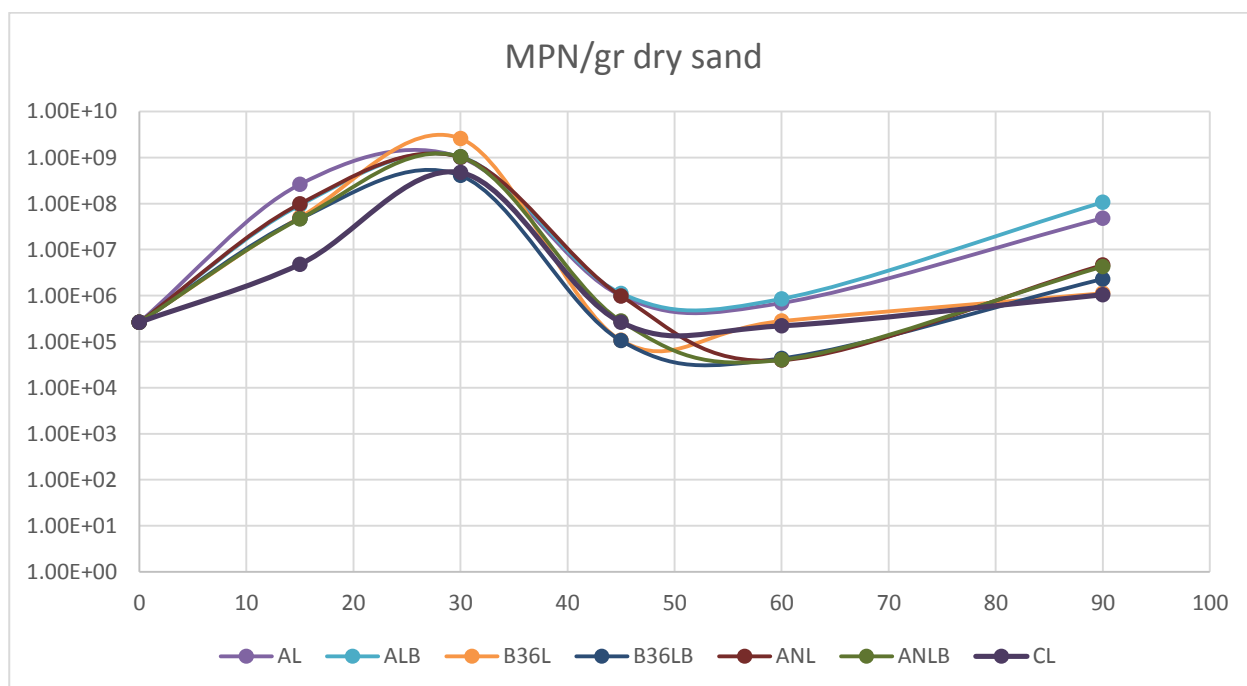
Εικόνα 8.28: Σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης με την μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα B36LB



9 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα της βιοαποδόμησης του πετρελαίου με την τεχνική του Land Farming με βάση τα διαφορετικά θρεπτικά συστατικά και ουσίες που έχουν προστεθεί στα δείγματα.

9.1 Σύγκριση πληθυσμών MPN και CFUs



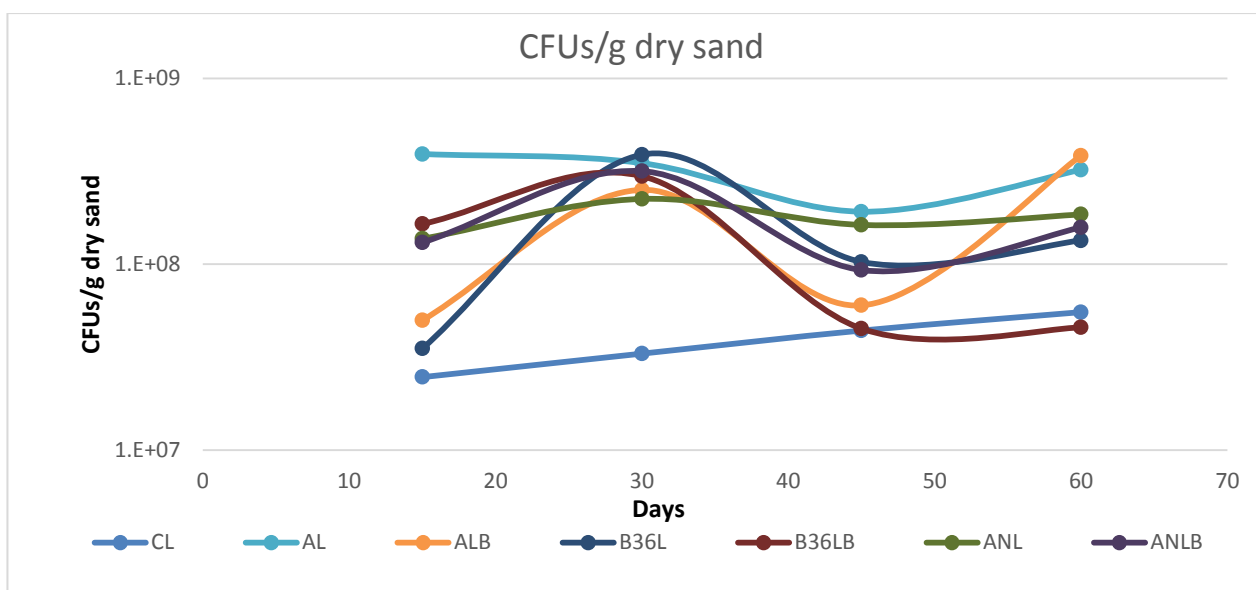
Εικόνα 9.1: Σύγκριση μικροβιακών πληθυσμών που αποδομούν το πετρέλαιο για όλα τα δείγματα σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 9.1) εμφανίζεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ικανών να αποδομούν τα συστατικά του πετρελαίου IFO-180 σε όλα τα δείγματα. Είναι εμφανές ότι η μικροβιακή ανάπτυξη ακολουθεί πανομοιότυπη πορεία για όλα τα θρεπτικά συστατικά, με την φάση ανάπτυξης του φορτίου να εμφανίζεται μέχρι και την μέτρηση των 30 ημερών, στην συνέχεια μείωσης του και πάλι αύξησης του πέρα της 100^{ης} ημέρας. Επιπλέον η αύξηση των μικροοργανισμών στο δείγμα Control δεν είναι τόσο άμεση όπως συμβαίνει και στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Ακόμα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η περίοδος μεταξύ 30 και 45 ημερών όπου εμφανίζεται η πτώση του πληθυσμού οφείλεται πιθανότατα στη μικρή βιοδιαθεσιμότητα του εναπομείναντος υποστρώματος. Μετά την φάση αυτή οι μικροοργανισμοί έχοντας αναπτύξει την ικανότητα να καταναλώσουν τα πιο πολύπλοκα συστατικά του πετρελαίου όπως τα μεγάλα μοριακού βάρους τόσο για το αρωματικό όσο και το κορεσμένο κλάσμα, αρχίζουν και πάλι να πολλαπλασιάζονται.



Επιπλέον είναι εμφανής η αυξητική τάση του πληθυσμού πέρα των 100 ημέρων για όλα τα δείγματα εξαιρουμένου του Control όπου παρατηρείται τάση για σταθεροποίηση του.

