



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΟΡΥΚΤΩΝ ΠΟΡΩΝ**

**Τομέας Μεταλλευτικής Τεχνολογίας – Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας  
Υδρογονανθράκων**

---

TECHNICAL UNIVERSITY OF CRETE

MINERAL RESOURCES ENGINEERING DEPARTMENT

Division of Mining Technology – Hydrocarbons Chemistry and Technology

**«ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ  
ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ - Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Άγγελος Τσαχουρίδης**

Εξεταστική Επιτροπή

Νικόλαος Πασαδάκης, Αναπλ. Καθηγητής Π.Κ (επιβλέπων)

Νικόλαος Βαρότσης, Καθηγητής Π.Κ

Μαρία Νικολοπούλου, Διδάκτωρ Π.Κ

Χανιά, 2015

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία 50 χρόνια περισσότεροι από 4.500.000 τόνοι πετρελαίου έχουν διαρρεύσει στην θάλασσα κατά την παραγωγή, επεξεργασία, αποθήκευση και μεταφορά του. Η ρύπανση των θαλασσών από πετρελαιοειδή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες καταστροφής της χλωρίδας και της πανίδας στην έκταση που καταλαμβάνουν. Οι πετρελαιοκηλίδες μπορούν να προκληθούν από ατυχήματα σε πετρελαιοφόρα δεξαμενόπλοια, από τον παράνομο καθαρισμό των δεξαμενών καυσίμου των πλοίων στην ανοιχτή θάλασσα, την απόρριψη χρησιμοποιημένων λιπαντικών και υπολειμμάτων καύσης αλλά και από ατυχήματα σε εξέδρες υποθαλάσσιων γεωτρήσεων. Γεγονός είναι ότι δεν χρειάζονται μεγάλες ποσότητες για να προκληθεί σημαντική καταστροφή καθώς το πετρέλαιο όταν διαρρεύσει σχηματίζει μια λεπτή μεμβράνη στην επιφάνεια του ωκεανού που μπορεί να μεταφερθεί σε πολύ μακρινές αποστάσεις ή να διασπαστεί και να αναμιχθεί με το νερό όταν επικρατούν ισχυροί άνεμοι στην περιοχή. Για τους οργανισμούς η πετρελαιική ρύπανση έχει τοξική δράση καθώς αποτρέπει την απορρόφηση σημαντικών θρεπτικών ουσιών. Η απώλεια της μόνωσης και οι υδρόφοβες ιδιότητες του πετρελαίου έχουν καταστροφικά αποτελέσματα στα ζώα ενώ, τέλος, ακόμη και διαρροές μικρών ποσοτήτων μπορούν να αποβούν καταστροφικές ανάλογα με τον τύπο του πετρελαίου, την ενδημική βλάστηση, την εποχή και την ισχύ του ανέμου.

Η εξυγίανση του περιβάλλοντος σε περιπτώσεις μεγάλων διαρροών αποτελεί ιδιαίτερα σύνθετο τεχνολογικά επίτευγμα. Στις περιπτώσεις αυτές, εξαιρετικά αποτελεσματική έχει αποδειχθεί η μέθοδος της ενισχυμένης βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου η οποία στηρίζεται στην ικανότητα κάποιων μικροοργανισμών -βακτηρίων και μυκήτων- να αποδομούν το πετρέλαιο σε σχετικά αβλαβείς ουσίες δίνοντας ως τελικά προϊόντα το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και το νερό. Η προαναφερθείσα διαδικασία μπορεί να επιταχυνθεί με την χρήση ορισμένων θρεπτικών συστατικών όπως ο φώσφορος και το άζωτο, τα οποία δρουν στην διεπιφάνεια OIL-WATER (νερού-πετρελαίου) και ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίον κάποια λιπόφιλα φυσικά και χημικά λιπάσματα όπως η λεκιθίνη, το Basfoliar Avant Natur SL αλλά και

ένα surfactant (επιφανειακά ενεργή ουσία) επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της βιοαποδόμησης του πετρελαίου. Η εκτίμηση στηρίχθηκε στις μεταβολές της συγκέντρωσης χαρακτηριστικών συστατικών του πετρελαίου και πιο συγκεκριμένα των κανονικών αλκανίων, των αρωματικών συστατικών και των ισοπρενοειδών.

## **ΣΤΟΧΟΣ**

Στην παρούσα διπλωματική επιδιώκεται, σε πρώτο στάδιο, η όσο το δυνατόν πλήρης και σφαιρική περιγραφή της μεθόδου της βιοαποδόμησης του πετρελαίου σε υδάτινο περιβάλλον, και ο προσδιορισμός του καλύτερου συνδυασμού θρεπτικών συστατικών (nutrients), με τον οποίο επιτυγχάνεται η ταχύτερη βιοαποδόμηση.

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η Διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανάλυσης Ρευστών και Πυρήνων Υπόγειων Ταμιευτήρων και η πραγμάτωσή της έτυχε της υποστήριξης του ανθρώπινου Δυναμικού του τομέα και που θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Πασαδάκη Νικόλαο για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, για την πολύτιμη βοήθειά του όλο το διάστημα που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε για την διόρθωσή της.

Μεγάλες ευχαριστίες στην Μαρία Νικολοπούλου, του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος για την βοήθεια, την καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών καθώς και κατά την επεξεργασία των μετρήσεών μου.

Την συνάδελφο μου Ηλέκτρα Δρυγιαννάκη για την ιδιαίτερα καλή συνεργασία μας κατά την διεξαγωγή των κοινών πειραματικών διαδικασιών καθώς και την Ελένη Χαμηλάκη για τη συνεχή βοήθεια και στήριξή της στο χώρο του Εργαστηρίου.

Την τριμελή Εξεταστική Επιτροπή που αποτελούν οι κ.κ Νικόλαος Πασαδάκης, Νικόλαος Βαρότσης και Μαρία Νικολοπούλου, που δέχθηκαν να αξιολογήσουν την Διπλωματική μου εργασία.

Τέλος θα ήθελα να αφιερώσω τη Διπλωματική μου εργασία στην οικογένειά μου, τους γονείς και την αδελφή μου, για την στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια για τις επιλογές και τις προσπάθειές μου.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	2
<b>ΣΤΟΧΟΣ</b> .....	3
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	3
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
1.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	7
1.2. ΑΙΤΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ .....	12
1.3. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ – Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ .....	17
1.3.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	17
1.3.2. ΜΗ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	18
1.3.3. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	20
1.3.4. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΩΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ .....	21
1.3.5. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ .....	25
<b>2. Η ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ</b> .....	27
2.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ .....	27
2.1.1. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ-ΓΗΡΑΝΣΗ .....	28
2.1.2. Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ .....	34
2.1.3. ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΕ 40	
2.1.4. Η ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΕ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ- ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	44
<b>3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ...</b> .....	63
3.1. ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ .....	63
3.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ .....	64
3.3. ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ – ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ .....	67
3.3.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	67
3.3.2. ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	69
3.3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ .....	71

3.3.4.	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ .....	72
3.3.5.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΩΝ-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ GC-MS 75	
3.4.	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	80
	<b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	95
	<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	98
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	99

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το ενδιαφέρον των μέσων ενημέρωσης δείχνει να αυξάνεται κάθε φορά που συμβαίνει ένα σοβαρό ατύχημα διαρροής πετρελαίου από κάποιο δεξαμενόπλοιο στη θάλασσα. Ο ΙΤΟΡΡ (International Tanker Owners Pollution Federation) διατηρεί μια βάση δεδομένων στην οποία καταγράφονται όλες οι πετρελαιοκηλίδες που προκλήθηκαν από ατυχήματα σε tankers και άλλα φορτηγά πλοία. Η βάση δεδομένων περιέχει πληροφορίες ατυχημάτων διαρροής από το 1970 μέχρι και σήμερα ενώ εξαιρούνται από αυτήν περιστατικά που προκλήθηκαν κατά την διάρκεια εμπόλεμων καταστάσεων. Τα δεδομένα που αποθηκεύονται, περιλαμβάνουν τον τύπο και την ποσότητα του πετρελαίου που διέρρευσε, την τοποθεσία και το αίτιο που προκάλεσε το ατύχημα και τέλος τα σκάφη που ενεπλάκησαν σε αυτό. Για ιστορικούς κυρίως λόγους οι πετρελαιοκηλίδες κατηγοριοποιούνται βάσει μεγέθους ως εξής : Πετρελαιοκηλίδες **μικρότερες των 7 τόνων**, μεταξύ **7 και 700 τόνων** και **μεγαλύτερες των 700 τόνων** (<50 bbls, 50-5.000 bbls, >5.000 bbls). Πάνω από 10.000 ατυχήματα έχουν καταχωρηθεί, το 81% των όποιων ανήκει στην πρώτη κατηγορία.

Το προηγούμενο έτος δημιουργήθηκαν 3 πετρελαιοκηλίδες μεγαλύτερες των 700 τόνων, με το ένα περιστατικό να αντιπροσωπεύει την συντριπτική πλειοψηφία του συνόλου. Στις 15 Οκτωβρίου του 2013, το tanker YONG WIN 3 ανετράπη και βυθίστηκε απελευθερώνοντας περίπου 5.000 τόνους πετρελαίου Diesel, ανοιχτά της Ταϊwan. Τέτοιου είδους περιστατικά αποδεικνύουν το πόσο απρόβλεπτα μπορούν να είναι αυτά τα ατυχήματα και αναδεικνύουν την σημασία της κατάλληλης προετοιμασίας για την αντιμετώπιση τους. Επίσης άλλες τέσσερις μετρίου μεγέθους πετρελαιοκηλίδες διαφόρων τύπου πετρελαίου κατεγράφησαν, αυξάνοντας τον αριθμό σε συνολικά 7 κηλίδες άνω των 7 τόνων για το 2013.



**Εικόνα 1.1 :** Πετρελαιοφόρο YONG WIN 3

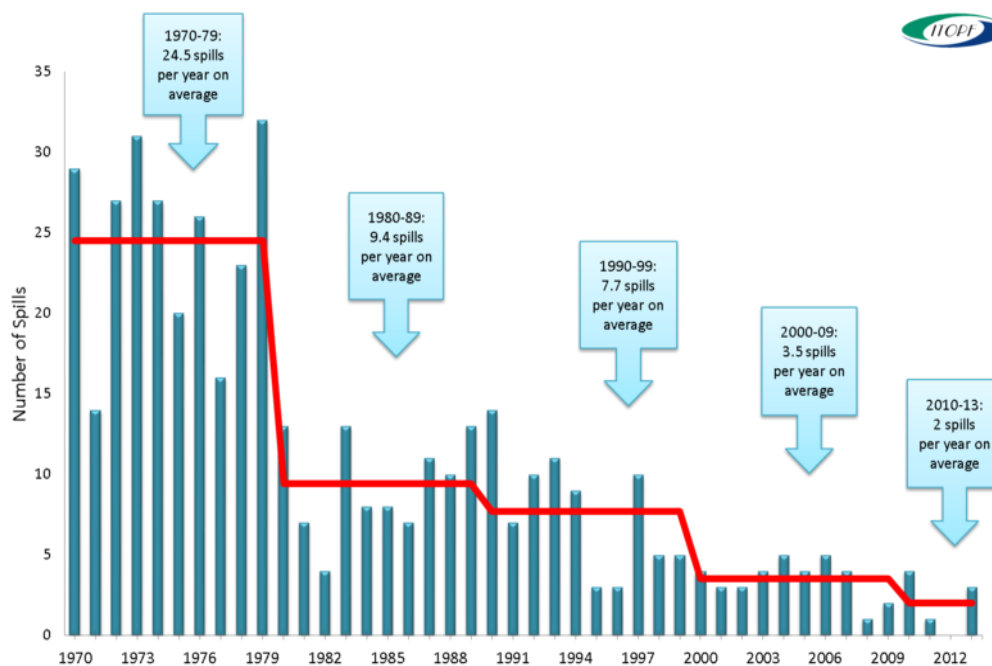
Το υλικό που διαρρέει στην θάλασσα (αργό πετρέλαιο ή διυλισμένο προϊόν) προκαλεί θαλάσσια ρύπανση αλλά και ρύπανση του εδάφους με τρομερά δυσμενείς για το περιβάλλον συνέπειες. Το 30% των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων που διαρρέουν στην επιφάνεια της θάλασσας αποτελούνται από πτητικά συστατικά τα οποία εξατμίζονται σχετικά γρήγορα, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά σχηματίζουν μια λεπτή μεμβράνη η οποία εμποδίζει τις φυσικές ανταλλαγές που συμβαίνουν του μεταξύ νερού και του ατμοσφαιρικού αέρα και οι οποίες είναι απαραίτητες για τον βιολογικό κύκλο της θαλάσσιας ζωής. Πιο συγκεκριμένα, η μεμβράνη αυτή μειώνει στο ελάχιστο την ανανέωση του νερού με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, εμποδίζει τις ακτίνες του ηλίου να εισχωρήσουν βαθύτερα στην θάλασσα για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και υπερβολική ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν οξυγόνο. Αξιοσημείωτες είναι επίσης οι επιπτώσεις των πετρελαιοκηλίδων στην αλιεία και τον τουρισμό των περιοχών που επλήγησαν. Υπολογίζεται ότι κάθε έτος απελευθερώνονται στο περιβάλλον **1.7-8.8 εκατομμύρια** τόνοι πετρελαίου εκ των οποίων το **12%** προέρχεται από ατυχήματα πετρελαιοφόρων ενώ το υπόλοιπο **88%** οφείλεται σε καθημερινές ανθρώπινες δραστηριότητες.



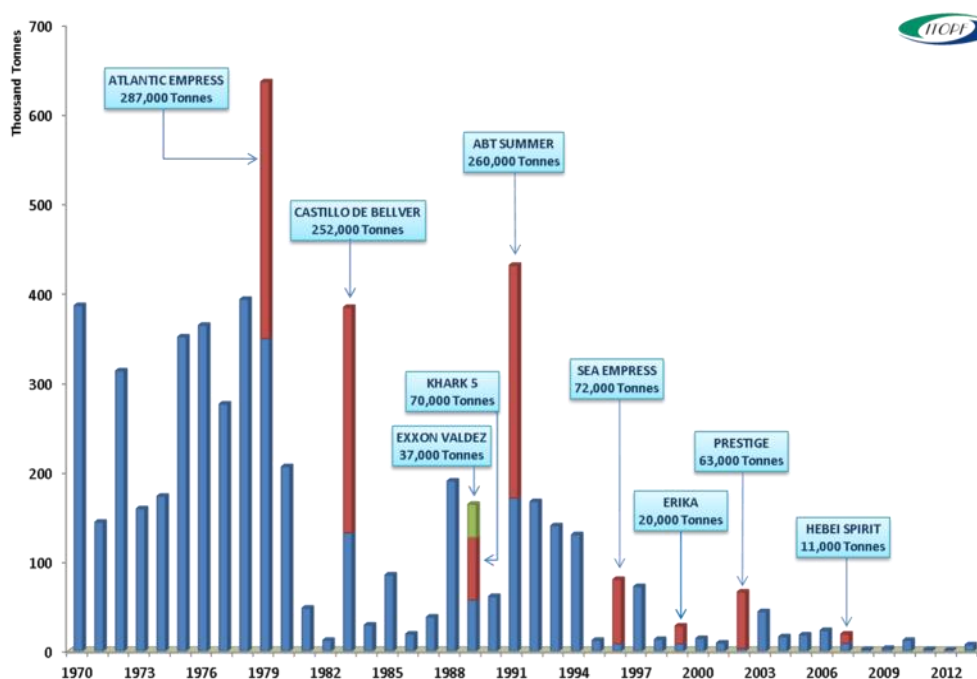


**Εικόνα 1.2 :** Παραδείγματα οικολογικής καταστροφής από ατύχημα πετρελαιοφόρου- δημιουργία χαρακτηριστικής μεμβράνης στην επιφάνεια του νερού.

Το **διάγραμμα 1.1** αναπαριστά τον αριθμό των πετρελαιοκηλίδων μεγάλου μεγέθους (>700ton) από το 1970 μέχρι το 2013 ενώ το **διάγραμμα 1.2** περιγράφει ποσοτικά τις διαρροές αυτές.



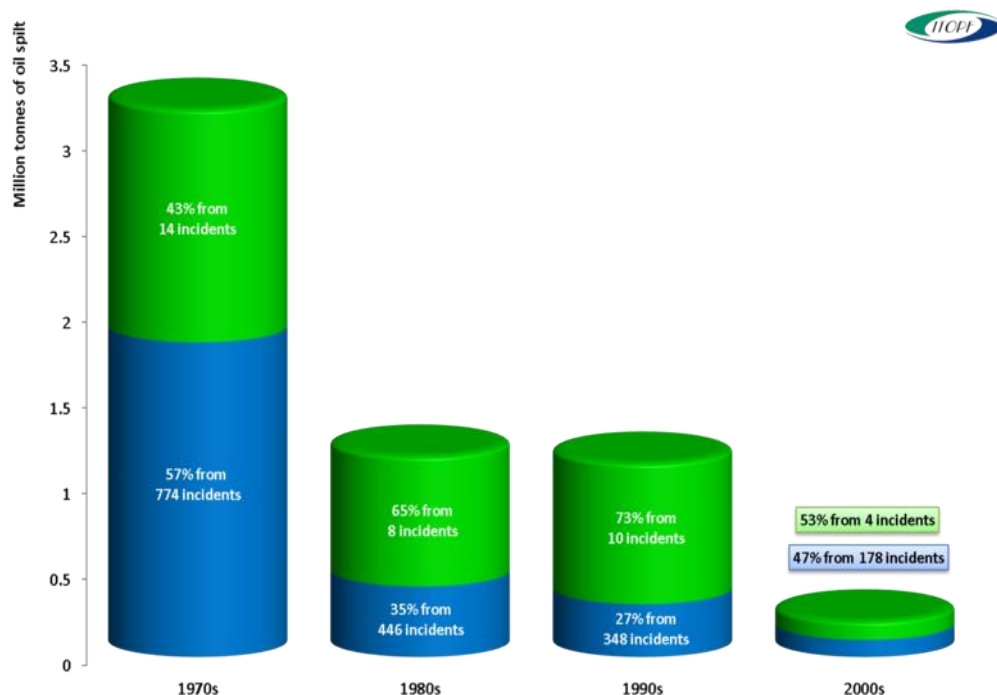
Διάγραμμα 1.1 : Κατανομή μεγάλων πετρελαιοκηλίδων μεταξύ 1970 και 2013.



Διάγραμμα 1.2 : Ποσοτική κατανομή πετρελαιοκηλίδων μεταξύ 1970 και 2013.

Από τα διαγράμματα 1.1 και 1.2 παρατηρείται μια σημαντική μείωση, τόσο αριθμητική όσο και ποσοτική, των ατυχημάτων μεταξύ 1970 και 2013. Πιο συγκεκριμένα, κατά την δεκαετία του 1990, συνέβησαν **358** διαρροές μεγαλύτερες των 7 τόνων, καταλήγοντας σε συνολικές απώλειες **1.133.000** τόνων πετρελαίου. Το 73% αυτού του ποσοστού διέρρευσε σε μόλις 10 ατυχήματα. Την δεκαετία του 2000, συνέβησαν **182** διαρροές μεγαλύτερες των 7 τόνων, καταλήγοντας σε συνολικές απώλειες **213.000** τόνων πετρελαίου. Το 53% αυτού του ποσοστού διέρρευσε σε 4 ατυχήματα ενώ τέλος, κατά την τετραετία 2010 -2013, συνέβησαν **28** διαρροές μεγαλύτερες των 7 τόνων καταλήγοντας σε συνολικές απώλειες **22.000** τόνων πετρελαίου. Το 90% αυτού του ποσοστού διέρρευσε σε μόλις 8 ατυχήματα. Εν κατακλείδι, συμπεραίνεται ότι το 55% περίπου των μεγάλων διαρροών συνέβησαν την δεκαετία του 1970 με το ποσοστό αυτό να μειώνεται με σταθερό ρυθμό μέχρι σήμερα.

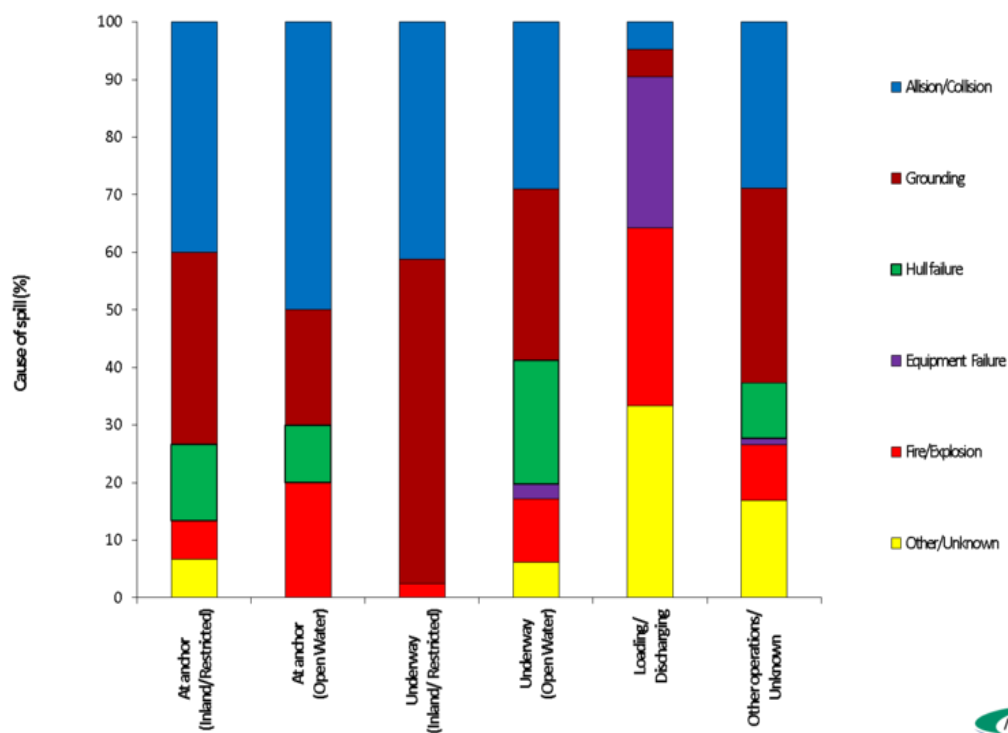
Σχηματικά, τα παραπάνω συμπεράσματα συνοψίζονται στο διάγραμμα 1.3:



**Διάγραμμα 1.3 :** Ετήσια ποσότητα πετρελαίου που εισήλθε στο θαλάσσιο περιβάλλον τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες.

## 1.2. ΑΙΤΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ

Τα ατυχήματα των τάνκερ στη θάλασσα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, στα ατυχήματα που συμβαίνουν λόγω φορτώσεων και εκφορτώσεων στους τερματικούς σταθμούς, και στα ατυχήματα των τάνκερ στην ανοιχτή θάλασσα. Κατά την περίοδο 1970 με 2013, το 50% των μεγάλων πετρελαιοκηλίδων δημιουργήθηκαν όταν τα σκάφη βρίσκονταν σε διεθνή ύδατα. Υπό αυτές τις συνθήκες, το 59% των ατυχημάτων προκλήθηκαν από συγκρούσεις, προσκρούσεις και προσαράξεις. Σε αυτά τα αίτια οφείλεται ένα ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό ατυχημάτων όταν τα εν λόγω σκάφη βρίσκονταν εντός χωρικών υδάτων, με τελικό αποτέλεσμα, το 88% των συνολικών πετρελαιοκηλίδων να οφείλεται σε αυτά. Δεν είναι λίγα και τα ατυχήματα που οφείλονται σε φυσικά φαινόμενα όπως οι σφοδροί άνεμοι, τα παλιρροιακά ρεύματα, η ομίχλη και η ύπαρξη φυσικών επαρμάτων (ύφαλοι), κυρίως κοντά σε ακτές και διάφορα αβαθή. Το **διάγραμμα 1.4** παρουσιάζει ποσοστιαία τις κύριες αιτίες διαρροής πετρελαίου στο περιβάλλον από το 1970 έως το 2013.



**Διάγραμμα 1.4 :** Κύριες αιτίες διαρροής του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον μεταξύ 1970 και 2013.

Διαπιστώνεται ότι τα περισσότερα ατυχήματα των δεξαμενοπλοίων συμβαίνουν κοντά σε ακτές ή σε περιοχές υψηλής κυκλοφορίας , ενώ οι απώλειες πλοίων ή και φορτίων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής :

- Συγκρούσεις / Προσκρούσεις δεξαμενοπλοίων
- Προσαράξεις
- Τεχνικές βλάβες στο πλοίο
- Βλάβες στον εξοπλισμό
- Εκρήξεις / Πυρκαγιές
- Ατυχήματα που οφείλονται σε δυσμενείς κλιματολογικές συνθήκες
- Άλλες αιτίες

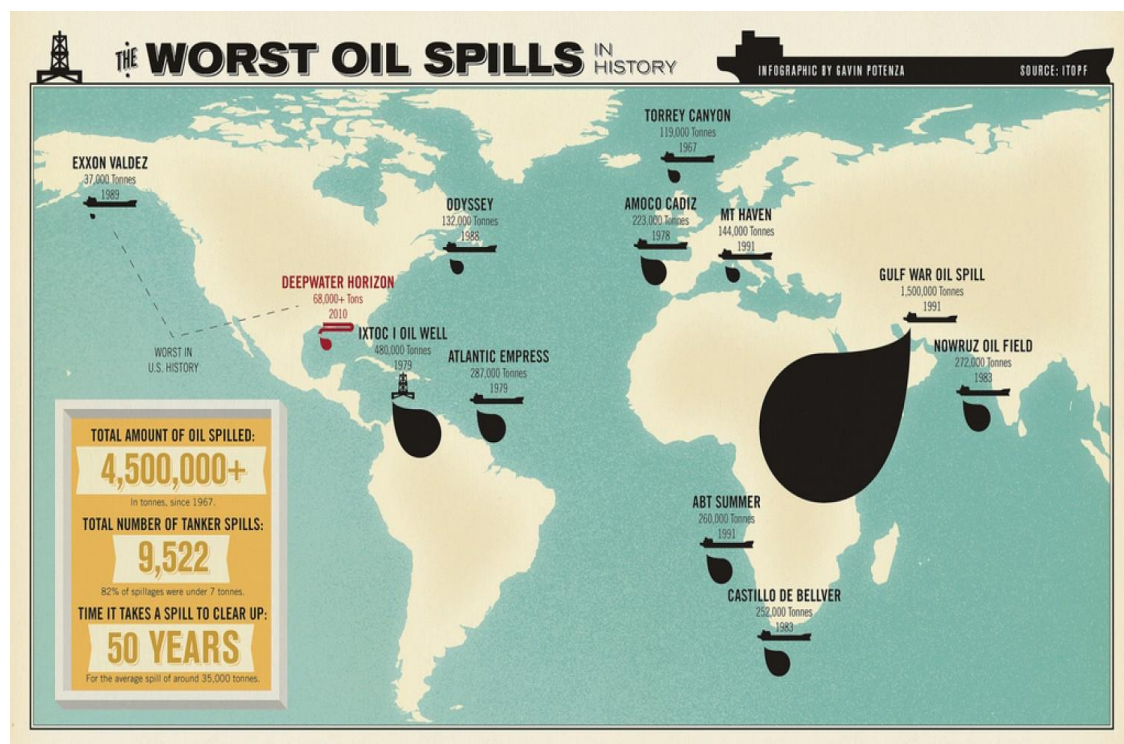
#### ΟΙ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΕΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΕΣ ΔΙΕΘΝΩΣ

Στον **πίνακα 1.1.** παρατίθενται τα μεγαλύτερα ατυχήματα που οδήγησαν σε διαρροή πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον από το 1967 έως το 2010.

Πίνακας 1.1.

Έτος	Όνομα Σκάφους/Oil Well	Τόνοι που διέτρευσαν	Περιοχή
1967	Torrey Canyon	119.000	Cornwall, England
1978	Amoco Cadiz	223.000	Portsall Rocks, Brittany
1979	Atlantic Empress	287.000	Near the island of Tobago, Caribbean Sea
1979	Ixtoc I Oil Well	454.000	Bay of Campeche, Mexico
1983	Castillo de Bellver	252.000	Of Cape Town, South Africa

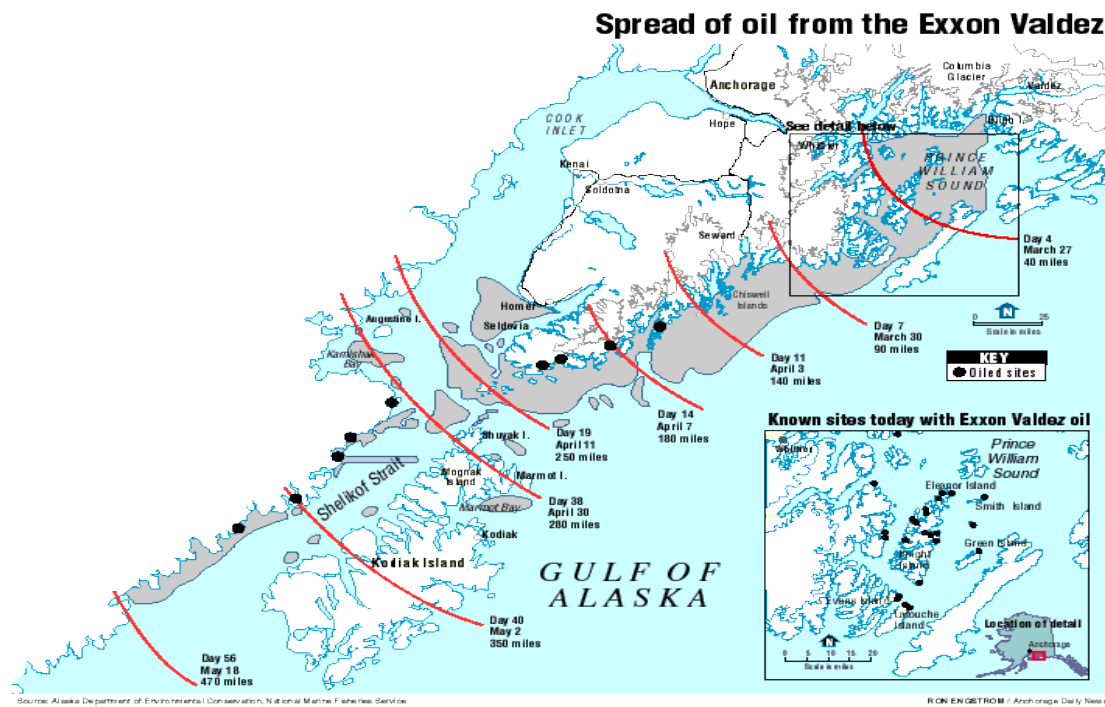
1983	Nowruz Oil Field	260.000	Iran
1988	Odyssey	132.000	Nova Scotia, Canada
1989	<b><u>Exxon Valdez</u></b>	37.000	Prince William Sound, Alaska
1991	ABT Summer	260.000	800 miles west of Angola
1991	M/T Haven	145.000	Genoa, Italy
1991	Gulf War Oil Spill	<b><u>1.500.000</u></b>	Kuwait
2010	<b><u>Deepwater</u></b> <b><u>Horizon</u></b>	70.000	Mexico Gulf



**Χάρτης 1.1 :** Τα σημαντικότερα ατυχήματα διαρροής πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον παγκοσμίως.

Ξεχωριστή θέση μεταξύ των ατυχημάτων του **Πίνακα 1.1** κατέχει η πετρελαιοκηλίδα του Exxon Valdez καθώς εκείνη την εποχή αποτέλεσε την πιο καταστροφική, από περιβαλλοντική άποψη, πετρελαιοκηλίδα που είχε συμβεί ποτέ στις ΗΠΑ. Συνολικά 11.000.000 γαλόνια πετρελαίου (περίπου 37.000 τόνοι) διέρρευσαν από το Exxon Valdez μετά την πρόσκρουση του με γεωλογικούς σχηματισμούς του υφάλου Bligh. Μετά από 2 μήνες, η εξάπλωση του πετρελαίου ήταν τεράστια, δημιουργώντας ένα “μονοπάτι” το οποίο εκτινόταν 470 μίλια προς τα νοτιοδυτικά. Η οικολογική καταστροφή ήταν ανυπολόγιστη με χιλιάδες νεκρά ζώα και τοπικά οικοσυστήματα να απειλούνται με εξαφάνιση, ενώ η συνολική επίδραση της πετρελαιοκηλίδας παραμένει ως και σήμερα άγνωστη. Η **εικόνα 1.3** δείχνει την εξάπλωση της πετρελαιοκηλίδας νοτιοδυτικά του υφάλου Bligh με την συνολική περιοχή διαρροής της να ξεπερνάει τα 11.000 ναυτικά μίλια. Οι κύριες στρατηγικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον περιορισμό της ήταν, αρχικά το πλύσιμο των ακτογραμμών με νερό υψηλής πίεσης, και στην συνέχεια εφαρμογή της μεθόδου της βιοεξυγίανσης (bioremediation) με την χρήση χημικών λιπασμάτων που περιείχαν άζωτο(N) και φώσφορο(P). Η χρήση της βιοεξυγίανσης, σαν συμπληρωματική τεχνολογία καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας του Exxon Valdez, παρουσίασε ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα και ανέδειξε τα πιθανά προβλήματα που ενδέχεται να προκύψουν από την πρακτική και ευρείας κλίμακας εφαρμογή της μεθόδου. Επίσης, έρευνες που διεξήχθησαν από επιστήμονες της U.S Environmental Protection Agency, απέδειξαν ότι η βιοαποδόμηση του πετρελαίου από την ιθαγενή χλωρίδα της περιοχής επιταχύνθηκε σημαντικά με την απευθείας προσθήκη χημικών (ελαιόφιλων) λιπασμάτων στην επιφάνεια των μολυσμένων από το πετρέλαιο ακτών. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση των λιπασμάτων είχε ως αποτέλεσμα σχεδόν διπλάσια ποσότητα του πετρελαίου να βιοαποδομείται από τους μικροοργανισμούς. Η εκτίμηση στηρίχθηκε στην μεταβολή της σύστασης των υδρογονανθράκων και στην μεταβολή του όγκου ανά μονάδα μάζας του πετρελαίου που διέρρευσε.





**Εικόνα 1.3 :** Εξάπλωση του πετρελαίου που διέρρευσε από το Exxon Valdez



**Εικόνα 1.4 :** Αεροφωτογραφία της πετρελαιοκηλίδας του Exxon Valdez



### **1.3. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ – Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ**

Οι πετρελαιοκηλίδες όπως αναφέρθηκε και παραπάνω προκαλούνται είτε από ανθρώπινες δραστηριότητες και λάθη, είτε από φυσικά αίτια όπως προσκρούσεις με γεωλογικούς σχηματισμούς και δυσμενείς κλιματολογικές συνθήκες. Διακρίνονται σε θαλάσσιες (ανοιχτής θαλάσσης) και παράκτιες (ή αλλιώς χερσαίες), ενώ ο τρόπος αντιμετώπισης τους εξαρτάται άμεσα από τον τύπο του πετρελαίου και τα χαρακτηριστικά της πληγείσας περιοχής. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες για τον περιορισμό των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον οι οποίες αναθεωρούνται και εξελίσσονται συνεχώς.

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων διακρίνονται σε φυσικές, χημικές και μη χημικές μεθόδους.

#### **1.3.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**Η φυσική βιοεξυγίανση** (natural attenuation) είναι μια μέθοδος κατά την οποία η πετρελαιοκηλίδα αφήνεται να απομακρυνθεί ή να αποικοδομηθεί με φυσικό τρόπο, όταν δεν βρίσκεται κοντά σε παράκτιες περιοχές. Η συνδυασμένη επίδραση του ήλιου, του αέρα και των θαλασσίων ρευμάτων εξατμίζει το πετρέλαιο. Σε πολλές περιπτώσεις η μέθοδος αυτή προτιμάται καθώς είναι οικολογικά πιο υγιές αλλά και οικονομικά πιο συμφέρον να αφαιρεθεί η μολυσμένη περιοχή να ανακτηθεί με φυσικό τρόπο. Συνήθως εφαρμόζεται σε πετρελαιοκηλίδες που δημιουργήθηκαν σε απρόσιτες περιοχές, όταν τα φυσικά ποσοστά απομάκρυνσης είναι μεγάλα αλλά και σε οικολογικά ευαίσθητες περιοχές όπου οι διάφορες ενέργειες καθαρισμού είναι πιθανότερο να επιβαρύνουν την υπάρχουσα κατάσταση παρά να επιφέρουν τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα.