Για αυτό τον λόγο θα ήταν χρήσιμο να γίνει η εξέταση της επίδρασης της μεθόδου για ορισμένα αρωματικά συστατικά βενζολικού δακτυλίου των οποίων η αποδόμηση φαίνεται να μην λαμβάνει χώρα σε μεγάλο βαθμό μέχρι τις 100 ημέρες όπως έχει παρατηρηθεί από τα διαγράμματα αποδόμησης του αρωματικού κλάσματος στο προηγούμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 9.2: Σύγκριση μικροβιακού πληθυσμού σε όλα τα δείγματα για τις πρώτες 60 ημέρες

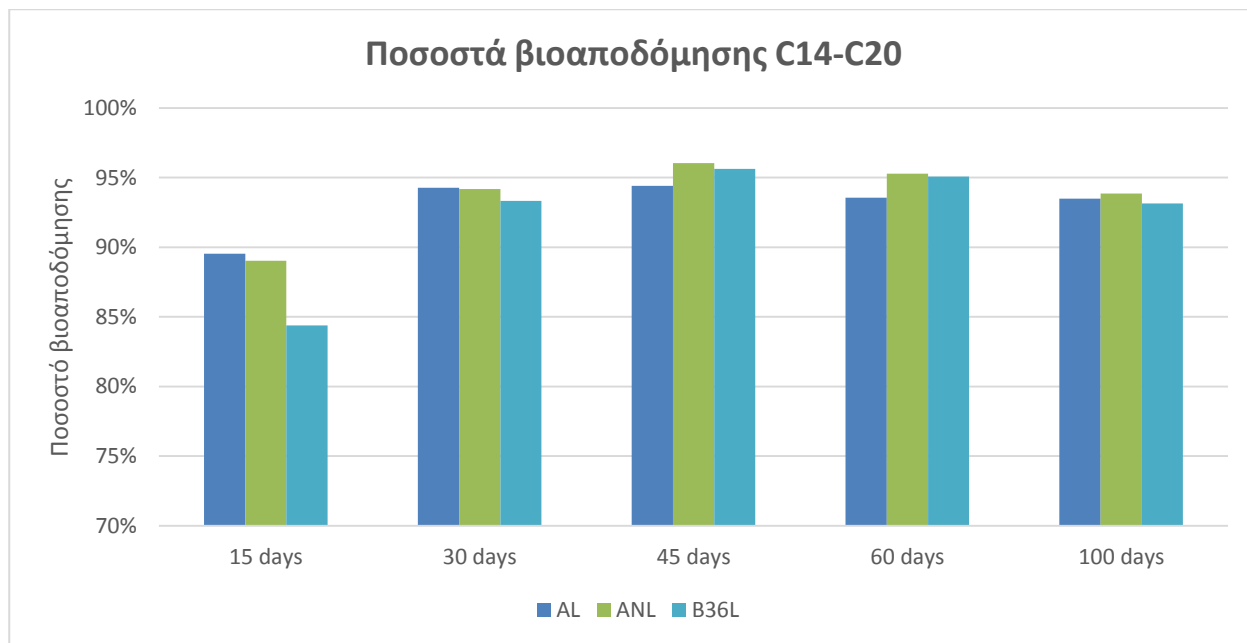
Η πορεία του πληθυσμού των μικροοργανισμών στα δείγματα για τις 5 διαφορετικές μετρήσεις καλλιεργειών που πραγματοποιήθηκαν την 15^η, 30^η, 45^η και 60^η ημέρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.2. Οι αραιώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των τριβλίων ήταν κατά κύριο λόγο αυτές των 10^{-6} και 10^{-7} . Οι πληθυσμοί που έχουν μετρηθεί στα τριβλία, έχουν εκφραστεί ανά γραμμάριο ξηρής άμμου και αφορούν το συνολικό αριθμό ετερότροφων μικροοργανισμών ανεξάρτητα από την συμμετοχή τους στην αποδόμηση των υδρογονανθράκων. Επίσης σε αυτή την μέθοδο υπάρχει και η πιθανότητα ανάπτυξης άλλων ειδών που μπορούν να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό τους μέσω περιορισμού του υποστρώματος.

Από το διάγραμμα φαίνεται ανάλογη πληθυσμιακή μεταβολή σε όλα τα δείγματα με σαφή υπεροχή τους έναντι του Control, του οποίου οι τιμές δεν ανέρχονται στο ίδιο επίπεδο. Οι μέγιστες τιμές συμπίπτουν με την μέτρηση των 30 ημερών όπου και παρατηρούνται τα μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης των συστατικών του πετρελαίου. Τέλος η αυξητική και πάλι τάση τους μετά την μέτρηση των 60 ημερών υποδηλώνει την ενεργοποίηση μηχανισμών για την κατανάλωση πολυπλοκότερων ενώσεων.



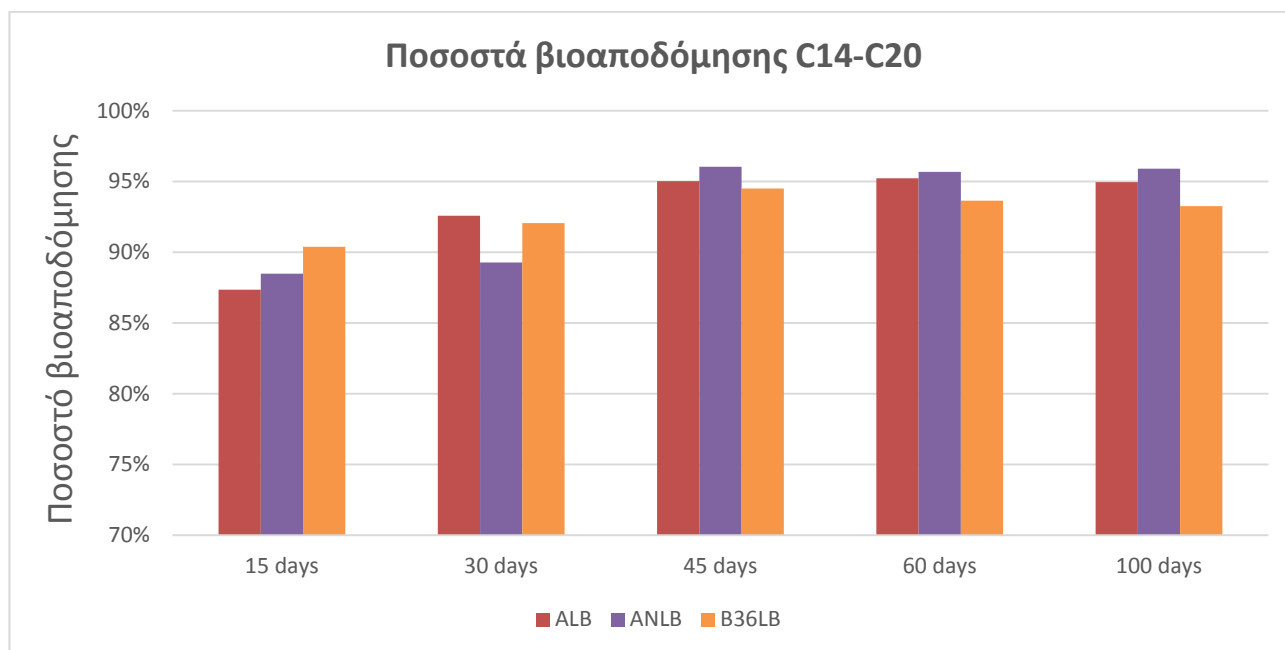
9.2 Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20

Σε αυτή την ενότητα συγκρίνονται τα ποσοστά βιοαποδόμησης των συστατικών μικρού μοριακού βάρους του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 9.3: Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20 για τα δείγματα AL, ANL και B36L

Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 9.3) γίνεται σύγκριση του βαθμού βιοαποδόμησης των ελαφρύτερων συστατικών του κορεσμένου κλάσματος πετρελαίου των δειγμάτων AL, ANL και B36L. Παρατηρείται ότι και στα τρία αυτά δείγματα τα ποσοστά βιοαποδόμησης φτάνουν μέχρι και το 95% στις 45 ημέρες. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στις πρώτες 15 ημέρες όπου το δείγμα B36L φαίνεται να μην έχει τόσο άμεση απόκριση συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα, γεγονός που αντισταθμίζεται τις επόμενες ημέρες με την απότομη αύξηση του πληθυσμού. Ακόμα με βάση τα παραπάνω η προσθήκη και μόνο της φυσικής κοπριάς πουλερικών εμφανίζεται να έχει το ίδιο και καλύτερο αποτέλεσμα σε σχέση με τα υγρά εμπορικά λιπάσματα.