### 1.3.2. ΜΗ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

**1) Ανάκτηση με την χρήση ειδικών πλοιαρίων (Booming and Skimming) :** Στην μέθοδο αυτή ο περιορισμός της πετρελαιοκηλίδας και η ανάκτηση του επιπλέοντος πετρελαίου γίνεται με την χρήση πλωτών φραγμάτων. Ο βασικός σκοπός της μεθόδου είναι να συγκρατηθεί και να ελεγχθεί η μετακίνηση του επιπλέοντος πετρελαίου.



**Εικόνα 1.5 :** Εφαρμογή της μεθόδου Booming and Skimming στον κόλπο του Μεξικού.

**2) Μηχανική απομάκρυνση :** Πραγματοποιείται με την συλλογή και απομάκρυνση των ρυπασμένων με πετρέλαιο επιφανειών με την χρήση μηχανικού εξοπλισμού. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται όταν χρειάζεται να απομακρυνθούν σχετικά μικρές ποσότητες ρυπασμένων επιφανειών.

**3) Πλύση ακτογραμμών :** Γίνεται έκπλυση του πετρελαίου που έχει παραμείνει κατά μήκος των ακτογραμμών της ευρύτερης περιοχής που μολύνθηκε. Διακρίνονται 2 στρατηγικές αντιμετώπισης, η έκπλυση χαμηλής πίεσης με κρύο νερό και η έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Συνήθως επιλέγεται η έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Αξίζει να σημειωθεί πως η μέθοδος αυτή δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε ευαίσθητα οικοσυστήματα και βιοτόπους λόγω της πιθανής διάβρωσης που ενδέχεται να προκαλέσει.



**Εικόνα 1.6 :** Πλύσιμο των ακτογραμμών της παραλίας Quayle, νήσος Smith, Αλάσκα.

**4) Wiping with absorbent materials (Καθαρισμός με απορροφητικά υλικά) :**

Γίνεται με την χρήση υδροφοβικών ουσιών για την απομάκρυνση του πετρελαίου από την ρυπασμένη επιφάνεια. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος αυτή θεωρείται επιτακτικό να ελέγχεται η κυκλοφορία των πληρωμάτων καθαρισμού και η παραγωγή των αποβλήτων συνεχώς, καθώς σε αντίθετη περίπτωση η όλη διαδικασία ενδέχεται να προκαλέσει επιπρόσθετη περιβαλλοντική επιβάρυνση.

**5) Χρήση βιολογικών παραγόντων :** Ιδιαίτερα αποτελεσματική και ταυτόχρονα οικονομική μέθοδος στην οποία γίνεται χρήση μικροοργανισμών με σκοπό την βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η βιοεξυγίανση μέσω της **βιοενίσχυσης** (προσθήκη βακτηρίων που αποδομούν το πετρέλαιο) και της **βιοδιέγερσης** (προσθήκη θρεπτικών N&P ή άλλων περιοριστικών παραγόντων) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων μετά την χρήση συμβατικών μεθόδων άμεσης αντιμετώπισης (booming and skimming - μηχανική συλλογή) ενώ σύμφωνα με πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως άμεσος τρόπος αποκατάστασης. Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποδομούν τα περισσότερα συστατικά του πετρελαίου σε σχετικά αβλαβείς ουσίες όπως το διοξείδιο του άνθρακα ενώ η προσθήκη ελαιοφίλων λιπασμάτων που περιέχουν άζωτο και φώσφορο όχι μόνο επιταχύνει την διαδικασία αλλά και ενισχύει την ικανότητα των μικροοργανισμών να διασπούν τα συστατικά του πετρελαίου.

### 1.3.3. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε πολλές χώρες ως ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων. Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις θεωρούνται μη αποτελεσματικές καθώς δεν είναι λίγοι αυτοί που υποστηρίζουν πως είναι ιδιαίτερα τοξικές και ενδέχεται να προκαλέσουν επιπρόσθετα, μακροχρόνια περιβαλλοντικά προβλήματα στις περιοχές που εφαρμόζονται.

**1) Χημικές Ενώσεις Διασποράς (Dispersing agents, Solidifiers, Demulsifiers, Surface film chemicals):** Είναι ενώσεις που περιέχουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν την φυσική διασπορά του πετρελαίου και να συμβάλουν στην μείωση των τοξικών επιδράσεων του. Με την διασπορά που επιτυγχάνουν, αυξάνεται η επιφάνεια του πετρελαίου και επιταχύνεται ο ρυθμός βιοαποδόμησής του. Η προσθήκη των ενώσεων αυτών γίνεται συνήθως με εναέριο τρόπο.

**2) Μέθοδος ελεγχόμενης καύσης :** Στην μέθοδο αυτή πραγματοποιείται καύση της μεμβράνης του πετρελαίου που δημιουργείται στην επιφάνεια του νερού με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός στερεού υπολείμματος το οποίο στην συνέχεια απομακρύνεται με ειδικό εξοπλισμό. Η μέθοδος αυτή, αν και παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα, παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Η καύση του πετρελαίου σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις απελευθερώνει σημαντικές ποσότητες CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, ενισχύοντας έτσι το φαινόμενο του θερμοκηπίου, αλλά και πολλά αλλά επιβλαβή αέρια τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη περιβαλλοντική ρύπανση και απειλούν την θαλάσσια πανίδα και χλωρίδα.



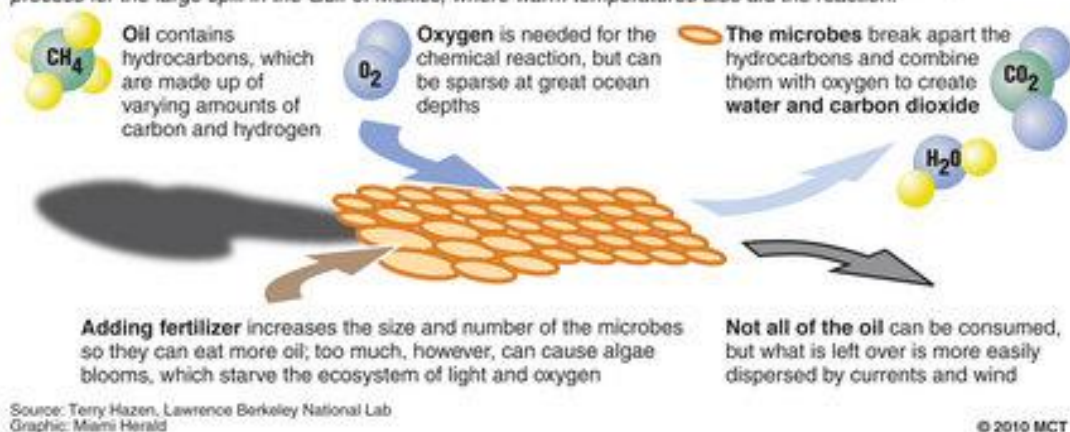
**Εικόνα 1.7 :** Εφαρμογή της μεθόδου ελεγχόμενης καύσης στην επιφάνεια της θάλασσας στην πλατφόρμα Deepwater Horizon.

#### 1.3.4. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΩΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ

Η βιοαποδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων πραγματοποιείται μέσω της δράσης μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, οι οποίοι αναπτύσσονται δεσμεύοντας την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων (αποσύνθεση). Οι μικροοργανισμοί αποσυνθέτουν τις οργανικές ενώσεις του πετρελαίου χρησιμοποιώντας ως καταλύτες κατάλληλα ένζυμα τα οποία παράγουν οι ίδιοι. Τα τελικά προϊόντα της αποσύνθεσης αυτής είναι το διοξείδιο του άνθρακα, βιομάζα και νερό ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ατελούς αποσύνθεσης υπάρχει παραγωγή και άλλων ενώσεων όπως υδρόθειο, μεθάνιο και διάφορες ενώσεις θείου και αζώτου. Η βιοεξυγίανση είναι μια σημαντική και ελπιδοφόρα μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες στον καθαρισμό αστικών λυμάτων με συστήματα βιολογικής επεξεργασίας ενώ μετά την επιτυχή εφαρμογή της σαν υποστηρικτική μέθοδος αντιμετώπισης στο ατύχημα του Exxon Valdez το 1989 έχει αρχίσει πλέον και χρησιμοποιείται ως άμεσος τρόπος αποκατάστασης που μελετάται και εξελίσσεται συνεχώς. Τα συστατικά του πετρελαίου είναι στο σύνολο του βιοδιασπώμενα με τα ελαφρύτερα, πτητικά συστατικά να διασπώνται γρηγορότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα βαρύτερα και δυσδιάλυτα συστατικά. Οι αρωματικές ενώσεις που περιέχουν έναν βενζολικό πυρήνα, τα λεγόμενα BTEX (benzene, toluene) είναι πιο εύκολα αποδομήσιμα σε σχέση με άλλες που περιέχουν δύο όπως το ναφθαλένιο ενώ γενικότερα, όσο πιο πολυαρωματική (PAH) είναι η ένωση τόσο πιο δύσκολα αποδομείται. Στην **εικόνα 1.8** παρατίθεται ο μηχανισμός της βιοδιάσπασης του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς που πρόσφατα εφαρμόστηκε εκτενώς στον κόλπο του Μεξικού.

## Oil-eating microbes

Naturally occurring microbes in the ocean feed on the hydrocarbons in oil. Scientists hope to speed up the process for the large spill in the Gulf of Mexico, where warm temperatures also aid the reaction.



**Εικόνα 1.8 :** Μηχανισμός βιοδιάσπασης πετρελαίου από μικρόβια με την προσθήκη ελαιοφίλων λιπασμάτων.

Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην εικόνα, τα μικρόβια αφομοιώνουν και διασπούν τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό και στην συνέχεια αποδεδμεύουν τα προϊόντα αυτά. Η προσθήκη λιπασμάτων αυξάνει το μέγεθος και τον αριθμό των μικροβίων και συνεπακόλουθα την ικανότητά τους να “τρώνε” το πετρέλαιο. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η παρουσία οξυγόνου, η οποία είναι αναγκαία για την πραγματοποίηση της βιοδιάσπασης των υδρογονανθράκων, βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση στα μεγάλα βάθη. Επίσης η προσθήκη υπερβολικής ποσότητας λιπασμάτων ενδέχεται να προκαλέσει το φαινόμενο του **ευτροφισμού**. Ο ευτροφισμός συνήθως εμφανίζεται σε κλειστούς, αβαθείς κόλπους και αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα κατά το οποίο δημιουργείται υπέρμετρη αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων που προκαλείται από τον εμπλουτισμό των νερών με απορροές θρεπτικών στοιχείων (νιτρικά και φωσφορικά ιόντα από λιπάσματα). Τα βακτήρια και οι άλγες γίνονται τόσα πολλά που σχηματίζουν φιλμ (κρούστα) στις υδάτινες επιφάνειες προκαλώντας σκίαση στα νερά κάτω από την επιφάνεια. Χωρίς φως, τα φύκια στον πυθμένα αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν και θανατώνονται προσφέροντας ακόμη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής σε άλλα βακτήρια που συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Καθώς ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται, η κατανάλωση του οξυγόνου αυξάνεται δραματικά με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επαρκές οξυγόνο για τα ψάρια, τα οποία είναι οι πρώτοι

οργανισμοί που πεθαίνουν ενώ ακολουθούν και τα βακτήρια δημιουργώντας έτσι ένα νεκρό οικοσύστημα. Ο ευτροφισμός διαπιστώνεται με φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς δείκτες. Στους φυσικούς δείκτες ανήκουν η μείωση του μέσου βάθους του υδάτινου οικοσυστήματος και η μείωση της διαφάνειας του νερού. Στους χημικούς δείκτες ανήκουν το έλλειμμα οξυγόνου στον πυθμένα, ο υπερκορεσμός του οξυγόνου στην επιφάνεια, η αύξηση του ανόργανου αζώτου και φωσφόρου, η αύξηση του ολικού αζώτου και φωσφόρου, η αύξηση του λόγου N/P και η μεταβολή του pH του νερού. Τέλος, στους βιολογικούς δείκτες ανήκουν η μείωση της ποικιλίας των βενθικών και φυτοπλαγκτονικών ειδών, η αύξηση της πρωτογενούς παραγωγικότητας, η αύξηση της βιομάζας των φυκιών και της χερσαίας βλάστησης και η αύξηση της βακτηριακής πυκνότητας. Ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης θα περιγραφεί εκτενώς στο κεφάλαιο 2.1.4.

Συνοψίζοντας, για να συντελεσθεί η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς απαιτούνται οι εξής προϋποθέσεις :

1. Η παρουσία μικροοργανισμών που παράγουν ένζυμα κατάλληλα για τον μεταβολισμό των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.
2. Η παρουσία υδρογονανθράκων που με την αποσύνθεση τους θα παράγουν την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
3. Η παρουσία θρεπτικών συστατικών – φώσφορος, άζωτο, κάλιο- τα οποία είναι επίσης απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
4. Η παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων (electron acceptors) δηλαδή ατόμων και ριζών τα οποία θα δέχονται τα ηλεκτρόνια που θα προκύπτουν κατά την οξείδωση των υδρογονανθράκων.
5. Η παρουσία κατάλληλων περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (θερμοκρασία, υγρασία, pH) για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
6. Η απουσία χημικών ουσιών που σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικές και ενδέχεται να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς.

Ως εκ τούτου θεωρείται επιτακτική η κατανόηση της λειτουργίας των μηχανισμών της βιοαποδόμησης των υδρογονανθράκων για την ανάπτυξη διαφόρων τεχνολογιών που θα κάνουν χρήση αυτού το βιολογικού μηχανισμού για την αντιμετώπιση ρυπασμένων θαλάσσιων επιφανειών.

Η **βιοεξυγίανση** έχει οριστεί ως “ η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης” (*Office of Technology Assessment, 1991*). Η εν λόγω τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπάσιμο στην φύση (*Atlas, R.M, 1984 ; Atlas, R.M. 1981 ; και Prince, R.C., 1993*).

Η επιτυχία ή μη της βιοεξυγίανσης εξαρτάται από την δυνατότητα καθιέρωσης και διατήρησης των συνθηκών που ευνοούν τους ρυθμούς ενισχυμένης βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο ρυπασμένο περιβάλλον. Σήμερα, η βιοεξυγίανση πραγματοποιείται με την χρήση δύο μηχανισμών, της **βιοενίσχυσης (bioaugmentation)** και της **βιοδιέγερσης (biostimulation)**.

- **Βιοενίσχυση (bioaugmentation) :** Η βιοενίσχυση είναι μια διεργασία όπου επιλεγμένα, προτυποποιημένα βακτήρια προστίθενται σε μία περιοχή που έχει μολυνθεί με μια ανεπιθύμητη ουσία έτσι ώστε τα βακτήρια να βιοδιασπάσουν τους ρύπους. Σήμερα, η επιστημονική πρόοδος παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης και μαζικής παραγωγής προβιοτικών βακτηρίων και μυκήτων (μικροοργανισμοί που ενδημούν σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα), σε βιομηχανοποιημένα εμβόλια με σκοπό τα σκευάσματα αυτά να χρησιμοποιηθούν για να καταπολεμήσουν συγκεκριμένους ρύπους. Η επιστημονική έρευνα για αυτά τα προτυποποιημένα CFU (colony forming units) μικροβιακά σκευάσματα απέδειξε την αποτελεσματικότητα της χρήσης τους στην ασφαλή αποκατάσταση πολυάριθμων περιπτώσεων ρύπανσης. Τα προβιοτικά σκευάσματα επιτρέπουν στην διαδικασία της βιοενίσχυσης να εξυγιάνει ρυπασμένες περιοχές με ρυθμό που μακράν ξεπερνά αυτόν της παρούσας τεχνολογίας οξυγόνωσης. Πλέον πολλοί από τους πιο τοξικούς περιβαλλοντικούς ρύπους είναι υποψήφιοι για βιοεξυγίανση. Αυτοί ποικίλλουν από μικρόβια που έχουν φυσική τάση προς υδρογονάνθρακες μέχρι άλλους οι οποίοι, μέσω ενός βασικού μηχανισμού ελέγχου γνωστού ως ανταγωνιστικός αποκλεισμός, περιορίζουν την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε υδάτινα περιβάλλοντα. Τέλος, για να είναι αποτελεσματική η διεργασία της βιοενίσχυσης θα πρέπει τα εν λόγω βακτήρια να είναι ικανά να επιζούν σε εχθρικά περιβάλλοντα και να κινούνται μέσω των πόρων του εκάστοτε ιζήματος.



- **Βιοδιέγερση (Biostimulation) :** Η βιοδιέγερση περιλαμβάνει την τροποποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών για την ενίσχυση των υπαρχόντων βακτηρίων ικανών για βιοεξυγίανση. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαφόρων θρεπτικών συστατικών και δεκτών ηλεκτρονίων (electron acceptors), όπως ο φώσφορος, το άζωτο, το οξυγόνο και ο άνθρακας (με την μορφή υδατανθράκων). Η βιοδιέγερση δύναται να ενισχυθεί από την βιοενίσχυση. Αυτή η μέθοδος γενικά είναι γνωστή ως βιοαποκατάσταση και είναι εγκεκριμένη από την EPA (US Environmental Protection Agency) για τον περιορισμό και την αντιμετώπιση διαρροών πετρελαίου και φυσικού αερίου. Το βασικό πλεονέκτημα της βιοδιέγερσης είναι ότι η βιοεξυγίανση θα πραγματοποιηθεί από τους ήδη υπάρχοντες, ιθαγενείς μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν προσαρμοστεί και είναι καλά κατανομημένοι χωρικά στο περιβάλλον κάτω και εντός της ρυπασμένης επιφάνειας, ενώ το βασικό μειονέκτημα της είναι ότι η προσθήκη ενισχυτικών εξαρτάται άμεσα από την γεωλογία της περιοχής της υπό-επιφανείας. Επίσης ένα άλλο μειονέκτημα είναι η ταχύτητα υλοποίησης της μεθόδου, καθώς τα αποτελέσματα της δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικά σε μικρό χρονικό διάστημα. Σε περιπτώσεις διαρροής πετρελαίου στην ανοιχτή θάλασσα, χρησιμοποιείται ως υποστηρικτική και όχι ως κύρια μέθοδος αντιμετώπισης, κυρίως λόγω της διάλυσης (το φυσικοχημικό φαινόμενο της διάλυσης, μαζί με τις άλλες διεργασίες που προκαλούν μεταβολή της σύστασης του πετρελαίου, θα αναλυθεί εκτενώς στο δεύτερο κεφάλαιο).

#### **1.3.5. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ**

Η βιοεξυγίανση ως τεχνολογία αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων που ανάλογα με την περιοχή και την έκταση ρύπανσης παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

### **1.3.5.1. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

Προκαλεί ελάχιστη φυσική διατάραξη μιας περιοχής, ιδιότητα που θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική σε ακτές όπου οι άλλες διαθέσιμες τεχνολογίες καθαρισμού ενδέχεται να προκαλέσουν επιπρόσθετα προβλήματα στην λειτουργία των βιοτόπων της ευρύτερης περιοχής. Επίσης θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη στην ταχύτερη απομάκρυνση κάποιων συγκεκριμένων τοξικών συστατικών του πετρελαίου (μικρού μοριακού βάρους αρωματικοί υδρογονάνθρακες) σε σχέση με την απλή εξάτμιση. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της βιοεξυγίανσης είναι ότι αποτελεί μια σχετικά απλή και χαμηλού κόστους μέθοδο που δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και χειρονακτική εργασία στην εφαρμογή της ενώ τέλος προκαλεί ελάχιστη φυσική διαταραχή και μικρά - βραχυπρόθεσμα περιβαλλοντικά προβλήματα στις περιοχές όπου εφαρμόζεται σωστά.

### **1.3.5.2. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

Δεν μπορεί να προκαλέσει σημαντικά αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα καθώς αν και μπορεί να λειτουργήσει γρηγορότερα σε σχέση με τις άλλες φυσικές / χημικές μεθόδους, τα αποτελέσματα της δεν θεωρούνται σημαντικά σε μικρό χρονικό διάστημα. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα της είναι ότι σε βαριά ρυπασμένες περιοχές δεν μπορεί, ακόμα τουλάχιστον, να χρησιμοποιηθεί παρά ως δευτερεύουσα-υποστηρικτική μέθοδος αντιμετώπισης. Εξαρτάται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής που μολύνθηκε και από την φύση και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου που διέρρευσε ενώ τέλος, σε ατυχήματα διαρροής στην ανοιχτή θάλασσα δεν μπορεί να αποτελέσει πρωταρχικό τρόπο αντιμετώπισης της πετρελαιοκηλίδας λόγω της διάλυσης.

## **2. Η ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ**

### **2.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ**

Η βιοεξυγίανση του πετρελαίου είναι μια σύνθετη και σχετικά αργή διαδικασία που περιλαμβάνει της αλληλεπιδράσεις του πετρελαίου και των διαφόρων μικροοργανισμών υπό τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπου αυτή πραγματοποιείται. Γενικά η αποδόμηση μιας ένωσης εξαρτάται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες που επιδρούν στην βιοεξυγίανση είναι:

- 1)Οι μηχανισμοί βιοδιάσπασης-μεταβολής της σύστασης του πετρελαίου (κατανομή των μικροοργανισμών και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, η ενζυμική δραστηριότητα κ.α) και ο ρυθμός με τον οποίο αυτή πραγματοποιείται,**
- 2)Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αργού πετρελαίου και των προϊόντων του και**
- 3)Το περιβαλλοντικό προφίλ της περιοχής που μολύνθηκε (θερμοκρασία, αλατότητα, pH, ιστορικό ρύπανσης, τύπος θαλάσσιων ακτών, ύπαρξη μικροοργανισμών, ύπαρξη θρεπτικών συστατικών).**

Ανάλογα με την χημική σύσταση του πετρελαίου, κάποια συστατικά του μπορεί να εξατμιστούν, να διαλυθούν, να οξειδωθούν, να αποδομηθούν ή ακόμη και να διασπαστούν μέσω ενός συνόλου χημικών και βιολογικών διεργασιών που είναι γνωστές ως γήρανση του πετρελαίου, ενώ άλλα συστατικά παραμένουν κατά βάση ανεπηρέαστα από τις προαναφερθείσες διεργασίες. Συνεπώς, αντιλαμβάνεται κανείς πως η επιτυχία της βιοεξυγίανσης εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων-ιδιοτήτων.

Συνοψίζοντας, οι παράγοντες που επιδρούν στην βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου και επηρεάζουν την επιτυχία της βιοεξυγίανσης είναι :

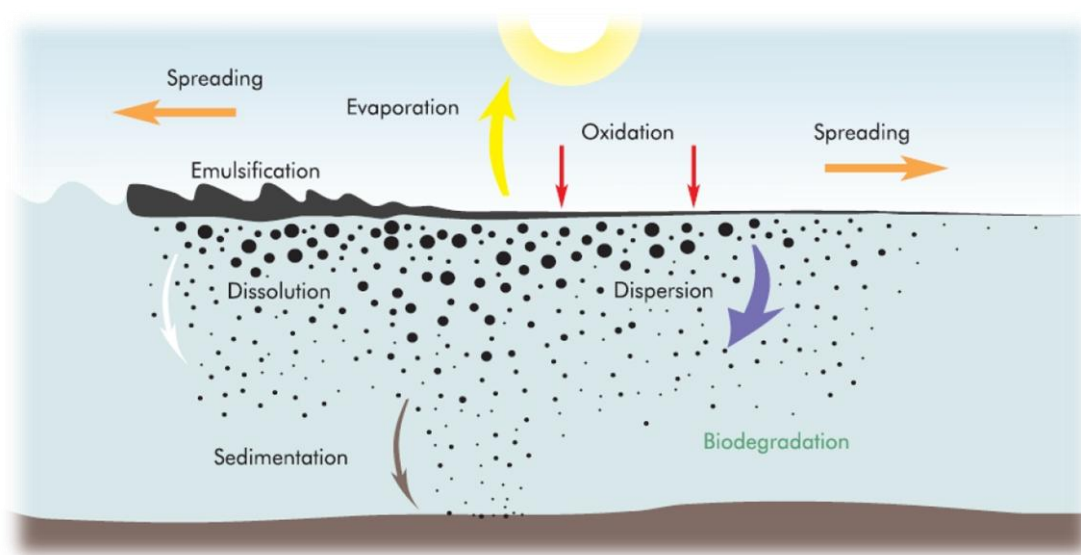
- Οι διεργασίες που μεταβάλλουν την αρχική σύσταση του πετρελαίου (διεργασίες γήρανσης)
- Η σύσταση του πετρελαίου και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του
- Το περιβαλλοντικό προφίλ της περιοχής που μολύνθηκε
- Η ευρύτερη βιολογική δραστηριότητα της περιοχής που μολύνθηκε
- Η συγκέντρωση του πετρελαίου
- Έντονα καιρικά φαινόμενα

### **2.1.1. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ-ΓΗΡΑΝΣΗ**

Αφότου το πετρέλαιο διαρρεύσει στο θαλάσσιο περιβάλλον θα αρχίσει σταδιακά να διασπάται και να διαλύεται. Η διάλυση αυτή είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου διεργασιών (χημικών, φυσικών ή βιολογικών) που μεταβάλλουν την αρχική σύσταση του πετρελαίου που διέρρευσε. Αυτές οι διεργασίες είναι γενικώς γνωστές ως **γήρανση** (ITOPF 2013). Εφόσον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η βιοεξυγίανση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία η οποία συνήθως εφαρμόζεται μετά της συμβατικές μεθόδους αντιμετώπισης, το υπολειμματικό πετρέλαιο έχει υποστεί αρκετή γήρανση πριν αρχίσει να εφαρμόζεται η στρατηγική της ενισχυμένης βιοεξυγίανσης. Οι φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της γήρανσης του πετρελαίου είναι οι εξής: **Εξάπλωση, εξάτμιση, διάλυση, φωτοξείδωση, διασπορά, γαλακτωματοποίηση, βιοαποικοδόμηση, απορρόφηση, ιζηματογένεση και σχηματισμός πίσσας.**

Κατά τα αρχικά στάδια δημιουργίας μια πετρελαιοκηλίδας, η εξάπλωση, η εξάτμιση, η διασπορά, η γαλακτωματοποίηση και η διάλυση αποτελούν τις σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης ενώ σε μεταγενέστερο στάδιο καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της παίζουν η οξείδωση, η ιζηματογένεση και η βιοαποδόμηση οι οποίες και καθορίζουν την τελική μορφή της κηλίδας. Μακροπρόθεσμα, η βιοαποδόμηση είναι αυτή που απομακρύνει το διαρρεύσαν πετρέλαιο από το θαλάσσιο περιβάλλον. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συνδυασμένη επίδραση αυτών των διεργασιών σε συνδυασμό με αυτήν των κυμάτων δυσχεραίνουν σημαντικά την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των παραγόντων της ενισχυμένης βιοεξυγίανσης. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος γίνεται χρήση βιοδεικτών οι οποίοι είναι

συστατικά που βρίσκονται στο πετρέλαιο. Η έκταση της βιοαποδόμησης προσεγγίζεται συγκρίνοντας τον λόγο μιας συγκεκριμένης τιμής συγκέντρωσης υδρογονανθράκων προς την συγκέντρωση οποιουδήποτε από αυτούς τους βιοδείκτες. Η **εικόνα 2.1** αναπαριστά τις διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου που περιγράφηκαν παραπάνω. Στην συνέχεια ακολουθεί η περιγραφή των διεργασιών αυτών.



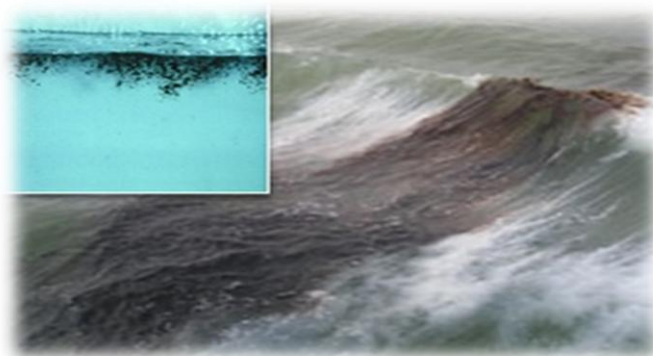
**Εικόνα 2.1 :** Οι διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον

- **Εξάπλωση (Spreading) :** Η εξάπλωση του πετρελαίου στην επιφάνεια της θάλασσας ξεκινά από την στιγμή που θα αρχίσει η διαρροή του στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η ταχύτητα με την οποία εξελίσσεται το φαινόμενο εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το ιξώδες του πετρελαίου το οποίο με την σειρά του εξαρτάται από την σύσταση του πετρελαίου και την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Τα ρευστά, μικρής πυκνότητας πετρέλαια εξαπλώνονται γρηγορότερα από αυτά μεγαλύτερου ιξώδους. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ένα πετρέλαιο τείνει να είναι πιο δύσρευστο από ότι σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες καθώς το ιξώδες είναι αντιστρόφως ανάλογο της θερμοκρασίας. Η εξάπλωση είναι σπανίως ομοιόμορφη και μεγάλες αποκλίσεις παρατηρούνται συνήθως στο πάχος του επιπλέοντος πετρελαίου. Τελικά, μετά από μερικές ώρες από την έναρξη του φαινομένου, η πετρελαιοκηλίδα θα αρχίσει να διασπάται εξαιτίας της δράσης των ανέμων και των κυμάτων και του στροβιλισμού των κυμάτων και είθισται να σχηματίζει στενές ζώνες ή

στρώματα παράλληλα με την φορά διεύθυνσης του ανέμου. Εκτός από τον τύπο του πετρελαίου, ο ρυθμός με τον οποίον μια κηλίδα εξαπλώνεται εξαρτάται και από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, τα θαλάσσια ρεύματα, τα παλιρροιακά ρεύματα και η ταχύτητα του ανέμου. Όπως είναι λογικό, μεγαλύτερη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ισχυρότεροι άνεμοι και ρεύματα έχουν ως αποτέλεσμα την ταχύτερη εξάπλωση του πετρελαίου.

- **Εξάτμιση (Evaporation) :** Ο ρυθμός της εξάτμισης και η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από την μεταβλητότητα του πετρελαίου. Ένα πετρελαιοειδές με μεγάλο ποσοστό ελαφριών και πτητικών συστατικών θα εξατμιστεί ευκολότερα σε σχέση με ένα που περιέχει βαρύτερες ενώσεις. Για παράδειγμα, η βενζίνη, η κηροζίνη και το diesel, τα οποία είναι όλα ελαφριά παράγωγα, έχουν την τάση να εξατμιστούν σχεδόν τελείως μέσα σε διάστημα λίγων ημερών. Αντίθετα, ελάχιστη εξάτμιση θα πραγματοποιηθεί σε ένα βαρύ διαρρέυσαν πετρέλαιο. Σε εύκρατα κλίματα, τα συστατικά με σημείο βρασμού μικρότερο από 200°C , τείνουν να εξατμιστούν εντός των εικοσιτεσσάρων πρώτων ωρών από την διαρροή. Διαταραγμένες θάλασσες, ισχυροί άνεμοι και υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ποσοστό εξάτμισης και επαγωγικά την ποσότητα πετρελαίου που “χάνεται” στην ατμόσφαιρα κατά την εξέλιξη της διεργασίας.
- **Διάλυση (Dissolution) :** Οι υδατοδιαλυτές ενώσεις του πετρελαίου είναι δυνατό να διαλυθούν στο περιβάλλον ύδωρ. Αυτό συμβαίνει γρηγορότερα όταν το πετρέλαιο διαλύεται στην υδάτινη στήλη. Οι ενώσεις του πετρελαίου που είναι πιο ευδιάλυτες στο νερό είναι οι ελαφριοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες όπως το βενζόλιο και το τολουόλιο. Ωστόσο, αυτά τα συστατικά είναι και αυτά που εξατμίζονται πρώτιστα, διεργασία που είναι 10 έως 1000 φορές ταχύτερη από την διάλυση. Τα περισσότερα μη κατεργασμένα πετρέλαια και όλα τα διυλισμένα περιέχουν σχετικά μικρές ποσότητες από αυτά τα συστατικά καθιστώντας την διάλυση μια από τις λιγότερο σημαντικές διεργασίες.

- **Διασπορά (Dispersion)** : Τα κύματα και η γενικότερη αναταραχή στην επιφάνεια της θάλασσας μπορεί να προκαλέσουν μερική ή ολική διάσπαση της πετρελαιοκηλίδας σε σωματίδια και σταγονίδια διαφόρων μεγεθών. Μερικά από τα μικρότερα σταγονίδια παραμένουν εν αιωρήσει στο θαλασσινό νερό ενώ τα μεγαλύτερα τείνουν να επιστρέψουν στην επιφάνεια όπου και ενδέχεται να ανασχηματίσουν ένα πολύ λεπτό film. Η σχέση επιφάνειας-όγκου για τα διεσπαρμένα σταγονίδια του πετρελαίου είναι μεγαλύτερη από αυτή των επιπλεόντων σωματιδίων του πετρελαίου. Το φαινόμενο αυτό ενισχύει άλλες φυσικές διεργασίες, όπως η διάλυση, η βιοαποδόμηση και η ιζηματογένεση. Η ταχύτητα με την οποία ένα πετρελαιοειδές διασπείρεται εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη φύση του πετρελαίου και την κατάσταση της θάλασσας. Η διασπορά πραγματοποιείται γρηγορότερα όταν το πετρέλαιο είναι ελαφρύ και χαμηλού ιξώδους και η θάλασσα είναι αναταραγμένη. Η προσθήκη χημικών διαλυτών επιταχύνει την διεργασία της φυσικής διασποράς.



**Εικόνα 2.2** : Κύματα και αναταραχή στην επιφάνεια της θάλασσας προκαλεί διάσπαση του πετρελαίου σε σταγονίδια διαφόρων μεγεθών

- **Φωτοξείδωση (Oxidation)** : Το πετρέλαιο όταν οξειδώνεται είτε διασπάται σε διαλυτά προϊόντα είτε σχηματίζει δυσδιάλυτες ενώσεις που ονομάζονται πίσσες. Η διαδικασία αυτή, παρότι ενισχύεται σημαντικά από την ηλιακή ακτινοβολία, θεωρείται ιδιαίτερα αργή καθώς ακόμα και υπό ισχυρό φως τα λεπτά στρώματα πετρελαίου διασπώνται με ρυθμό 0.1 % κάθε μέρα.

Ο σχηματισμός της πίσσας προκαλείται από την οξείδωση στρωμάτων πετρελαίου μεγάλου πάχους και υψηλού ιξώδους ή γαλακτωμάτων.

Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην δημιουργία ενός επικαλύμματος που περιέχει βαριές ενώσεις και το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της συνοχής του πετρελαίου. Οι σχηματισμοί πίσσας, που συνήθως εντοπίζονται στις ακτογραμμές, παρουσιάζουν ένα ισχυρό εξωτερικό περίβλημα το οποίο περιβάλλει ένα μαλακότερο, λιγότερο διαβρωμένο εσωτερικό περίβλημα και θεωρούνται τυπικά παράγωγα της προαναφερθείσας διεργασίας.