Εικόνα 9.4: Ποσοστά βιοαποδόμησης C14-C20 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB

Σε αυτό το διάγραμμα (Εικόνα 9.4) γίνεται και πάλι η ποσοστιαία σύγκριση αποδόμησης των C14 - C20 αυτή την φορά για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB. Φαίνεται ότι η προσθήκη της επιπλέον επιφανειοδραστικής ουσίας Oil Be Gone δεν επιφέρει ουσιαστική αλλαγή στο τελικό βαθμό βιοαποδόμησης, ο οποίος και πάλι είναι περίπου 95% στις 45 ημέρες.

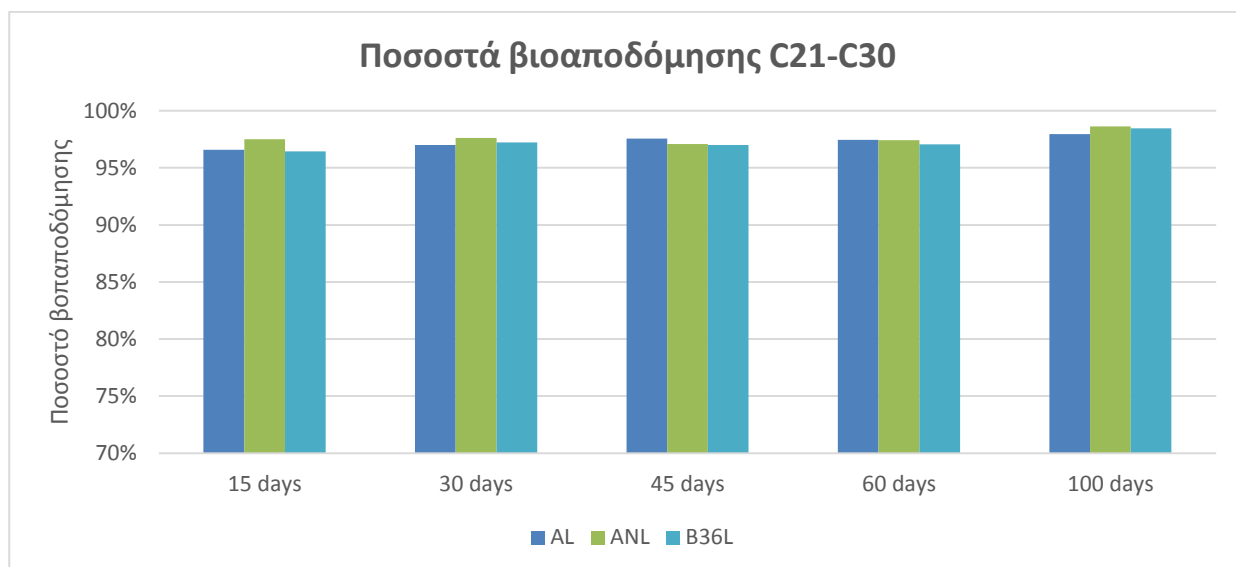
Επιπλέον συγκρίνοντας τις πρώτες 15 ημέρες παρατηρείται μικρότερο ποσοστό αποδόμησης για τα δείγματα ALB και ANLB σε σχέση με τα AL και ANL.

Βελτίωση της τάξεως του 5% υπάρχει στο δείγμα B36LB σε σχέση με το B36L όπου φαίνεται η προσθήκη της ουσίας Oil Be gone να έχει αυξήσει την διαθεσιμότητα των συστατικών στους μικροοργανισμούς.

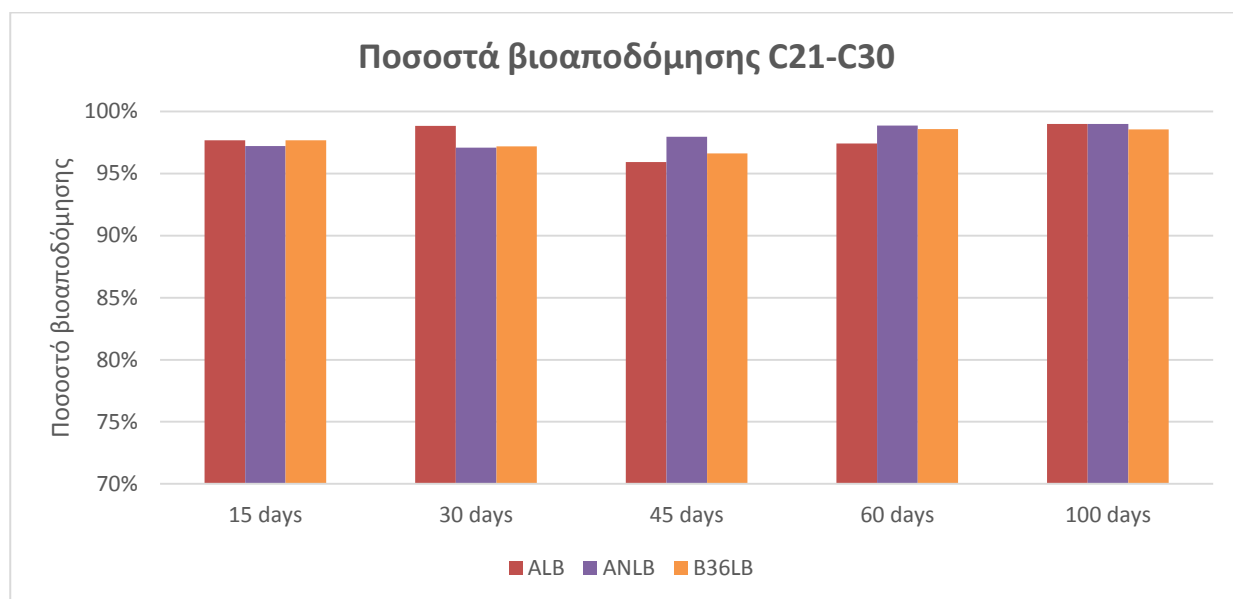
Τέλος, η διατήρηση του μικροβιακού φορτίου σε υψηλότερα επίπεδα για το δείγμα ALB μετά την 45^η ημέρα έχει ως αποτέλεσμα την επιπλέον αποδόμηση των συστατικών μέχρι και την 60^η ημέρα.