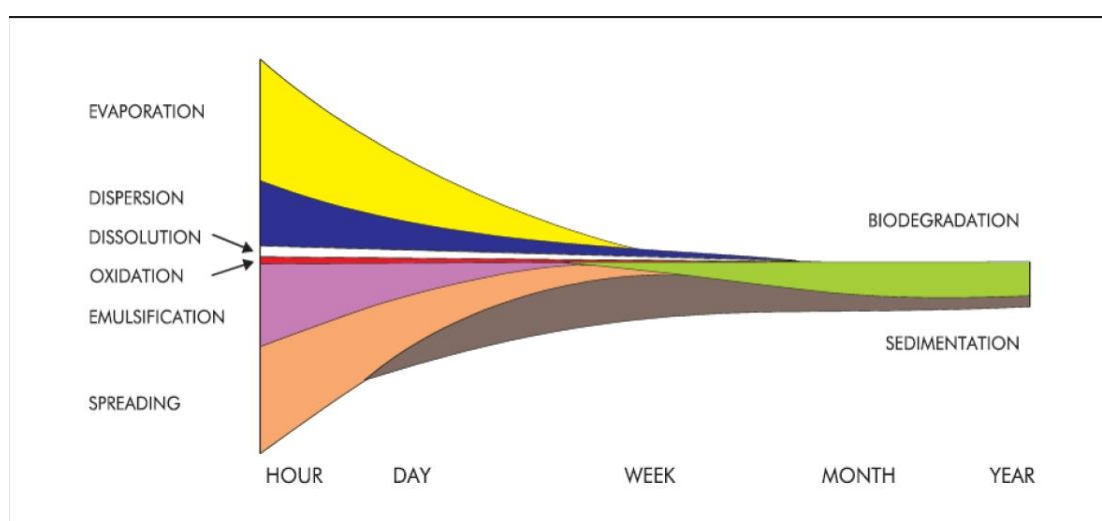
- **Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)** : Ένα γαλάκτωμα δημιουργείται όταν δύο ρευστά συνδυάζονται, με το ένα από τα δύο να καταλήγει διασκορπισμένο στην μάζα του άλλου. Με τον όρο γαλακτωματοποίηση του ακατέργαστου πετρελαίου ονομάζεται η διεργασία κατά την οποία σταγονίδια θαλασσινού νερού διαλύονται στο πετρέλαιο σχηματίζοντας ένα γαλάκτωμα νερού –στο- πετρέλαιο. Το παραπάνω φαινόμενο συμβαίνει από την φυσική ανάμειξη των δύο ρευστών η οποία ενισχύεται από την αναταραχή στην επιφάνεια της θάλασσας. Το γαλάκτωμα που σχηματίζεται είναι ιδιαίτερα παχύρρεστο και διαλύεται δυσκολότερα απ’ ότι το πρωταρχικό πετρέλαιο ενώ στην βιομηχανία του πετρελαίου είναι γνωστό και ως “μους σοκολάτας” λόγω της εμφάνισής του. Η δημιουργία αυτών των νερού-στο-πετρέλαιο γαλακτωμάτων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου των ρυπαντών από 3 έως 4 φορές ενώ η γαλακτωματοποίηση επιβραδύνει τις άλλες διεργασίες γήρανσης. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι τα πετρελαιοειδή με περιεκτικότητα ασφατενίων μεγαλύτερη από 0.5% σχηματίζουν συμπαγή γαλακτώματα τα οποία παραμένουν αδιάλυτα πολλούς μήνες μετά την δημιουργία της πετρελαιοκηλίδας ενώ τα πετρελαιοειδή με πολύ χαμηλό ποσοστό ασφατενίων είναι λιγότερο πιθανό να σχηματίσουν τέτοιου είδους γαλακτώματα. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι το γαλάκτωμα δύναται να διαχωριστεί και πάλι σε νερό και πετρέλαιο αν θερμανθεί από την ηλιακή ακτινοβολία υπό συνθήκες ηρεμίας ή όταν το γαλάκτωμα απομονωθεί και οδηγηθεί σε κάποια ακτογραμμή.



- Βιοαποικοδόμηση (Biodegradation)** : Το θαλασσινό νερό περιέχει ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών τα οποία χρησιμοποιούν τους υδρογονάνθρακες σαν πηγή ενέργειας και έχουν την δυνατότητα μερικής ή ακόμη και ολικής αποικοδόμησης του πετρελαίου σε διαλυτές ενώσεις και τελικά σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπάρχουν πολλοί τύποι θαλάσσιων μικροοργανισμών που ο καθένας τείνει να αποικοδομήσει συγκεκριμένες ομάδες συστατικών του ακατέργαστου πετρελαίου, ωστόσο κάποια συστατικά είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και ενδέχεται να μην αποικοδομηθούν εύκολα. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εν λόγω διεργασίας είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών (άζωτο και φώσφορος) στο θαλασσινό νερό, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του οξυγόνου. Εφόσον λοιπόν η βιοαποικοδόμηση απαιτεί οξυγόνο για να πραγματοποιηθεί, η διεργασία δύναται να ολοκληρωθεί μόνο στην διεπιφάνεια νερού-πετρελαίου καθώς δεν υπάρχει οξυγόνο εντός της μάζας του πετρελαίου. Η δημιουργία των σταγονιδίων πετρελαίου μέσω της διασποράς αυξάνει τον λόγο επιφανείας προς όγκο και συνεπακόλουθα την διαθέσιμη για τους μικροοργανισμούς επιφάνεια στην οποία αυτά θα προσαρτηθούν για να πραγματοποιηθεί η βιοαποικοδόμηση.
- Ιζηματογένεση (Sedimentation)** : Γεγονός είναι ότι ελάχιστα πετρελαιοειδή καταβυθίζονται σε θαλάσσιο περιβάλλον. Όταν το επιπλεύσαν πετρέλαιο πλησιάζει κάποια ακτογραμμή τότε αυτό ενδέχεται να καθιζάνει. Πράγματι, όταν τα ελαφριά-πτητικά συστατικά του πετρελαίου εξατμιστούν και έχουν πραγματοποιηθεί όλες οι διεργασίες γήρανσης τότε κάποια πετρέλαια προσεγγίζουν την πυκνότητα του θαλασσινού νερού. Όταν επιπλέον, ημιβυθισμένο ή διασπαρθέν πετρέλαιο έρθει σε επαφή με διαλελυμένο ίζημα, το ίζημα ενδέχεται να προσαρτηθεί σε αυτό κάτι που συνήθως παρατηρείται σε ρηχά νερά. Αν η ρύπανση είναι εκτενής, τότε πυκνά κομμάτια πίσσας μπορεί να σχηματιστούν στον βυθό της ακτογραμμής. Το πετρέλαιο που καταβυθίζεται συχνά αναμιγνύεται με κόκκους άμμου και άλλα ιζήματα. Αν το παραγόμενο μίγμα συνεπακόλουθα ξεπλυθεί από την ακτή πίσω στην θάλασσα τότε είναι πολύ πιθανό να καθιζάνει. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι σε περίπτωση που το διαρρέυσαν πετρέλαιο πιάσει φωτιά ή καεί εκουσίως (in-situ burning) , τα

παραγόμενα κατάλοιπα που μερικές φορές σχηματίζονται μπορεί να είναι επαρκώς πυκνά για να καταβυθιστούν.

Στην **εικόνα 2.3** παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των διεργασιών γήρανσης που συμβαίνουν σε μια πετρελαιοκηλίδα. Το μήκος κάθε γραμμής υποδηλώνει την διάρκεια της κάθε διεργασίας ενώ το πάχος την μεταβολή της έντασης της συναρτήσει του χρόνου.



**Εικόνα 2.3 :** Διεργασίες γήρανσης της πετρελαιοκηλίδας με τον χρόνο

## **2.1.2. Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ**

### **2.1.2.1. Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ**

Το πετρέλαιο είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο μίγμα υδρογονανθράκων και άλλων ενώσεων άνθρακα και υδρογόνου που περιέχουν επιπλέον άζωτο, οξυγόνο, θείο και άτομα μετάλλων. Τα σημεία βρασμού των συστατικών του πετρελαίου ξεπερνούν τους 1000°C, ενώ ο αριθμός ατόμων άνθρακα φτάνει τα 80-100 στα μόρια των συστατικών.

Η σύσταση του πετρελαίου παρουσιάζει έντονες διαφοροποιήσεις ανάλογα με την προέλευση και την ηλικία του. Η στοιχειακή ανάλυση σε ένα μεγάλο αριθμό

δειγμάτων πετρελαίου έδειξε ότι η περιεκτικότητα των επιμέρους στοιχείων μεταβάλλεται σε σχετικά στενά όρια παρά τις μεγάλες διαφορές που παρουσιάζουν στις φυσικές ιδιότητες τους. Στον πίνακα 2.1 παρατίθεται η στοιχειακή σύσταση του πετρελαίου.

**Πίνακας 2.1 :Μέση στοιχειακή σύσταση του πετρελαίου**

Στοιχείο	Περιεκτικότητα (κ.β) %
Άνθρακας	83.0-87.0
Υδρογόνο	10.0-14.0
Άζωτο	0.1-2.0
Οξυγόνο	0.05-1.5
Θείο	0.05-6.0
Άτομα μετάλλων	<0.1

Τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες με βάση την διαλυτότητα τους σε οργανικούς διαλύτες : Τους υδρογονάνθρακες, κορεσμένους και αρωματικούς, τις ρητίνες και τα ασφαλτένια. Παρακάτω ακολουθεί η περιγραφή των συστατικών αυτών, που αποτελούν την βασική στοιχειακή σύσταση των περισσοτέρων πετρελαίων.

#### Υδρογονάνθρακες (Κορεσμένοι και Αρωματικοί)

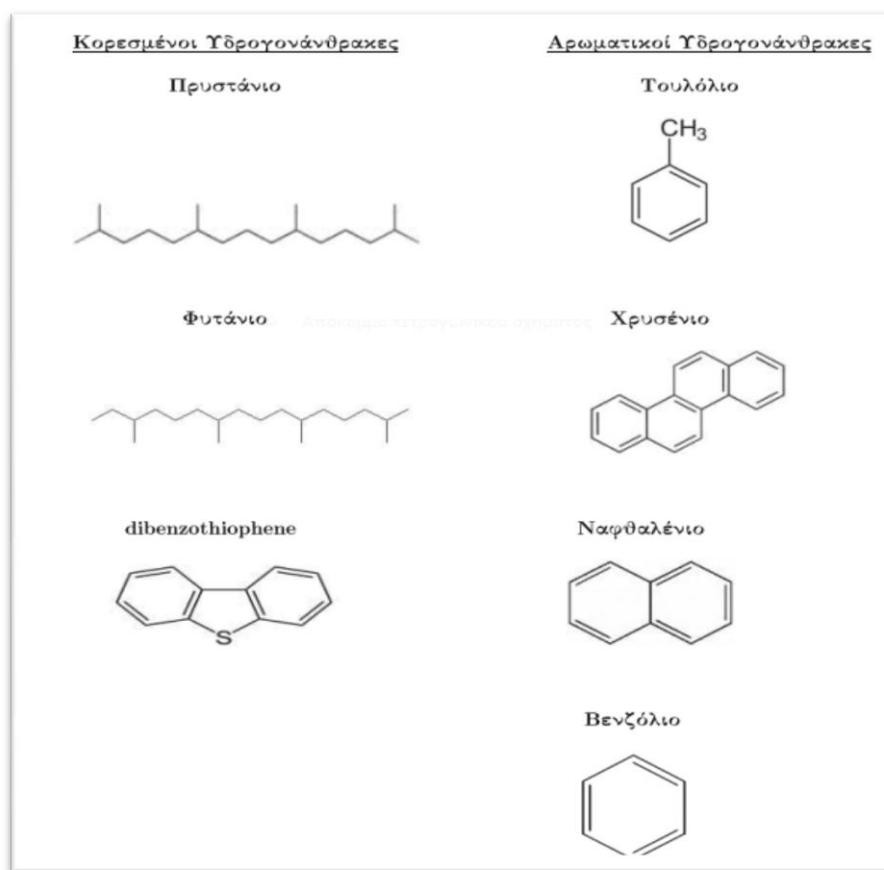
Οι υδρογονάνθρακες που απατώνται στο πετρέλαιο διακρίνονται σε κορεσμένους και αρωματικούς, με τους κορεσμένους να διακρίνονται στις παραφίνες- αλκάνια και τα κυκλοαλκάνια-ναφθένια. Οι ολεφίνες (αλκένια) απατώνται σπάνια ενώ ακόμα σπανιότερα τα αλκίνια (υδρογονάνθρακες της σειράς του ακετυλενίου).

- **Παραφίνες-Αλκάνια** : Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες ευθείας η διακλαδισμένης δομής, αλλά χωρίς κλειστούς δακτυλίους. Τα αλκάνια παρουσιάζουν τα χαμηλότερα σημεία ζέσεως συγκριτικά με υδρογονάνθρακες άλλων κατηγοριών με ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα λόγω των αδύναμων διαμοριακών δυνάμεων που αναπτύσσουν. Το σημείο βρασμού αυξάνει κατά 20-30°C με την προσθήκη ενός

ατόμου άνθρακα στο μόριο. Τα διακλαδισμένα αλκάνια έχουν σημαντικά χαμηλότερα σημεία ζέσεως, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κανονικά. Η πυκνότητα των αλκανίων είναι μικρότερη σε σχέση με όλες τις ομάδες οργανικών συστατικών. Είναι πρακτικά αδιάλυτα στο νερό λόγω του μη πολικού χαρακτήρα των μορίων τους και της αδυναμίας τους να σχηματίσουν δεσμούς οξυγόνου. Σημαντική ιδιότητα των αλκανίων είναι το ιδιαίτερα υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο τους λόγω του ότι έχουν την μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα ατόμων υδρογόνου για δεδομένο αριθμό ατόμων άνθρακα. Ο μοριακός τους τύπος είναι  $C_nH_{(2n+2)}$ .

- **Κυκλοαλκάνια-Ναφθένια** : Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες με έναν ή περισσότερους δακτυλίους ατόμων και με ή χωρίς πλευρικές διακλαδώσεις παραφινικών αλυσίδων. Είναι γνωστοί και ως αλεικυκλικοί υδρογονάνθρακες. Οι δακτύλιοι περιλαμβάνουν συνήθως 5-6 άτομα άνθρακα, ενώ πρακτικά απουσιάζουν δακτύλιοι με λιγότερα από 5 και περισσότερα από 7 άτομα άνθρακα. Τα ναφθενικά συστατικά φτάνουν μέχρι και το 50% στα πετρέλαια ενώ η συγκέντρωσή τους αυξάνει από τα ελαφρύτερα στα βαρύτερα κλάσματα. Ο μοριακός τους τύπος είναι  $C_nH_{2n}$ . Γενικά τα παραφινικά και τα ναφθενικά συστατικά στο πετρέλαιο αναφέρονται και ως κορεσμένο κλάσμα.
- **Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες** : Περιέχουν έναν ή περισσότερους βενζολικούς δακτυλίους απομονωμένους ή συζυγείς. Στα περισσότερα πετρέλαια το ποσοστό τους δεν ξεπερνά το 15% κ.β. Σε κλάσματα πετρελαίου όπως η βενζίνη, η υψηλή περιεκτικότητα είναι επιθυμητή λόγω του υψηλού αριθμού οκτανίων που εξασφαλίζουν ενώ αντίθετα σε κλάσματα που χρησιμοποιούνται στην λίπανση είναι ανεπιθύμητοι λόγω της μεγάλης μεταβολής που παρουσιάζει το ιξώδες τους με την θερμοκρασία. Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα συγκριτικά με τα αλκάνια και τα ναφθένια. Διαλύονται κατά κύριο λόγο σε πολικούς διαλύτες. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHS) αποτελούν αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια σαν επικίνδυνοι ρυπαντές με καρκινογόνο δράση.

- Ετεροενώσεις του πετρελαίου (Ρητίνες και Ασφαλτένια):** Ετεροενώσεις ή ετεροσυστατικά ονομάζονται οι ενώσεις του πετρελαίου οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους άτομα στοιχείων επιπλέον του άνθρακα και του υδρογόνου. Τα κυριότερα στοιχεία των ετεροσυστατικών είναι το θείο, το άζωτο και το οξυγόνο ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις υπάρχουν οργανομεταλλικές ενώσεις νικελίου, κοβαλτίου, χαλκού κ.λ.π. Στα πετρέλαια ανιχνεύονται ανόργανα άλατα δεσμευμένα σε κolloειδή αιωρήματα. Οι ενώσεις αυτές απατώνται κυρίως στα κλάσματα με τα υψηλότερα σημεία ζέσεως. Αν και οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές, η επίδραση τους στην χημική συμπεριφορά του πετρελαίου είναι σημαντική. Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται κάποιες αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις που συναντώνται στο πετρέλαιο.



Σχήμα 2.1 : Τυπικές οργανικές ενώσεις του πετρελαίου.

### 2.1.2.2. ΟΙ ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες του πετρελαίου που επηρεάζουν την συμπεριφορά του στο φυσικό περιβάλλον και κατ' επέκταση την βιοαποικοδόμηση και την επιτυχία της βιοεξυγίανσης είναι η **πυκνότητα**, το **ιξώδες**, το **σημείο ροής** και η **διαλυτότητα στο νερό**.