9.3 Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30

Σε αυτή την ενότητα πραγματοποιείται η σύγκριση των ποσοστών βιοαποδόμησης των συστατικών μετρίου μοριακού βάρους του κορεσμένου κλάσματος του πετρελαίου για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 9.5: Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30 για τα δείγματα AL, ANL και B36L



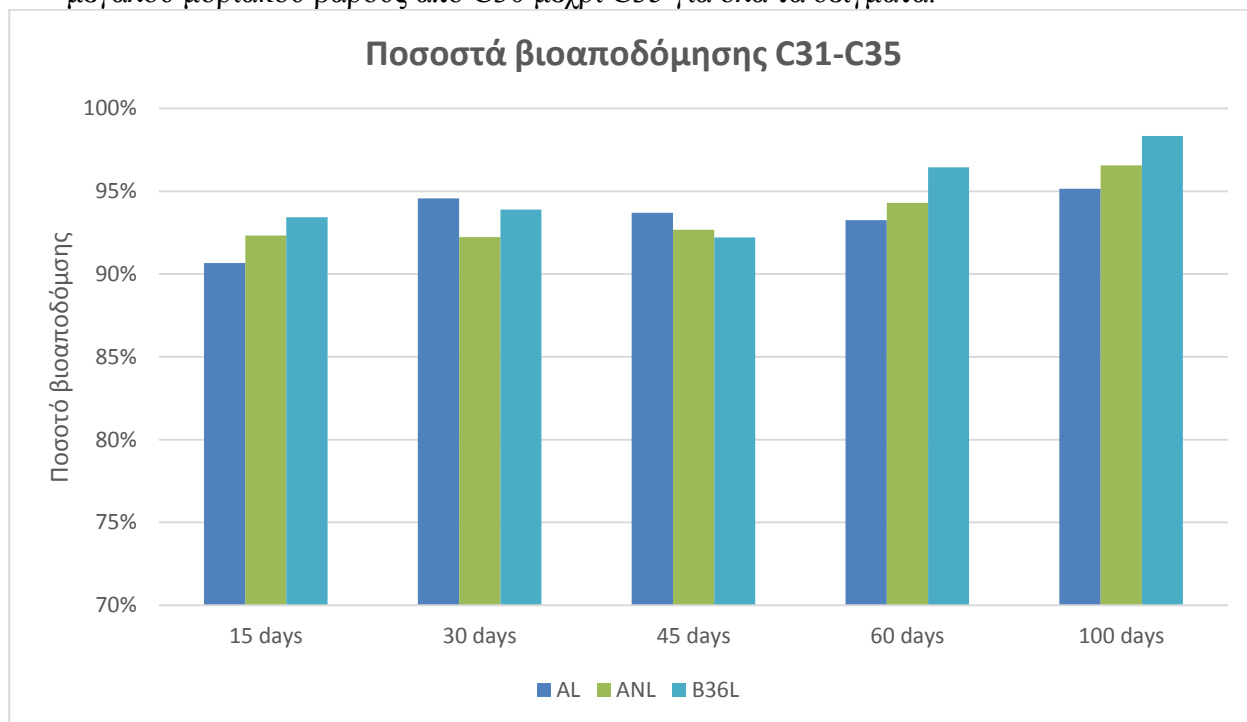
Εικόνα 9.6: Ποσοστά βιοαποδόμησης C21-C30 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 9.5, Εικόνα 9.6) δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο άμεσο συμπέρασμα καθώς σε όλα τα δείγματα ο βαθμός αποδόμησης είναι μεγαλύτερος από 95% τις πρώτες 15 ημέρες και ανεπηρέαστος από τις αυξομειώσεις του μικροβιακού πληθυσμού που επέρχονται και την επιπλέον προσθήκη του Oil Be Gone. Φαίνεται ότι στο δείγμα ALB η βιοαποδόμηση είναι πιο σύντομη σε σχέση με τα υπόλοιπα με ποσοστό 97% στην μέτρηση της 30^{ης} ημέρας.



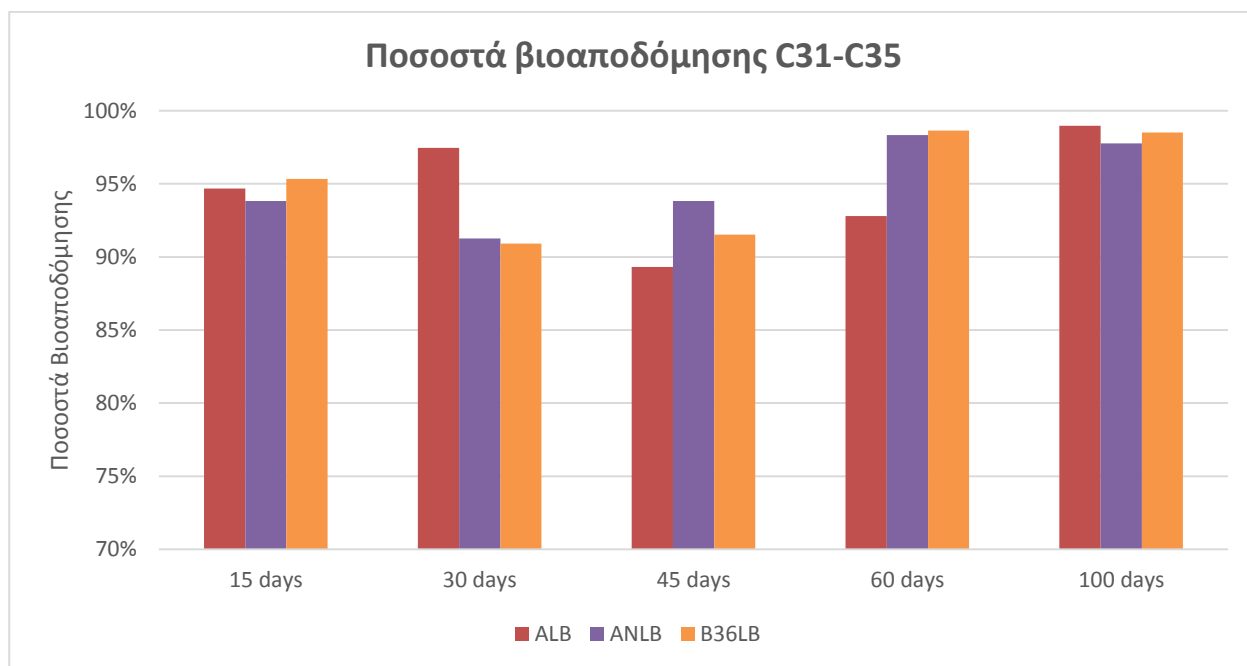
9.4 Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα ποσοστά βιοαποδόμησης των συστατικών μεγάλου μοριακού βάρους από C30 μέχρι C35 για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 9.7: Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35 για τα δείγματα AL, ANL και B36L

Η βιοαποδόμηση των μεγαλύτερου μοριακού βάρους ενώσεων θεωρητικά αποτελεί πιο δύσκολη διαδικασία για τους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά παρατηρείται μείωση τους σε ποσοστά μεγαλύτερων του 94% στο πέρας των πειραμάτων. Με βάση το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 9.7) εμφανίζεται η υπεροχή του δείγματος B36L στην ταχύτερη αποδόμηση αλλά και στην επίτευξη του μεγαλύτερου ποσοστού.

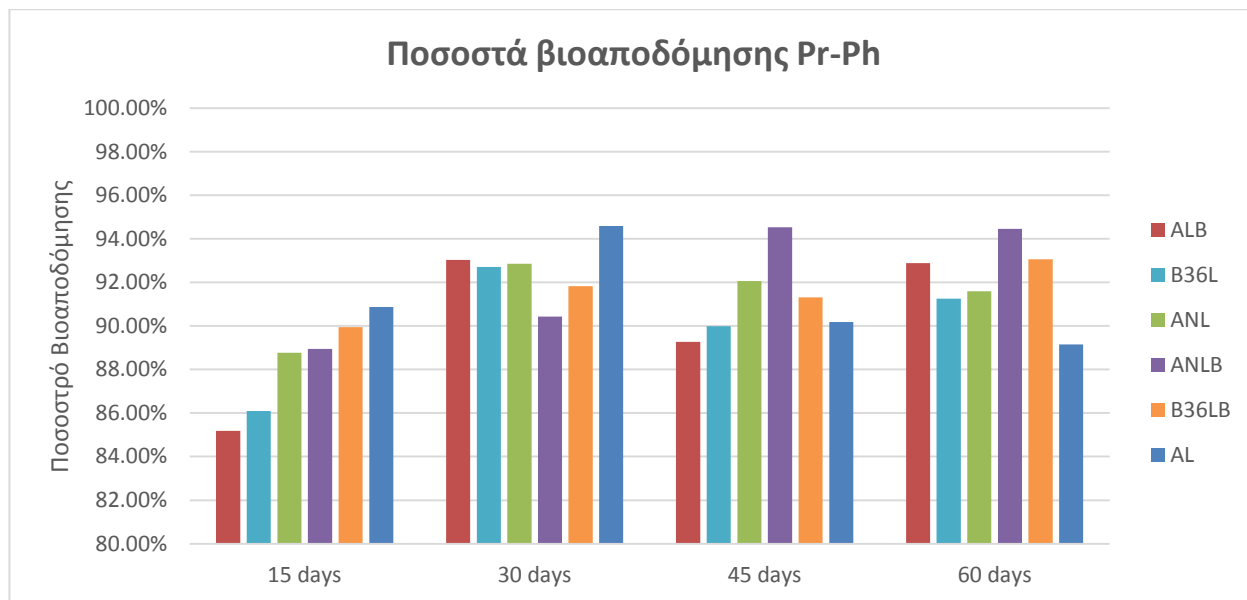


Εικόνα 9.8: Ποσοστά βιοαποδόμησης C31-C35 για τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB

Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα (Εικόνα 9.8) που αφορά τα δείγματα ALB, ANLB και B36LB εμφανίζονται παρόμοια ποσοστά τις πρώτες ημέρες και φαίνεται ότι επιτυγχάνουν ελαφρώς βελτιωμένη αποδόμηση στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα σε σχέση με τα AL, ANL και B36L.



Τέλος όσων αφορά τα ισοπρενοειδή πριστανίο και φυτάνιο (Pr-Ph) δημιουργείται το επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 9.9) για το σύνολο των δειγμάτων.



Εικόνα 9.9: Ποσοστιαία βιοαποδόμηση πριστανίου και φυτανίου σε όλα τα δείγματα

Για αυτή την κατηγορία συστατικών εμφανίζονται επίσης μεγάλα ποσοστά βιοαποδόμησης με μεγαλύτερο ποσοστό το 91% που εμφανίζεται για το δείγμα AL της 15^η ημέρας ακολουθώντας το τα B36LB με 90%, ANLB και ANL με 88%, B36L με 86% και τέλος το ALB με 85%. Υπάρχει επιπλέον αύξηση των ποσοστών αυτών στην μέτρηση των 30 ημερών με άνοδο του ALB κατά 8%, του B36L κατά 7%, του AL και ANL κατά 5% και των ANLB και B36LB κατά 2%.

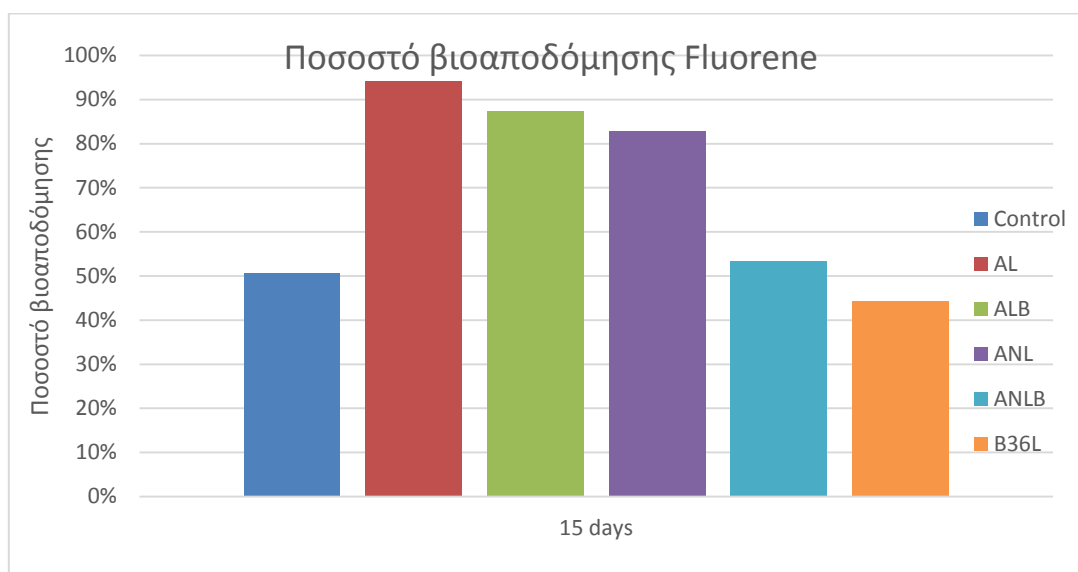
Συμπερασματικά για το κορεσμένο κλάσμα του πετρελαίου, όλα τα δείγματα έχουν πετύχει πολύ μεγάλα ποσοστά απομάκρυνσης στο πέρας μολις 15 ημερών για όλο το εύρος των συστατικών του σε σχέση με το δείγμα Control, όπου δεν έχει γίνει καμία προσθήκη θρεπτικών ουσιών. Μόνη εξαίρεση αποτελούν τα ελαφρύτερα, δηλαδή μικρότερου μοριακού βάρους συστατικά, από C14 μέχρι C20, όπου και στο δείγμα ελέγχου εμφανίστηκαν ίδιου μεγέθους ποσοστά αποδόμησης (μεγαλύτερα του 80%), πιθανότατα λόγω φυσικής απομάκρυνσης τους μέσω φυσικών διεργασιών όπως της εξάτμισης, η οποία προφανώς ενισχύθηκε με την καθημερινή ανάμειξη της άμμου.

9.5 Σύγκριση βιοαποδόμησης αρωματικών συστατικών

Τα ελαφρύτερα συστατικά του αρωματικού κλάσματος όπως το Fluorene, Dibenzoethiophene και Phenanthrene υπόκεινται σχεδόν ολοκληρωτική αποδόμηση σε όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανομένου του δείγματος χωρίς την προσθήκη

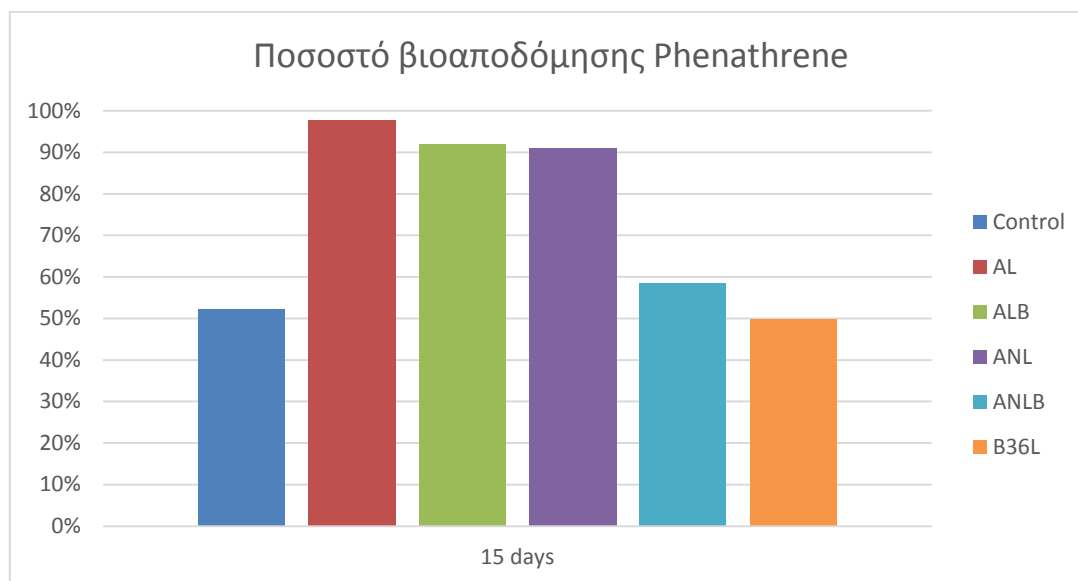


θρεπτικών με το πέρασμα 30 ημερών. Τονίζεται ότι στο δείγμα B36LB δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση των ουσιών αυτών στην μέτρηση των 15 ημερών. Συγκεκριμένα με βάση το επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 9.10), φαίνεται ότι το Fluorene βιοαποδομείται γρηγορότερα στο δείγμα AL από τις πρώτες 15 ημέρες φτάνοντας ποσοστό 93% κατά 40% μεγαλύτερο από αυτό του Control. Ακολουθούν τα δείγματα ALB, ANL, ANLB και B36L κατά σειρά μικρότερης βιοαποδόμησης.