- **Πυκνότητα** : Η πυκνότητα και η ειδική πυκνότητα (Specific gravity) αποτελούν βασικούς δείκτες χαρακτηρισμού της ποιότητας του πετρελαίου και των προϊόντων του. Το γεγονός ότι οι αριθμητικές τιμές της πυκνότητας για τα υγρά ορυκτά καύσιμα κυμαίνονται σε πολύ μικρό αριθμητικό διάστημα, οδήγησε στην εισαγωγή του δείκτη API (American Petroleum Institute). Ο δείκτης αυτός έχει καθιερωθεί διεθνώς και διακρίνει το αργό πετρέλαιο σε 4 κατηγορίες βάση της τιμής που παίρνει. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός της κατηγοριοποίησης του πετρελαίου βάση του δείκτη API με την συνεκτικότητα του στο θαλάσσιο περιβάλλον οδήγησε στον χαρακτηρισμό των διαφόρων πετρελαίων σε συνεκτικά (αργό πετρέλαιο, ορυκτά καύσιμα και βιτουμένια) και μη συνεκτικά (βενζίνη, κηροζίνη και diesel). Βάση αυτής της κατάταξης διακρίνουμε 4 ομάδες πετρελαίου και των προϊόντων του :

**Πίνακας 2.2 :** Κατηγοριοποίηση του πετρελαίου βάση του δείκτη API και της συνεκτικότητας του.

Group	Specific Gravity	°API Density	Persistence	Example
group I	< 0.8	>45	Not persistent	Gasoline, naptha
group II	0.8 - 0.85	35 - 45	Not very persistent	Abu Dhabi Crude
group II	0.85 - 0.95	17.5 - 35	Average persistent	Arabian Light Crude
group IV	>0.95	< 17.5	Very persistent	Heavy Fuel Oil

- **Ιξώδες :** Το ιξώδες (viscosity) αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες φυσικές ιδιότητες όχι μόνο του πετρελαίου αλλά και όλων των ρευστών διότι χαρακτηρίζει την ικανότητα τους να ρέουν. Στην ουσία αποτελεί μέτρο της εσωτερικής αντίστασης του ρευστού στην κίνηση, λόγω των δυνάμεων τριβής που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων του. Ποσοτικά το ιξώδες ορίζεται ως **δυναμικό** και **κινηματικό** ιξώδες με το δυναμικό ιξώδες να δίνεται από την σχέση :

$$Df = \eta \frac{du}{dl} ds$$

Όπου  $Df$  η μεταβαλλόμενη δύναμη που ασκείται λόγω εσωτερικής τριβής, η οποία επενεργεί επί επιφανείας  $ds$  και  $du$  η μεταβολή της ταχύτητας στην διαδρομή  $dl$ . Η μονάδα ιξώδους στο διεθνές σύστημα είναι το Pars ενώ στις τεχνολογικές εφαρμογές χρησιμοποιείται το poise και το centipoise. Το κινηματικό ιξώδες ορίζεται ως ο λόγος του δυναμικού ιξώδους προς την πυκνότητα του ρευστού και μετριέται σε Stokes ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) ή centistokes (0.01cSt). Το ιξώδες μεταβάλλεται σημαντικά με την θερμοκρασία. Με μείωση της θερμοκρασίας αυξάνεται το ιξώδες του πετρελαίου, και αποτελεί σημαντικό δείκτη εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας.

- **Σημείο Ροής (Pour Point) :** Μεγάλη σημασία για την μεταφορά και την χρήση των υγρών καυσίμων έχει η κινητικότητα τους σε μεγάλες θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία υπό την οποία το καύσιμο δεν ρέει, χωρίς ανάδευση, ευρισκόμενο εντός προτύπου δοχείου ονομάζεται σημείο ροής. Η θερμοκρασία αυτή υπολογίζεται πειραματικά σε πρότυπη συσκευή σύμφωνα με την ASTM D97-57. Το σημείο ροής είναι δείκτης της παραφινικότητας ή της αρωματικότητας του αργού πετρελαίου. Όσο χαμηλότερο είναι το σημείο ροής, τόσο χαμηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε παραφίνες. Το σημείο ροής του αργού πετρελαίου κυμαίνεται από  $-57^\circ\text{C}$ -  $32^\circ\text{C}$ .
- **Διαλυτότητα στο νερό :** Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι ιδιαίτερα χαμηλή και εξαρτάται από την σύνθεση του κάθε πετρελαϊκού υδρογονάνθρακα και από την θερμοκρασία. Η πολικότητα της δομής των υδρογονανθράκων καθορίζει τον βαθμό αλληλεπίδρασης των μορίων μεταξύ τους και με το νερό. Γενικά, όσο η πολικότητα ενός μορίου υδρογονάνθρακα

αυξάνεται, τόσο αυξάνεται η διαλυτότητα του στο νερό και το σημείο βρασμού του. Εδώ επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι η παραμονή υδρογονάνθρακα πετρελαιοειδούς στο περιβάλλον αυξάνεται με την αύξηση του σημείου βρασμού του δηλαδή με αύξηση των ατόμων άνθρακα στο μόριο του πετρελαιοειδούς, όπως έχει αναφερθεί και ανωτέρω. Τέλος υδρογονάνθρακες με ανθρακικές αλυσίδες 13 ατόμων άνθρακα και παραπάνω, με ασήμαντη διαλυτότητα στο νερό, μετακινούνται μόνο μέσω προτιμητέων μονοπατιών ροής και διαβαθμίσεις συγκέντρωσης.

### **2.1.3. ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΕ**

Το περιβάλλον, δηλαδή το οικοσύστημα που ρυπάνθηκε και το οποίο μπορεί να χαρακτηρίζεται από έντονη ή ασθενή βιολογική δραστηριότητα, παίζει σημαντικό ρόλο στην βιοαποικοδόμηση. Για παράδειγμα, τα αρκτικά οικοσυστήματα είναι περισσότερο ευαίσθητα σε σχέση με τα θερμά, λόγω της διαφοράς στην ταχύτητα της αποδόμησης των πετρελαϊκών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μιας περιοχής που επιδρούν στην βιοαποικοδόμηση και κατ' επέκταση επηρεάζουν την επιτυχία της βιοεξυγίανσης είναι η θερμοκρασία, ο τύπος των ακτογραμμών, το pH, το ιστορικό ρύπανσης της περιοχής, η αλατότητα και η μικροβιακή δραστηριότητα.

Η **θερμοκρασία** αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα καθώς επηρεάζει όχι μόνο τις ιδιότητες του πετρελαίου αλλά και την δραστηριότητα των μικροοργανισμών της ευρύτερης περιοχής. Σε χαμηλές θερμοκρασίες το ιξώδες του πετρελαίου αυξάνεται, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας, όπως και η πτητικότητα των τοξικών ουσιών μικρού μοριακού βάρους δυσχεραίνοντας έτσι την βιοδιάσπαση. Η θερμοκρασία επιδρά επίσης στην διαλυτότητα των υδρογονανθράκων καθώς κάποιες ομάδες συστατικών (αλκάνια μικρής αλυσίδας) είναι πιο ευδιάλυτα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και μερικές μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις είναι πιο ευδιάλυτες σε υψηλές θερμοκρασίες. Αν και η βιοδιάσπαση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων μπορεί να εμφανιστεί πέρα από ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, ο ρυθμός βιοδιάσπασης μειώνεται γενικά με την μείωση



της θερμοκρασίας. Η επίδραση της θερμοκρασίας περιπλέκεται επίσης και από άλλους παράγοντες όπως η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, σε περιβάλλοντα όπου έχει καθιερωθεί ένας ψυχρόφιλος πληθυσμός, η βιοαποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί σε σημαντικούς ρυθμούς, υπό κρύες συνθήκες. Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει ακόμα και σε θερμοκρασία 0-2°C στο υδάτινο περιβάλλον και στους 1.1°C στο έδαφος ενώ θεωρητικά η ιδανικότερη θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνονται υψηλοί ρυθμοί βιοαποδόμησης είναι οι 20°C. Η **μορφή της ακτογραμμής** επηρεάζει σημαντικά την διαδικασία της βιοαποδόμησης, με έμμεσο τρόπο, καθώς από αυτήν εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό η εξάπλωση της πετρελαιοκηλίδας. Η ευαισθησία από διαφορετικά υποστρώματα του πετρελαίου ποικίλλει σημαντικά, από βραχώδεις ακτές με βότσαλα, χαλίκια, χοντρή άμμο, λεπτούς κόκκους άμμου, ελώδη, κοραλλιογενείς ύφαλοι, και ούτω καθεξής. Έτσι, οι εκτεθειμένες, απόκρημνες βραχώδεις ακτές αποτελούν μια ιδανική επιφάνεια στις οποίες μεγάλες ποσότητες πετρελαίου μπορούν να κολλήσουν. Αρκετά γρήγορα καθαρίζονται από τη μηχανική επίδραση της μεταγενέστερης ενέργειας των κυμάτων, και ως εκ τούτου υφίστανται σχετικά λιγότερη ζημιά από τις πετρελαιοκηλίδες. Οι βραχώδεις περιοχές που μπορεί να βυθίζονται σε υψηλή παλίρροια ή σε βαρύ φούσκωμα, μπορεί να πληγούν περισσότερο σοβαρά, ειδικά εάν η προεξοχή περιέχει βραχολίμνες πλούσιες σε χλωρίδα και πανίδα, όπου τα παχιά στρώματα του πετρελαίου πιθανό να συσσωρεύονται. Οι παραλίες με βότσαλα, χαλίκια και χοντρούς κόκκους άμμου είναι οι περιοχές υψηλού κινδύνου όσον αφορά την βαθιά ρύπανση. Οι περισσότεροι υδρογονάνθρακες μπορούν εύκολα να εισέλθουν στα κενά και στην ροή σε τόσο μεγάλο βάθος που είναι πρακτικά αδύνατο να αφαιρεθούν χωρίς να πάθουν σοβαρή βλάβη οι πληθυσμοί που διαβιώνουν εντός του υποστρώματος των ιζημάτων. Οι λεπτόκοκκες παραλίες τείνουν να διατηρούν το πετρέλαιο στην επιφάνεια, καθώς το πετρέλαιο ενδέχεται να είναι πολύ παχύρρευστο και να μην μπορεί να διεισδύσει στα βάθη μέσα από τα πολύ μικρά κενά. Το παλιρροιακό έλος, συμπεριλαμβανομένων των λιμνών με ψάρια και στρείδια και τα έλη, είναι ιδιαίτερα εύαλωτα. Τα δίκτυα των καναλιών προτιμούν την μεταφορά του πετρελαίου προς την κατεύθυνση των πολύ προστατευμένων περιοχών όπου τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας και τα ψιλά ιζήματα τα διατηρούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι θαλάσσιοι βάλτοι σε εύκρατες περιοχές, όπως τα τροπικά ριζοφόρα, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη ρύπανση πετρελαίου ενώ τέλος, οι κοραλλιογενείς ύφαλοι προστατεύονται από βλέννα που εκκρίνονται από

τους πολύποδες και έτσι γενικά αντιμετωπίζουν τα μικρά απομονωμένα ατυχήματα αρκετά καλά. Επιπλέον, ένα προστατευτικό υδάτινο στρώμα παραμένει συνήθως μεταξύ των κοραλλιών και της επιφάνειας της πετρελαιοκηλίδας. Ωστόσο, οι επανειλημμένες περιπτώσεις ρύπανσης μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες για αυτά, όπως η μεγάλης κλίμακας λίπανση του επιφανειακού στρώματος των υφάλων (το μόνο ζωντανό κομμάτι του υφάλου) που προκαλείται από τις παλίρροιας. Στον **πίνακα 2.3** παρατίθενται, με σειρά αυξανόμενης ευαισθησίας στην ρύπανση από πετρέλαιο, οι διάφοροι τύποι ακτογραμμών. Η ταξινόμηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς επηρεάζει σημαντικά τον γενικότερο σχεδιασμό αντιμετώπισης μιας πετρελαιοκηλίδας.

**Πίνακας 2.3 :** Κατάταξη ακτών βάση της ευαισθησίας που επιδεικνύουν στην πετρελαϊκή ρύπανση.

Είδος Ακτής
Εκτεθειμένες βραχώδεις ακτές (exposed rock cliffs)
Αμμώδεις ακτές μεσαίας κοκκομετρίας (medium grained strands)
Αμμώδεις ακτές μεγάλης κοκκομετρίας (coarse-grained strands)
Μικτές ακτές με άμμο και χαλίκια (mixed sand and gravel strands)
Ακτές με χαλίκια (gravel strands)
Επίπεδες ακτές εκτεθειμένες στην παλίρροια (tidal exposed flats)
Προστατευμένες βραχώδεις ακτές (sheltered rocky shores)
Ακτές προστατευμένες από παλίρροια (sheltered tidal flats)
Αλυκές (sheltered and mangroves)

Ένας επίσης σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει ουσιαστικά την διαδικασία της βιοαποδόμησης είναι η **διαθεσιμότητα του οξυγόνου**. Οι αερόβιες συνθήκες θεωρούνται γενικά απαραίτητες για την εκτενή αποδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον δεδομένου ότι τα σημαντικότερα μονοπάτια αποδόμησης και για τα κορεσμένα και για τα αρωματικά περιλαμβάνουν τις οξυγενάσεις. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση του οξυγόνου οδηγεί σε αισθητά μειωμένες δραστηριότητες βιοδιάσπασης στα θαλάσσια ιζήματα και στα εδάφη. Οι περιοριστικές συνθήκες οξυγόνου κανονικά δεν υπάρχουν στα ανώτερα επίπεδα της

υδάτινης στήλης στα θαλάσσια περιβάλλοντα και στο επιφανειακό στρώμα των περισσότερων ακτών. Το οξυγόνο μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας στα υπό-επιφανειακά ιζήματα, στις ανοξικές ζώνες των υδάτινων στηλών και στις περισσότερες λεπτόκοκκες θαλάσσιες ακτές.

Οι παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι η δράση του κύματος και η ροή του νερού, η φυσική κατάσταση του πετρελαίου και το ποσό των διαθέσιμων υποστρωμάτων (substrates). Η αναερόβια αποικοδόμηση του πετρελαίου σύμφωνα με κάποιες μελέτες εμφανίζεται μόνο σε αμελητέους ρυθμούς, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η περιβαλλοντική σημασία της αναερόβιας αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων μπορεί να απορριφθεί. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αναερόβιος μεταβολισμός των υδρογονανθράκων μπορεί να είναι μια σημαντική διεργασία υπό ορισμένες συνθήκες. Μελέτες επίσης έχουν καταδείξει ότι σε μερικά θαλάσσια ιζήματα, τα PAHs και τα αλκάνια μπορούν να αποικοδομηθούν κάτω από συνθήκες αναγωγής θεϊκών σε παρόμοιους ρυθμούς με αυτούς υπό αερόβιες συνθήκες. Η σημασία της αναερόβιας βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο περιβάλλον απαιτεί ακόμα περαιτέρω μελέτη.

Τέλος, δύο ακόμη σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων πετρελαίου είναι το **pH** και η **αλατότητα**. Το pH του νερού της θάλασσας είναι γενικά σταθερό και ελαφρώς αλκαλικό. Τα περισσότερα ετερότροφα βακτηρία και μύκητες ευνοούν το ουδέτερο pH, με τους μύκητες να είναι πιο ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η αποικοδόμηση του πετρελαίου αυξάνεται όταν αυξάνεται το pH και ότι η βέλτιστη αποικοδόμηση παρουσιάζεται υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες. Οι αλλαγές στην αλατότητα μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου μέσω της αλλαγής του μικροβιακού πληθυσμού. Τα περισσότερα θαλάσσια είδη έχουν ένα βέλτιστο εύρος αλατότητας από 2.5 ως 3.5% και αυξάνονται λίγο ή καθόλου σε αλατότητα χαμηλότερη από 1.5 με 2%. Σε μια μελέτη αλμυρών λιμνών εξάτμισης, απεδείχθη ότι ο ρυθμός μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μειώθηκε με την αύξηση στην αλατότητα σε εύρος από 3.3 έως 28.4%.

#### **2.1.4. Η ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΕ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Ο όρος “**βιοαποικοδόμηση**” μπορεί να αναφέρεται στην πλήρη διάσπαση (**mineralization**) των οργανικών ρύπων σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ανόργανες ενώσεις και κυτταρικές πρωτεΐνες ή στην μετατροπή τους σε άλλες οργανικές ενώσεις. Η βιοαποικοδόμηση των οργανικών ρύπων επιτελείται από ένζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί. Επειδή πολλά από αυτά τα ένζυμα δεν απελευθερώνονται από τα μικροβιακά κύτταρα, οι προς αποικοδόμηση ενώσεις πρέπει γενικότερα να έρχονται σε επαφή ή να μεταφέρονται στα μικροβιακά κύτταρα. Για την πλήρη βιοαποικοδόμηση των διαφόρων οργανικών ρύπων, μπορεί να απαιτούνται πολλοί τύποι ενζύμων γιατί, όπως είναι γνωστό, τα ένζυμα είναι επιλεκτικά για τα υποστρώματα που επιδρούν. Η βιοαποικοδόμηση λοιπόν μιας ένωσης είναι μια βηματική διαδικασία που περιλαμβάνει ποικιλία διαφορετικών μικροοργανισμών και ενζύμων. Συνεπώς, στο φυσικό περιβάλλον, ένα συστατικό μπορεί να μη διασπαστεί πλήρως, αλλά να μετατραπεί σε ενδιάμεσο/-α προϊόν/-ντα το οποίο/-α μπορεί να είναι λιγότερο, εξίσου, η πιο τοξικό/-ά σε σχέση με την αρχική (μητρική) ένωση, καθώς επίσης και περισσότερο ή λιγότερο κινητικό/-ά στο περιβάλλον. Επιπροσθέτως, πολλές ενώσεις υδρογονανθράκων οι οποίες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα ή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς, μπορούν να διασπασθούν από ένζυμα που παράγονται από μικροοργανισμούς για το μεταβολισμό άλλων ενώσεων. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως συµμεταβολισμός (coometabolism). Το μη ανεπτυγμένο υπόστρωμα είναι ουσιαστικά μόνο ατελώς οξειδωμένο από τον μικροοργανισμό που συμμετέχει, όμως άλλοι μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιήσουν παραπροϊόντα της συµμεταβολικής διαδικασίας. Ο συµμεταβολισμός μπορεί να είναι προαπαιτούμενος στη διάσπαση πολλών δύσκολα βιοαποικοδομήσιμων ενώσεων όπως οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs). Η βιοαποικοδόμηση είναι βασικά μια διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία καταλύεται από μικροβιακά ένζυμα. Βιολογική ενέργεια παράγεται από την οξείδωση των ανηγμένων ουσιών. Ηλεκτρόνια μετακινούνται από τα οργανικά υποστρώματα για να δεσμεύσουν ενέργεια μέσω της οξειδωτικής διαδικασίας. Τα ηλεκτρόνια μετακινούνται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας ή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (μεταβολικά μονοπάτια), που αποτελούνται από σειρά ενώσεων, προς

τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων. Μια μεγάλη αναλογία του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό εξαρτάται από το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων για το μεταβολισμό. Η απώλεια οξυγόνου προκαλεί μεταβολές της δραστηριότητας και της σύστασης του μικροβιακού πληθυσμού του εδάφους. Όταν το οξυγόνο δεν είναι διαθέσιμο υπερτερούν μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν οξυγόνο όταν υπάρχει αλλά και να στραφούν σε εναλλακτικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, όπως νιτρικά και θειικά ιόντα, όταν το οξυγόνο απουσιάζει. Υπάρχουν λοιπόν δύο μεγάλες κατηγορίες αντιδράσεων βιοαποικοδόμησης, η αερόβια και η αναερόβια. Η αερόβια βιοαποικοδόμηση περιλαμβάνει τη χρήση μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) ως τελικού δέκτη ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από έναν οργανικό ρύπο :



Έτσι, το οργανικό υπόστρωμα οξειδώνεται (προσθήκη οξυγόνου) και το  $O_2$  ανάγεται (προσθήκη ηλεκτρονίων και υδρογόνου) σε νερό ( $H_2O$ ). Σε αυτήν την περίπτωση, το οργανικό υπόστρωμα χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας (ηλεκτρόνια) και πηγή άνθρακα για τη δημιουργία νέων μικροβιακών κυττάρων (βιομάζα). Κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης είναι συνήθως περιορισμένος λόγω του συμφυούς ρυθμού αποικοδόμησης των ενεργών μικροοργανισμών, η προσαρμοστικότητα τους είναι αργή, απαιτώντας μήνες ή και χρόνια ακόμα, και η μεταβολική δραστηριότητα τους καταλήγει στο σχηματισμό ατελώς οξειδωμένων, απλών οργανικών ουσιών, όπως οργανικά οξέα και παραπροϊόντων, όπως μεθανίου ( $CH_4$ ) ή υδρογόνου ( $H_2$ ). Ο ορισμός για την **βιοδιαθεσιμότητα** δόθηκε από τους Semple et al. (2004) όπου η βιοδιαθεσιμότητα εκφράζει τη «μέγιστη ποσότητα ενός ρύπου που είναι διαθέσιμη να ληφθεί από έναν μικροοργανισμό μέσα σε μία καθορισμένη χρονική περίοδο».