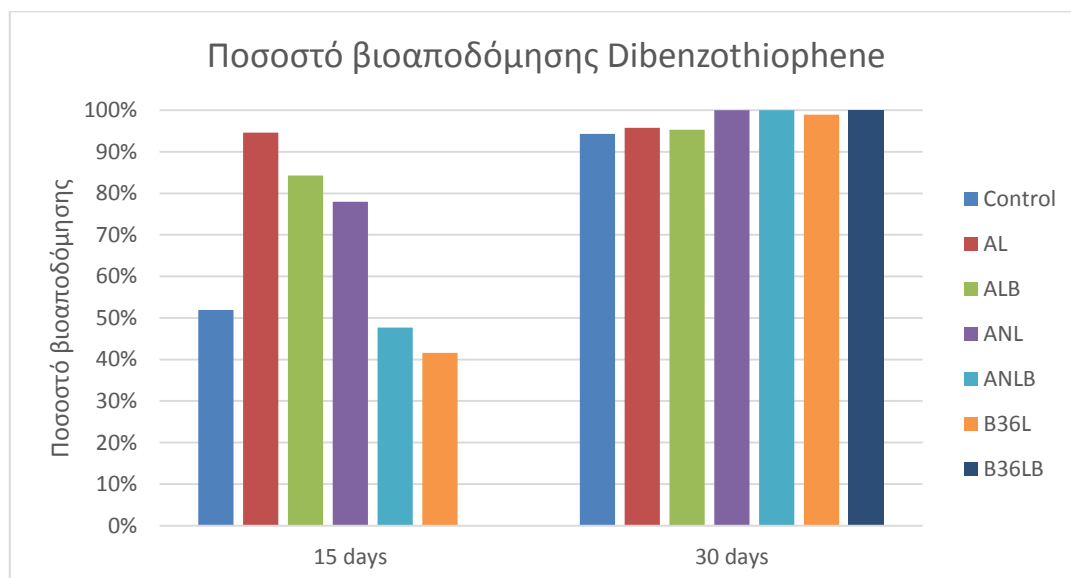
Εικόνα 9.10: Ποσοστό βιοαποδόμησης Fluorene σε όλα τα δείγματα στις 15 ημέρες

Για το Phenanthrene φαίνεται ότι το AL πέτυχε υψηλότερο ποσοστό βιοαποδόμησης ίσο με 98% δηλαδή 47% μεγαλύτερο από το Control σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 9.11). Ακολουθούν τα υπόλοιπα δείγματα με ίδια σειρά όπως και στην περίπτωση του Fluorene.



Εικόνα 9.11: Ποσοστό βιοαποδόμησης Phenanthrene σε όλα τα δείγματα στις 15 ημέρες

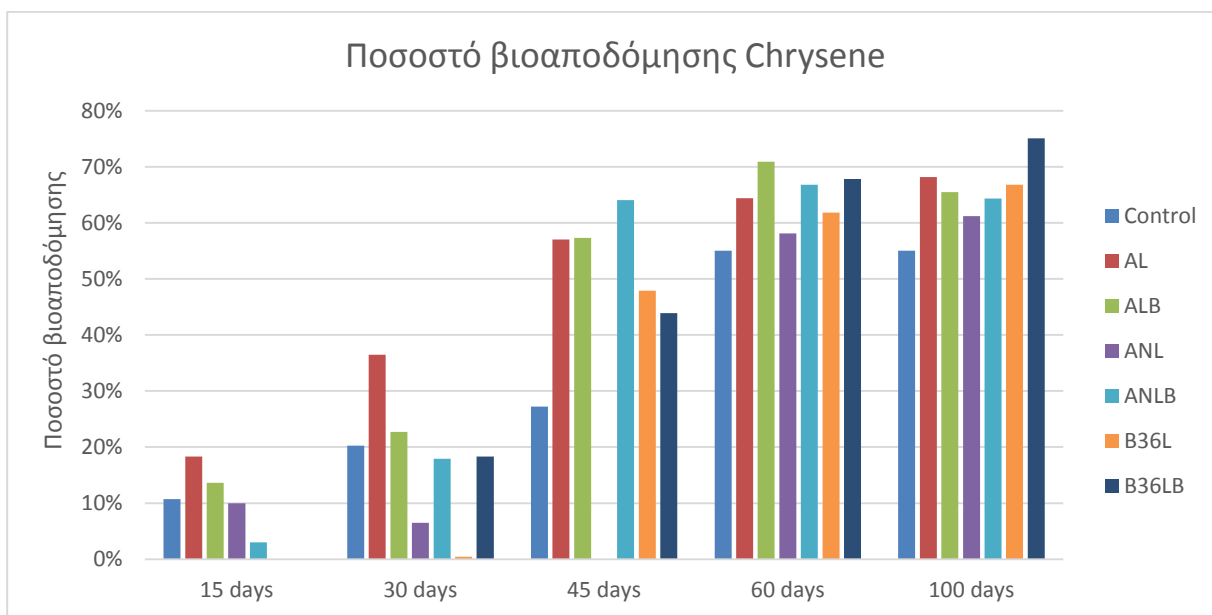
Σχετικά με το Dibenzothiophene και πάλι το δείγμα AL φαίνεται να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης στις 15 ημέρες ίσο με 95% μεγαλύτερο κατά 44% από το δείγμα ελέγχου που εμφανίζει ίδια περίπου αποδόμηση με τα ANLB και B36L σύμφωνα με το επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 9.12). Τέλος με την μέτρηση των 30 ημερών παρουσιάζεται σχεδόν ολοκληρωτική αποδόμηση του σε όλα τα δείγματα.



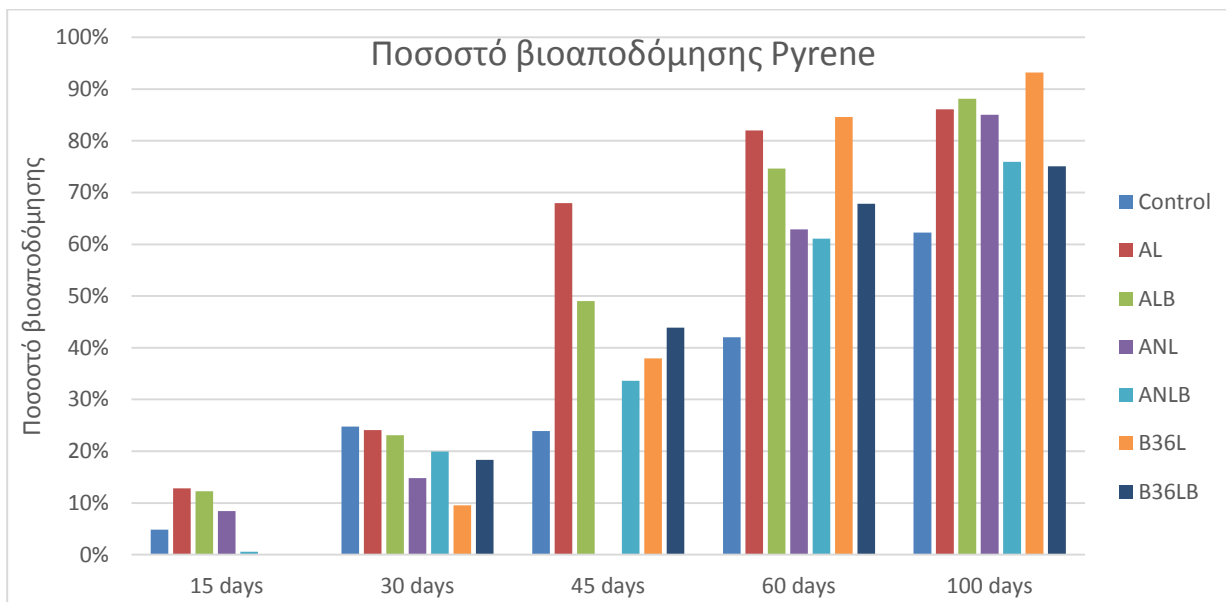
Εικόνα 9.12: Ποσοστό βιοαποδόμησης Dibenzothiophene σε όλα τα δείγματα για τις ημέρες 15 και 30



Περνώντας στα βαρύτερα συστατικά του αρωματικού κλάσματος Chrysene και Pyrene παρατηρείται ότι η αποδόμηση τους δεν είναι άμεση αλλά γίνεται σταδιακά σε όλη την διάρκεια της πειραματικής περιόδου σε όλα τα δείγματα όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Εικόνα 9.13: Ποσοστό βιοαποδόμησης Chrysene σε όλα τα δείγματα, Days (0-100)



Εικόνα 9.14: Ποσοστό βιοαποδόμησης Pyrene σε όλα τα δείγματα, Days 0-100



Η συμπεριφορά βιοαποδόμησης του Chrysene είναι παρόμοια σε όλα τα δείγματα όπου στην μέτρηση των 100 ημερών φτάνουν ποσοστά από 60% και πάνω με εξαίρεση το δείγμα Control, όπου φαίνεται να διατηρεί σταθερό βαθμό σύμφωνα με τις μετρήσεις των 60 και 100 ημερών, γεγονός που υποδηλώνει την αδυναμία περεταίρω αποδόμησης του. Χαρακτηριστική είναι η απόκριση των δειγμάτων AL και ALB με ποσοστό αποδόμησης 57% σε μόνο 45 ημέρες, καθώς και η επίτευξη τελικής αποδόμησης 68% και 66% αντίστοιχα. Επιπλέον η αυξητική τάση του βαθμού αποδόμησης σε όλα τα πειραματικά δείγματα μπορεί να σημαίνει την έως και ολοκληρωτική βιοαποδόμηση τους μετά τις 100 ημέρες που αποτελεί την τελευταία δειγματοληψία.

Για το Pyrene παρουσιάζονται μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποδόμησης, αλλά μετά τις 45 ημέρες σε σχέση με το Chrysene όπου τα αποτελέσματα είναι εμφανή στις 30 ημέρες. Χαρακτηριστική και πάλι είναι η απόδοση των δειγμάτων AL και ALB σε σχέση με το Control, όπου επιτυγχάνουν κατά 49% και 25% μεγαλύτερη αποδόμηση αντίστοιχα. Στην τελευταία μέτρηση έχουν ποσοστά αποδόμησης 86% και 88% αντίστοιχα.

Τα υπόλοιπα συστατικά του αρωματικού κλάσματος benzo(b)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene, Perylene, dibenzo(a,h)anthracene και benzo(g,h,i)perylene παραμένουν σχεδόν σταθερά με μικρές διακυμάνσεις με βάση τις οποίες δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα καθώς είναι πολύ μικρές και βρίσκονται στο όριο του πειραματικού σφάλματος.

9.6 Συμπεράσματα-Προτάσεις

Εξετάζοντας την παρούσα διπλωματική εργασία μπορούν να εξαχθούν ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της βιοαποδόμησης της ρυπασμένης άμμου με την τεχνική του Land Farming προκαλώντας βιοδιέγερση των μικροοργανισμών που περιέχονται σε αυτή με την χρήση διαφόρων θρεπτικών και επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Αρχικά έχει γίνει σαφής η υπεροχή όλων των δειγμάτων AL, ALB, ANL, ANLB, B36L και B36LB έναντι του δείγματος ελέγχου στην αποδόμηση της πλειοψηφίας των συστατικών του κορεσμένου και αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου.

Συγκεκριμένα τα ελαφρύτερα συστατικά C14-C20 του κορεσμένου κλάσματος βιοαποδομούνται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% στις πρώτες 15 ημέρες σε όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανομένου και του Control.

Επιπλέον όσων αφορά τα μετρίου μοριακού βάρους C21-C30 στο δείγμα Control επιτυγχάνεται ποσοστό βιοαποδόμησης ίσο με 90% στο πέρας 30 ημερών βαθμός που εμφανίζεται στα υπόλοιπα δείγματα σε μόλις 15 ημέρες. Ακόμα τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους C31-C35 όπως και τα ισοπρενοειδή Pr-Ph φαίνεται να αποδομούνται στο δείγμα ελέγχου αλλά με πολύ μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τα δείγματα που έχει γίνει η προσθήκη θρεπτικών. Στην περίπτωση αυτή, στα ενισχυμένα δείγματα το μέγιστο ποσοστό αποδόμησης είναι στις πρώτες 15 ημέρες ενώ στο Control αυξάνεται μέχρι και την 100^η ημέρα. Επομένως είναι αδύνατος ο διαχωρισμός του βέλτιστου συνδυασμού θρεπτικών-επιφανειοδραστικών ουσιών, μιας και όλα τα δείγματα εμφάνισαν πολύ μεγάλους ρυθμούς βιοαποδόμησης.



Για το αρωματικό κλάσμα, από την άλλη μεριά μπορεί να γίνει μία πιο αποτελεσματική σύγκριση. Τα συστατικά Fluorene, Phenanthrene και Dibenzothiophene παρουσιάζουν κατά μέσο όρο 40% μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποδόμησης.

Ανεξάρτητα από την γνωστή ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο να γαλακτωματοποιούν μίγματα υδρογονανθράκων-νερού, η εφαρμογή τους στο έδαφος αυξάνει την διαλυτότητα των υδρογονανθράκων με παράλληλη αύξηση στην απομάκρυνση ελαιωδών ουσιών από τα σωματίδια του εδάφους. Ωστόσο οι αναφορές της αποτελεσματικότητας τέτοιων ουσιών στην βιοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών από πετρελαιοειδή είναι αμφιλεγόμενες, πράγμα που εμφανίζεται και σε αυτή τη μελέτη όπου τα δοκίμια με επιφανειοδραστική ουσία δεν φαίνεται να έχουν σημαντική διαφορά στον βαθμό βιοαποδόμησης.

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η εφαρμογή του Land Farming για ρυπασμένη άμμο με IFO 180 με βίο-διέγερση του μικροβιακού πληθυσμού είχε πολύ μεγάλα ποσοστά επιτυχίας και η αυξημένη απόδοση του δείγματος με την προσθήκη κοπριάς πουλερικών και λεκιθίνης εμφάνισε τα βέλτιστα και ταχύτερα αποτελέσματα. Έτσι ευνοείται η εφαρμογή και καθιέρωση της τεχνολογίας ως αποτελεσματική και μία από τις φτηνότερες μεθόδους εξυγίανσης.