#### **2.1.4.1. Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΩΣ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ**

Ο ρυθμός της μικροβιακής αποσύνθεσης των υδρογονανθράκων στο νερό είναι μια λειτουργία αρκετών, είτε μεμονωμένων ή συνδυασμένων παραγόντων (Macleod et al., 2001):

1. Της βιοδιαθεσιμότητας και βιοπροσβασιμότητας των ρύπων στους μικροοργανισμούς που έχουν την καταβολική δραστικότητα να τους αποικοδομήσουν.
2. Του αριθμού των αποικοδομητικών μικροοργανισμών που υπάρχουν.
3. Της δραστικότητας των αποικοδομητικών μικροοργανισμών, και
4. Της μοριακής δομής των συστατικών του ρύπου.

Εν τούτοις, οι διεργασίες που ελέγχουν την εξέλιξη της καταβολικής δραστικότητας των μικροοργανισμών δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ένας αριθμός μικροβιακών χαρακτηριστικών έχει φανεί να επηρεάζει τη μεταφορά των χημικών ουσιών στους βιοαποικοδομητικούς μικροοργανισμούς. Σχετικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν κυρίως μορφολογικές και φυσιολογικές προσαρμογές μεμονωμένων μικροβιακών κυττάρων και πληθυσμών, καθώς επίσης φαινόμενα που σχετίζονται με τη δυναμική και την οικολογία ολόκληρων φυσικών αποικιών.

Η καταβολική δραστικότητα μπορεί να αναπτυχθεί με προσαρμογή, μέσω των ακόλουθων διαδικασιών:

1. Τη διέγερση ή καταστολή ειδικών ενζύμων
2. Την ανάπτυξη νέων μεταβολικών ικανοτήτων μέσω γενετικών αλλαγών, όπως μεταφορά πλασμιδίων ή μετάλλαξη, και
3. Τον επιλεκτικό εμπλουτισμό μικροοργανισμών ικανών να μετασχηματίσουν το ρύπο (ρύπους) (Spain & van Veld, 1983; Pritchard & Bourquin, 1984).

Υπάρχει μια ευρεία κλίμακα μηχανισμών που οδηγούν στη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων και έχουν περιγραφεί από τους Johnsen and Karlson (2004). Δύο από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς, η αύξηση διαλυτότητας και η άμεση επαφή,

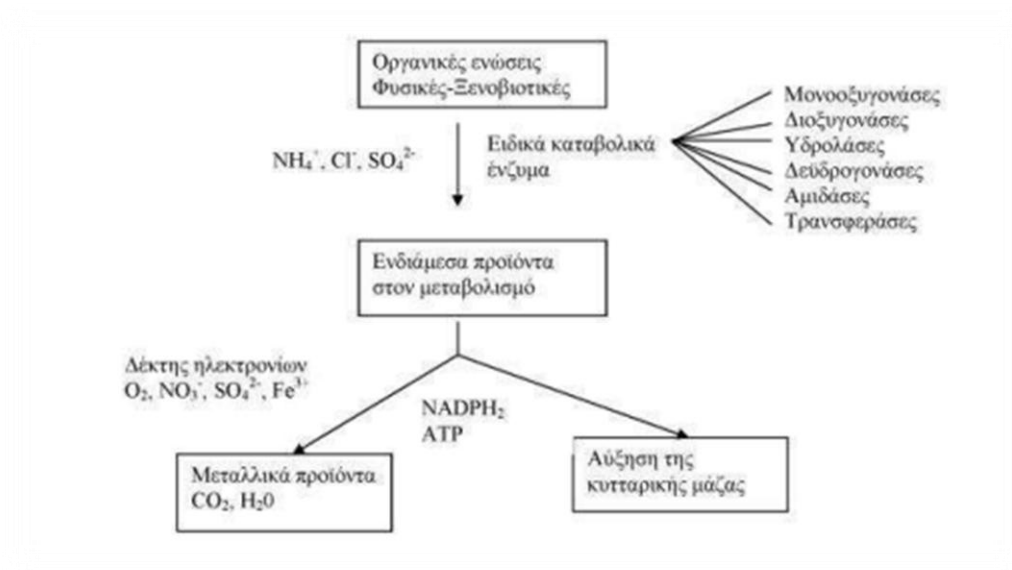
μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων που έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό. Η αύξηση διαλυτότητας περιλαμβάνει την παραγωγή τασιενεργών από τους μικροοργανισμούς, τα βιοτασιενεργά, που αυξάνουν τη συγκέντρωση των υδρογονανθράκων στην υδατική φάση.

Στην άμεση επαφή, τα βακτηριακά κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια των υδρογονανθράκων. Η άμεση επαφή μπορεί να διευκολυνθεί από τασιενεργές ουσίες (μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια, καθώς επίσης και μεγαλύτερου μοριακού βάρους γλυκολιπίδια (Cirigliano and Carman, 1984), που παράγονται από τα κύτταρα και ενισχύουν την προσκόλληση μεταξύ κυτταρικής μεμβράνης και διαθέσιμου υδρογονάνθρακα (Haferburg et al., 1986; Bouchez-Naitali et al., 1999). Επιπλέον, η έκταση βιοαποικοδόμησης από βακτήρια που δεν παράγουν τασιενεργά δεν ενισχύεται από την προσθήκη τασιενεργών, γεγονός που δηλώνει ότι ο ρόλος των ενώσεων αυτών είναι ειδικός κατά είδος (Noordman and Janssen, 2002).

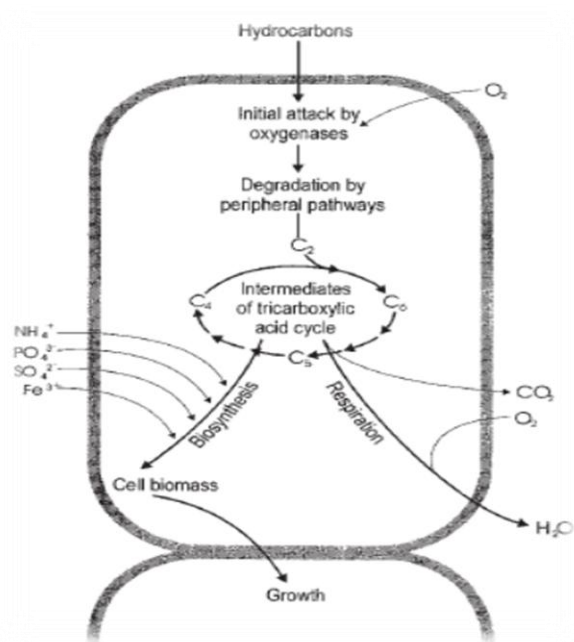
#### **2.1.4.2. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΩΝ**

Τα βασικά χαρακτηριστικά των αερόβιων μικροοργανισμών που αποικοδομούν οργανικούς ρύπους είναι τα εξής : **(1)** Εκτελούν μεταβολικές διαδικασίες για τη βελτιστοποίηση της επαφής μεταξύ των κυττάρων τους και των οργανικών ρύπων. Οι ρύποι πρέπει να είναι διαθέσιμοι στους μικροοργανισμούς με βιοαποικοδομητική δράση. Για παράδειγμα, οι υδρογονάνθρακες είναι αδιάλυτοι στο νερό οπότε η αποικοδόμησή τους απαιτεί την παραγωγή τασιενεργών. **(2)** Η αρχική ενδοκυτταρική προσβολή (επίθεση) των οργανικών ρύπων είναι μια οξειδωτική διαδικασία. Η ενεργοποίηση και ενσωμάτωση του οξυγόνου είναι η ενζυμική αντίδραση κλειδί που καταλύεται από οξυγονάσες και υπεροξειδάσες. **(3)** Περιφερειακά μονοπάτια αποικοδόμησης μετατρέπουν οργανικούς ρύπους βήμα προς βήμα σε ενδιάμεσα προϊόντα του κύριου μεταβολισμού, π.χ., ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος. **(4)** Πραγματοποιείται βιοσύνθεση κυττάρων από τους κύριους πρόδρομους μεταβολίτες, π.χ., ακετυλ-CoA, ηλεκτρικό, πυροσταφυλικό. Απαιτούνται επίσης σάκχαρα για διάφορες βιοσυνθέσεις και η ανάπτυξη γίνεται μέσω γλυκονεογένεσης.

Τα προϊόντα αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων, που έχουν εισαχθεί στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, έχουν διττή λειτουργία. Αποτελούν υποστρώματα του ενεργειακού μεταβολισμού και δομικούς λίθους για τη βιοσύνθεση κυττάρων και την ανάπτυξή τους (Σχήμα 2.2). Η σύνθεση αμινοξέων και πρωτεϊνών χρειάζεται πηγή αζώτου και θείου, ενώ των νουκλεοσιδίων και νουκλεϊνικών οξέων πηγή φωσφόρου. Η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων απαιτεί ενεργοποιημένα σάκχαρα που συντίθενται με τη γλυκονογένεση.



Σχήμα 2.2: Αρχή της αποδόμησης.



Σχήμα 2.3 : Βασικές αρχές αερόβιας αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων.



Προϊόντα πλήρους αποικοδόμησης είναι το CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και κυτταρική βιομάζα. Τα κύτταρα δρουν ως πολύπλοκοι βιοκαταλύτες της αποικοδόμησης. Επιπλέον, μπορεί να αποσυντίθενται μετά από εξάντληση των ρύπων στη ρυπασμένη περιοχή. Οι ενζυμικές αντιδράσεις κλειδιά στην αερόβια βιοαποικοδόμηση είναι οι οξειδώσεις που καταλύονται από οξυγονάσες και υπεροξειδάσες. Οι οξυγονάσες είναι ουσιαστικά οξειδοαναγωγάσες που χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο για να ενσωματώσουν άτομα οξυγόνου στο υπόστρωμα. Οι αποικοδομητικοί μικροοργανισμοί χρειάζονται οξυγόνο σε δύο σημεία του μεταβολισμού, στην αρχική “επίθεση” του υποστρώματος και στο τέλος της αλυσίδας αναπνοής (Σχήμα 2.3). Οι κυρίαρχοι αποικοδομητές των οργανικών ρύπων στην οξική ζώνη των ρυπασμένων περιοχών χρησιμοποιούν ένα μεγάλο αριθμό από φυσικές και ξενοβιοτικές ενώσεις ως πηγές άνθρακα και δότες ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας. Αν και πολλά βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν οργανικούς ρύπους, ένα είδος μόνο δεν έχει την ενζυμική ικανότητα να αποικοδομήσει όλες ή έστω τις περισσότερες οργανικές ενώσεις σε ένα ρυπασμένο πεδίο. Αντιθέτως, μίγματα μικροβιακών αποικιών έχουν το πιο υψηλό βιοαποικοδομητικό δυναμικό διότι οι γενετικές πληροφορίες περισσότερων του ενός είδους μικροοργανισμών είναι απαραίτητες για την αποικοδόμηση περίπλοκων μιγμάτων οργανικών ουσιών που υπάρχουν στις ρυπασμένες περιοχές. Συνεπώς η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση (consortia).

Επομένως, το γενετικό δυναμικό και συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η αλατότητα και οι διαθέσιμες πηγές αζώτου, φωσφόρου και οξυγόνου, φαίνεται ότι καθορίζουν το ρυθμό και την έκταση της βιοαποικοδόμησης. Η βιοαποικοδομησιμότητα των μεμονομένων συστατικών του πετρελαίου έχει άμεση σχέση με τη χημική δομή τους, αλλά επίσης επηρεάζεται πολύ και από τη φυσική κατάσταση και την τοξικότητά τους. Για παράδειγμα, ενώ τα n-αλκάνια, λόγω δομής, είναι οι πιο εύκολα βιοαποικοδομήσιμοι υδρογονάνθρακες πετρελαιοειδών, οι ομόλογες ενώσεις τους C<sub>5</sub>–C<sub>10</sub>, μπορεί να είναι ανασταλτικές για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, διότι, ως διαλύτες, αυτές οι ενώσεις έχουν την τάση να διασπούν τη λιπιδική κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών (Okoh, 2006). Παρόμοια, αλκάνια μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας (C<sub>20</sub>–C<sub>40</sub>) γνωστά και ως “κηροί” που είναι υδρόφοβες ενώσεις και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

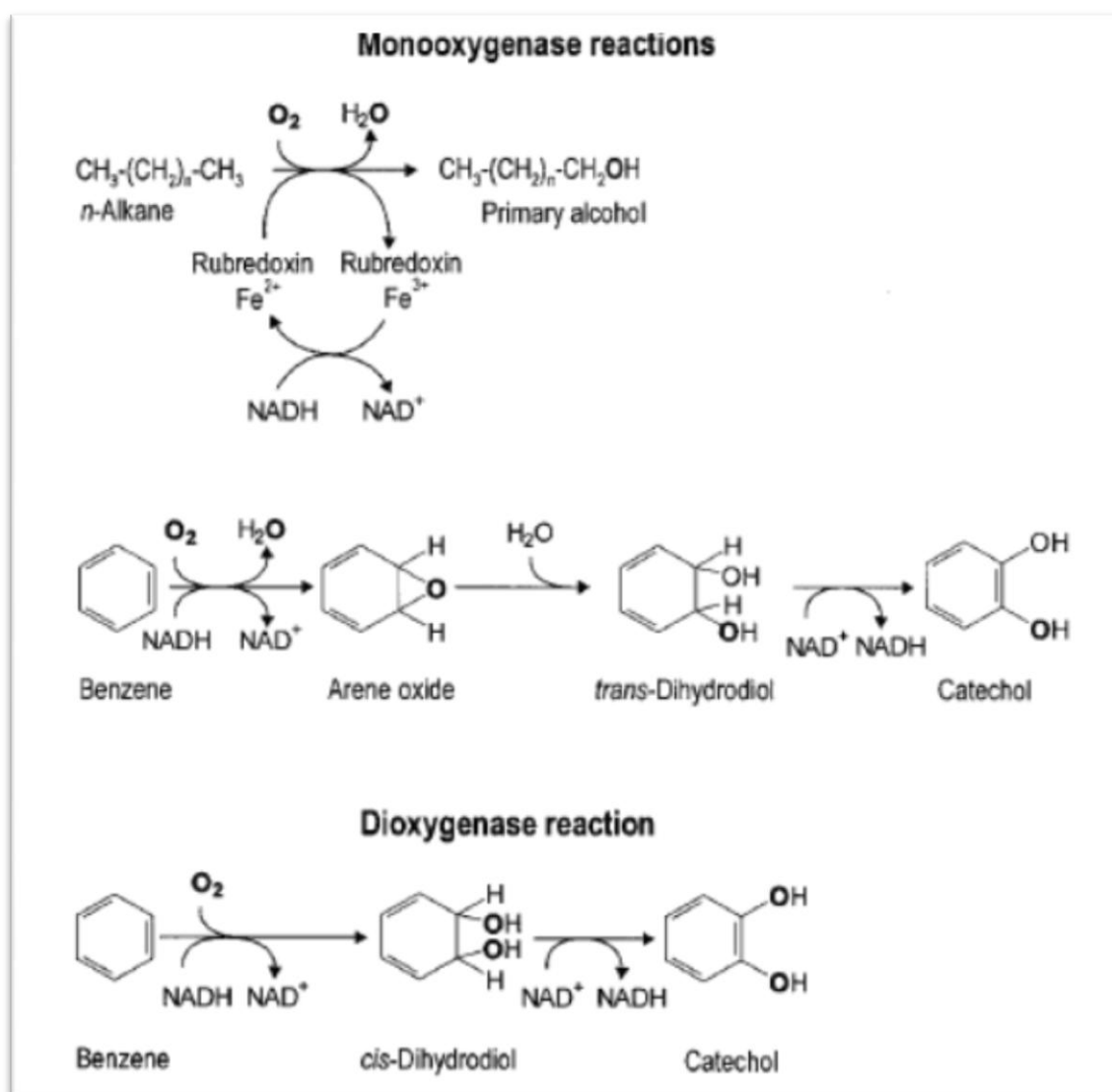
βρίσκονται σε στερεή μορφή, είναι πολύ δύσκολο να βιοαποικοδομηθούν λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους στο νερό και κατά συνέπεια της μικρής βιοδιαθεσιμότητάς τους (Bartha, 1986). Τα διακλαδισμένα αλκάνια βιοαποικοδομούνται πιο αργά σε σχέση με τα αντίστοιχα n-αλκάνια (Singer and Finnerty, 1984), ενώ οι μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις βιοαποικοδομούνται με πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τα ομόλογά τους n- και ισο-αλκάνια και με μεγαλύτερους ρυθμούς συγκριτικά με τα κυκλοαλκάνια. Οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης των κυκλοαλκανίων είναι κατά κάποιο τρόπο μεταβαλλόμενοι και συνήθως εμπλέκουν πολλά είδη μικροοργανισμών. Οι πολυαρωματικές ενώσεις με μεγάλο αριθμό δακτυλίων (PAHs), τα κυκλοαλκάνια, οι πίσσες και τα ασφαλικά υλικά, έχουν τα υψηλότερα σημεία ζέσεως και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντίσταση στη βιοαποικοδόμηση (Atlas, 1981). Τέλος, οι ετερογένειες στη σύσταση μεταξύ διαφόρων τύπων αργού πετρελαίου και διυλισμένων προϊόντων του, επηρεάζουν το συνολικό ρυθμό βιοαποικοδόμησης των πετρελαίων αλλά και των συστατικών τους (Leahy and Colwell, 1990).