Μελλοντικά θα ήταν χρήσιμη η επανεξέταση των ίδιων θρεπτικών συστατικών σε αυστηρότερα ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες όπου παράγοντες όπως η υγρασία και η θερμοκρασία περιβάλλοντος να παραμένουν σταθερές να μην επηρεάσουν την μικροβιακή δραστηριότητα, ευνοώντας έτσι την εξαγωγή αποτελεσμάτων όπου γίνεται ξεκάθαρη σύγκριση και μόνο των θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον θα είχε ενδιαφέρον η εξέταση των δειγμάτων για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 100 ημερών για την παρατήρηση και τον προσδιορισμό του χρόνου απαραίτητου για την απομάκρυνση και των πιο επίμονων ενώσεων του αρωματικού κλάσματος.



10 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Blackman, R. A. A.** Oil in the sea: Inputs, fates, and effects: National Academy Press. *Washington DC*. Marine Pollution Bulletin 1985, 17(1), pp. 45-46.
2. *A guide to contingency planning for oil spills on water, IPIECA REPORT SERIES. Association, International Petroleum Industry Environmental Conservation.* 2000, Vol. 2.
3. **The International Tanker Owners Pollution Federation Ltd, Oil Tanker Spill Statistics.** <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>. [Online] 2014.
4. **Spies R.B., Rice S.D., Wolfe D.A. and Wright B.A.** The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment, Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium. *Bethesda, MD*. 1996, pp. 1-16.
5. **EPA, US.** Chapter I The behaviour and Effects of Oil Spills in Aquatic Environments, Understanding Oil Spills and Oil Spill Response. http://www.epa.gov/oem/docs/oil/edu/oilspill_book/chap1.pdf. [Online]
6. **ITOPF, TIP 13.** Effects of oil pollution on the marine environment. pp. 2-3.
7. **EPA, U.S.** Understanding oil spills and oil spill response, EPA 540-K-99-007, Office of Emergency and Remedial Response. *U.S. Environmental Protection Agency*. 1999a.
8. **NOAA.** Shoreline Countermeasure Manual, National Oceanic & Atmospheric Administration. *Seattle, Washington*. 1992.
9. **Doerffer, J.W.** Oil Spill Response in the Marine Environment. *Oxford, U.K.* 1992.
10. **Office of Technology Assessment.** Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies. *Washington, DC*. 1990.
11. **Office of Technology Assesment.** Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies. *Washington, DC*. 1991.
12. **Atlas, R. M.** Petroleum Microbiology. *New York*. 1984, Macmillan Publishing Company.



13. **Atlas, R. M.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*. 1981, 45, pp. 180-209.
14. **Prince, R.C.** Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.* 1993, 19, pp. 217-242.
15. **Jobson, A.M., Cook, F.D., and Westlake, D.W.S.** Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. *Applied Microbiology*. 1974, 27, pp. 166-171.
16. **Lee, K., Tremblay, G.H., and Gauthier, J., Cobanli, S.E., Griffin, M.** Bioaugmentation and biostimulation: a paradox between laboratory and field results. *Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington DC.* 1997, pp. 697-705.
17. **Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L, King, D.W., and Holder, E.** Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology*. 1996, 30, pp. 1764-1775.
18. **Nikolopoulou M., and Kalogerakis N.** Petroleum Spill Control with Biological Means. *Comprehensive Biotechnology*. In Moo-Young M, 2011, pp. 263–274. .
19. **EPA, US.** Chapter V (Landfarming) of OUST's publication: How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>. [Online] 2004.
20. **Khan FI., Husain T., Hejazi R.** An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*. 2004, 71, pp. 95–122.
21. **Besaltatpour A., Hajabbasi M., Khoshgoftarmanesh A., and Dorostkar V.** Landfarming process effects on biochemical properties of petroleum contaminated soils. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 2011, 20, pp. 234-248.
22. **Γιδαράκος Ε., και Αϊβαλιώτη Μ.** Τεχνολογίες αποκατάσταση εδαφών και υπογείων υδάτων απο επικίνδυνους ρύπους. 2005, 4, pp. 180-181.



23. **Jordan, R.E. and Payne, J.R.** Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment. 1980.
24. **Sea, Mandate of the Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean.** OPERATIONAL GUIDELINES AND TECHNICAL DOCUMENTS Section 1 Guide for Combating Accidental Marine Pollution in the Mediterranean Sea.
http://www.rempec.org/rempec_search.asp?theIDS=2_215&TheName=Combating%20accidental%20marine%20pollution&TheID=15&daChk=2&pgType=1&Thefile=0_215.asp. [Online]
25. **National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), Office of Response and Restoration.** <http://response.restoration.noaa.gov/oil-and-chemical-spills/oil-spills/oil-types.html> . [Online] 2015.
26. **International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF), Fate of Oil Spills-Weathering.** <http://www.itopf.com/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/weathering/>. [Online] 2015.
27. **Jordan, R.E. and Payne, J.R.** Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment. 1980.
28. **Nicodem, D.E., Fernandes, M.C., Guedes, C.L.B., Correa, R.J.** Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. *Biogeochemistry*. 1997, 39, pp. 121-138.
29. **Burland, S.M. & Edwards, E.A.** Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. 2, 1999, Vol. 2, pp. 529-533.
30. **Salminen, J.M., Tuomi, P.M. and Suortti, A. & Jørgensen, K.S.** Potential for Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Boreal Subsurface. *Biodegradation*. 1, 2004, Vol. 15, pp. 29-39.
31. **Head, L.M., Jones, D.M., and Roling, W.F.M.** Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*. 2006, 4, pp. 173-182.
32. **Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N.** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 2007, pp. 257-266.



33. **Pinholt, Y., Struwe, S. and Kjoller, A.** Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecology*. 1979, 2, pp. 195-200.
34. **Karrick, N.L.** Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. *.In Malins (Ed) Effects of Petroleum on Arctic and Subartic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum*. 1977, pp. 225-299.
35. **Martín, Yaima Barrios San.** Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. 2011.
36. **van Hamme, J. D., Singh, A. & Ward, O. P.** Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003, 67, pp. 503-536.
37. **Ulrici, W.** Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants in Environmental Process II. *Soil Decontamination Biotechnology*, H. J. Rehm and G. Reed, Eds. 2000, Vol. 11, pp. 5-42.
38. **Kingsley Urum, Turgay Pekdemir.** Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*. 2004, 57, pp. 1139-1150.
39. **Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S.** Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12(1), pp. 633-654.
40. **Rita de Cássia F. S. Silva, Darne G. Almeida, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos, Leonie Asfora Sarubbo.** Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *Internation Journal of Molecular Science*. 2014.
41. **Μαρία, Νικολοπούλου.** Ενισχυμένη βιοδιέγερση εγγενών θαλάσσιων μικροοργανισμών με τη χρήση λιπόφιλων λιπασμάτων σε συνδυασμό με επιφανειοδραστικές βιολογικές ουσίες για αποικοδόμηση πετρελαιοκηλίδων. *Πολυτεχνείο Κρήτης*. 2005, pp. 38-39.
42. **EPA.** 40 Code of Federal Regulations. Chapter 1, Part 300, Appredix C.
43. **EPA.** Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test. *40 CFR Part 300 Appendix C*. 2003.



44. Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification. p. 32.

45. **Brochure, Sime Darby Unimills Lecithin.**

46.

http://www.momar.com/item/6160/FUEL_AND_OIL_BE_GONE__TM_12_017_.

[Online]

47. <http://www.compo-expert.com/gr/proionta/ygralipasmata.html>. [Online]

48. http://www.pindos-apsi.gr/products/factory_products. [Online]