#### **2.1.4.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΩΣΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ**

Η έναρξη της αερόβιας βιοαποικοδόμησης των αλειφατικών και μονοαρωματικών υδρογονανθράκων απαιτεί μοριακό οξυγόνο. Το **Σχήμα 2.4** δείχνει και τους δύο τύπους ενζυμικών αντιδράσεων που μπορούν να πραγματοποιηθούν σε αυτές τις διαδικασίες. Για το ποια ενζυμική αντίδραση θα πραγματοποιηθεί κάθε φορά εξαρτάται από τη φύση του υποστρώματος και το είδος των ενζύμων ή του ενζυμικού συστήματος που κατέχουν οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί.

Τα n-αλκάνια είναι τα κύρια συστατικά των υδρογονανθράκων των πετρελαιοειδών. Μεγάλης αλυσίδας n-αλκάνια (C10-C24) βιοαποικοδομούνται αρκετά γρήγορα, σε αντίθεση με τα μικρής αλυσίδας n-αλκάνια (με λιγότερο από C9), εκτός του ότι εξατμίζονται γρήγορα από τις ρυπασμένες περιοχές είναι και τοξικά για πολλούς μικροοργανισμούς. Η οξείδωση των n-αλκανίων κατηγοριοποιείται σε **τερματική (terminal)** ή **διτερματική (diterminal)**. Η τερματική οξείδωση είναι το κύριο μονοπάτι. Διεξάγεται μέσω σχηματισμού της αντίστοιχης αλκοόλης, αλδεΐδης και

λιπαρού οξέος, (οδός που ισχύει για τη βιομεταβολή όλων των περιεχόμενων υδρογονανθράκων). Τα λιπαρά οξέα με φυσιολογικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας μπορεί να ενσωματωθούν άμεσα στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά η πλειοψηφία των προϊόντων αποικοδόμησης εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Η υποτερματική ή παράπλευρη (subterminal) οξείδωση συμβαίνει σε μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας (C3-C6), αλλά και μεγαλύτερης, αλκάνια με το σχηματισμό δευτεροταγούς αλκοόλης και επακολούθως κετόνης.



**Σχήμα 2.4 :** Αρχική “επίθεση” οξυγονασών σε ξενοβιοτικές ενώσεις. Οι μονο-οξυγονάσες ενσωματώνουν ένα άτομο οξυγόνου στο υπόστρωμα, το δεύτερο άτομο οξυγόνου ανάγεται σε  $\text{H}_2\text{O}$ . Οι δι-οξυγονάσες ενσωματώνουν και τα δύο άτομα οξυγόνου στο υπόστρωμα.

Τα πρωτοταγή αλκένια (1-αλκένια) με αριθμούς ατόμων άνθρακα από C3–C16, μετατρέπονται από μονο-οξυγονάσεις, μέσω τερματικής ή υποτερματικής οξείδωσης στο κορεσμένο άκρο της αλυσίδας τους, στις αντίστοιχες 1- ή 2- αλκοόλες. Αυτές ακολούθως μετατρέπονται σε οξύ ή σε α-ύδροξυ-οξύ αντίστοιχα τα οποία αποκόπτονται από την ανθρακική αλυσίδα (αποκοπή 2 ατόμων C). Η μεθυλ-διακλάδωση γενικότερα αυξάνει την αντίσταση των υδρογονανθράκων στη μικροβιακή αποικοδόμηση (Pirnik, 1977 Schaeffer et al., 1979 Fall et al., 1979). Όπως στην περίπτωση των n-αλκανίων, έτσι και οι μονοκυκλικές ενώσεις, κυκλοπεντάνιο, κυκλοεξάνιο και κυκλοεπτάνιο έχουν την ικανότητα να διαλύουν τη λιπιδική κυτταρική μεμβράνη και άρα είναι τοξικές για την πλειοψηφία των βιοαποικοδομητικών μικροοργανισμών.

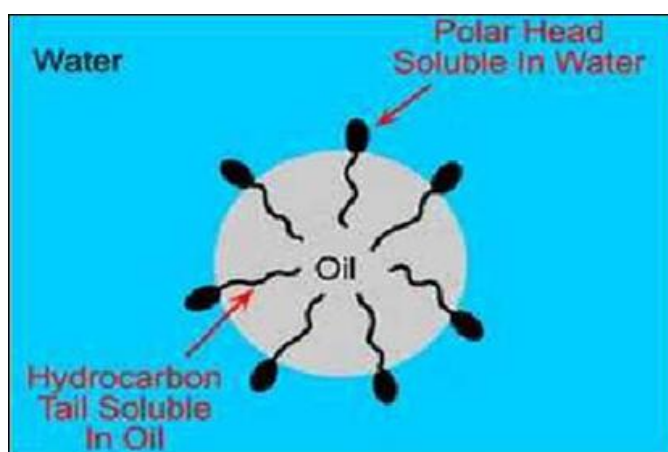
Τα κυκλοαλκάνια με μεγάλο αριθμό δακτυλίων αντιστέκονται στη βιοαποικοδόμηση λόγω της δομής και της φυσικής κατάστασής τους (Bartha, 1986a).

Οι μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις υπόκεινται σε εξάτμιση και η μικροβιακή αποικοδόμησή τους συνήθως απαιτεί διάλυσή τους (Kappeler and Wuhrmann, 1978). Εκτεταμένες μεθυλ-υποκαταστάσεις στον αρωματικό δακτύλιο μπορεί να παρεμποδίζουν την έναρξη της οξείδωσης (Cripps and Watkinson, 1978). Η αρχική ενζυμική αντίδραση μπορεί να συμβεί στον αλκυλ-υποκαταστάτη του αρωματικού δακτυλίου ή, εναλλακτικά, απευθείας στο δακτύλιο (Gibson, 1971). Οι πολυαρωματικές ενώσεις με μεγάλο αριθμό δακτυλίων βιοαποικοδομούνται κατά ένα δακτύλιο τη φορά, με παρόμοια μεταβολική οδό όπως οι μονοκυκλικές ενώσεις (Dean-Raymond and Bartha, 1975; Gibson, 1975; Cripps and Watkinson, 1978). Οι ασφαλικές ενώσεις έχουν την τάση να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης σε συγκριτικές ή καμιά φορά απόλυτες τιμές. Αυτό δηλώνει πως όχι μόνο έχουν την τάση να αντιστέκονται στη βιοαποικοδόμηση αλλά μπορεί επίσης να συντίθενται από αντιδράσεις συμπύκνωσης των ενδιάμεσων προϊόντων βιοαποικοδόμησης και φωτοαποικοδόμησης (Okoh, 2006). Η πλήρης αερόβια διάσπαση των οξυγονωμένων ενώσεων του αργού πετρελαίου (φαινόλες και κρεσόλες) από μικρόβια απομονωμένα από βιολάσπες και εδάφη, είναι γνωστή αρκετά καλά. Τα θειοφαίνια, υποκατεστημένα θειοφαίνια, διβενζοθειοφαίνια και ναφθοθειοφαίνια, οξειδώνονται είτε πλήρως (παραγωγή CO<sub>2</sub>), είτε μερικώς, από καλλιέργειες *Pseudomonas* and *Rhodococcus*, σε σουλφόνες ή SO<sub>2</sub>– 4 (Ensley, 1984, Monticello and Finnerty, 1985 Fedorak, 1990, Gallagher et al 1993 Kropp et al 1994).

Τέλος, η αερόβια και αναερόβια αποικοδόμηση των κοινών N-ετεροκυκλικών ενώσεων (πυριδίνη, κινολίνη και καρβαζόλη), που μπορεί να υπάρχουν (0.06–0.6%, Nagy and Colombo, 1967) σε κάποια είδη αργού πετρελαίου, έχει μελετηθεί από τους Kaiser et al. (1996).

#### **2.1.4.4. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Οι επιφανειακά δραστικές ενώσεις (surfactants) είναι οργανικά, αμφίφιλα μόρια τα οποία αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο μέρος. Το υδρόφιλο μέρος τους καθιστά τις επιφανειακά δραστικές ενώσεις διαλυτές στο νερό ενώ μέσω του υδρόφοβου τμήματος τους, συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες και μειώνουν την επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων.



**Εικόνα 2.4 :** Γραφική απεικόνιση επιφανειοδραστικών ουσιών.

Οι συνθετικές επιφανειοδραστικές ενώσεις, πετρελαϊκού χαρακτήρα, είναι τοξικές για το περιβάλλον, μη βιοδιασπώμενες και βιοσυσσωρεύονται. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφιλες ενώσεις μικροβιακής προέλευσης. Παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών. Είναι μη τοξικές, σχετικά ακίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις οι οποίες δύναται να παραχθούν υπό ex-situ συνθήκες, ενώ η in-situ παραγωγή τους μπορεί να

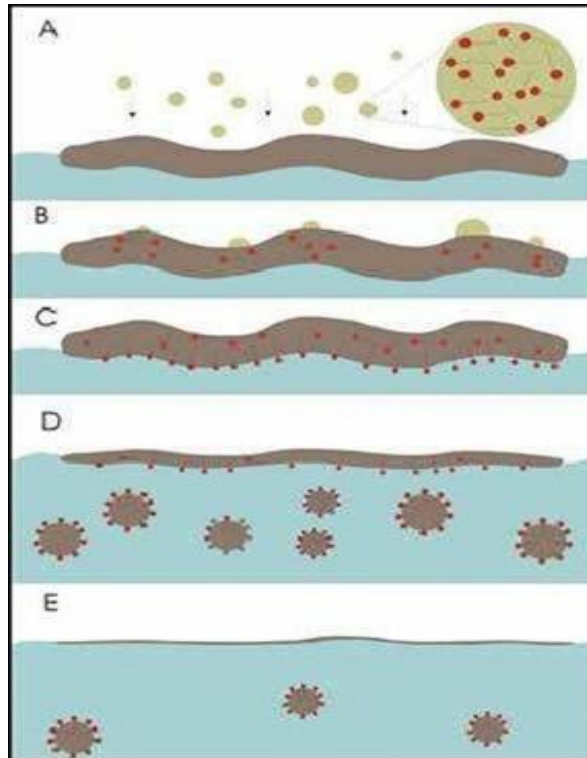
επιτευχθεί στην περιοχή που μολύνθηκε. Μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών είναι ο σχηματισμός μικκυλίων, δηλαδή μικρών συσσωματωμάτων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα υδατικά διαλύματα βρίσκονται σε μορφή μονομερών. Πέραν μίας συγκεκριμένης συγκέντρωσης που ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίου (CMC, Critical Micelle Concentration), τα μονομερή ενώνονται και σχηματίζουν συσσωματώματα 20-200 μορίων. Ανάλογα με την φύση του υδρόφοβου τμήματος, οι επιφανειακά δραστικές ενώσεις διακρίνονται σε κατιονικές, ανιονικές, διϊονικές και μη ιονικές. Τα υδρόφιλα τμήματα αποτελούνται από μία καρβοξυλική ή θειϊκή ομάδα, μια ομάδα τεταρτοταγούς αμμωνίου, πολυοξαιθυλένιο, σακχαρόζη ή ένα πολυπεπτίδιο. Οι βιοτασιενεργές ουσίες διακρίνονται σε έξι διαφορετικές κατηγορίες: Γλυκολιπίδια, λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες, ουδέτερα λιπίδια, λιπαρά οξέα και λιποσακχαρίτες. Διακρίνονται σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (γλυκολιπίδια) και σε μεγάλου μοριακού βάρους (πολυσακχαρίτες, λιποσακχαρίτες και πρωτεΐνες ή μείγματα αυτών). Για τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων έχουν αναφερθεί τρεις βασικοί μηχανισμοί :

1. Πρόσληψη των διαλυμένων υδρογονανθράκων στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί σε υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας.
2. Πρόσληψη υδρογονανθράκων οι οποίοι δεν βρίσκονται στην υδατική φάση από κύτταρα που έρχονται σε επαφή με πολύ μεγαλύτερες από αυτά σταγόνες υδρογονανθράκων. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί σε ελάχιστα διαλυτούς υδρογονάνθρακες.
3. Πρόσληψη υδρογονανθράκων που βρίσκονται σε μια ψευδο-διαλυμένη κατάσταση.

Η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των υδρογονανθράκων με την προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών ακολουθεί το παρακάτω μονοπάτι:

1. Μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υδατικής και μη υδατικής φάσης.
2. Αύξηση της διαλυτότητας των υδρογονανθράκων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διαλυτοποίηση (solubilization) και προκαλείται από την παρουσία μικκυλίων. Η διαλυτοποίηση εξαρτάται από τον τύπο και την συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας, την υδροφοβικότητα της, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ουσίας και θαλασσινού νερού καθώς και τον χρόνο παραμονής του ρύπου στην θάλασσα.

3. Ορισμένες από αυτές διευκολύνουν την προσκόλληση ή την αποκόλληση των μικροοργανισμών από την επιφάνεια του ρύπου, επιδρώντας έτσι στην υδροφοβικότητα της επιφάνειας των κυττάρων ή των ρυπογόνων ενώσεων.



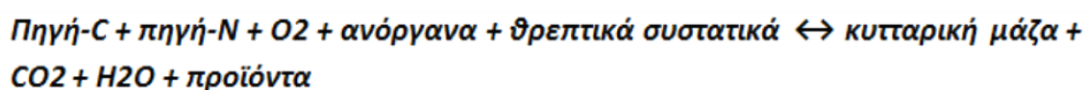
**Εικόνα 2.5 :** Μηχανισμός δράσης επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Σήμερα, ίσως τα πιο εκτενώς μελετημένα γλυκολιπίδια αποτελούν τα ραμνολιπίδια τα οποία αποτελούνται από ένα ή δύο μόρια ραμνόζης και ένα ή δύο μόρια β-υδροξυδεκανοϊκού οξέος. Παράγονται από πολλά στελέχη *Pseudomonas*.

Η παραγωγή των ραμνολιπιδίων εξαρτάται από τις πηγές άνθρακα και άλλων θρεπτικών υλικών καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία/ συγκέντρωση οξυγόνου. Τα ραμνολιπίδια έχουν καθιερωθεί ως οι πιο αποτελεσματικές επιφανειοδραστικές ουσίες και χρησιμοποιούνται εκτενώς στην ανάκτηση πετρελαίου (EOR), στην κινητοποίηση στο έδαφος και σε υδάτινα συστήματα αλλά και ως εντομοκτόνα λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι ραμνολιπίδια του *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν στην βιοεξυγίανση του ατυχήματος του Exxon Valdez.

#### 2.1.4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροοργανισμοί χρειάζονται θρεπτικά συστατικά (άζωτο, φωσφόρο και σε μικρότερες ποσότητες, κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρο, χλώριο και θείο) για σύνθεση νέων κυτταρικών υλικών και για τη δημιουργία ενζύμων. Η προσθήκη θρεπτικών (Βιοδιέγερση) έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου σε διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα. Παρόλα αυτά, μεγάλες ποσότητες από συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά (π.χ., φωσφόρος και θειικά ιόντα) μπορεί να καταστείλουν το μεταβολισμό. Η πραγματική ποσότητα του N και P που απαιτούνται για την βιοαποικοδόμηση των απελευθερούμενων υδρογονανθράκων εξειδικεύεται κάθε φορά, καθώς συνδέεται με τον τύπο του πετρελαίου και της τιμής υποβάθρου των θρεπτικών ουσιών στο θαλάσσιο περιβάλλον. Μια γενική προσέγγιση της ελάχιστης απαίτησης των μικροοργανισμών για θρεπτικά συστατικά μπορεί να βασιστεί στη στοιχειομετρία της συνολικής βιοαποικοδομητικής διεργασίας:



Από τους διαφορετικούς εμπειρικούς τύπους της κυτταρικής βιομάζας που έχουν προταθεί, οι πιο ευρέως αποδεκτοί είναι οι  $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  και  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3\text{N}_2\text{P}$ . Χρησιμοποιώντας τους παραπάνω εμπειρικούς τύπους για την κυτταρική βιομάζα, ο λόγος άνθρακα : αζώτου: φωσφόρου (C:N:P) που απαιτείται για την ενίσχυση της βιοαποικοδομητικής δράσης των μικροοργανισμών εμπίπτει στη διακύμανση από 100:10:1 έως 100:1:0.5, ανάλογα με το είδος των συστατικών του ρύπου και με τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη μεταβολική διεργασία

(<http://www.epa.gov/OUST/pubs/turn-ch2.pdf>). Πρόσφατα, συζητήθηκε η πιθανή εφαρμογή της resource-ratio theory - θεωρία που βασίζεται στην αναλογία των θρεπτικών για την βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων. Αυτή η θεωρία προτείνει τη χρήση της αναλογίας N:P για τον εμπλουτισμό διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών και ότι η βέλτιστη N:P αναλογία μπορεί να είναι διαφορετική για την αποικοδόμηση διαφορετικών ενώσεων, ενώ η πρακτική αξία αυτών των θεωριών παραμένει μια πρόκληση.



**Πίνακας 2.4 :** Διάφορες πηγές αζώτου και φώσφορου στην αποικοδόμηση του πετρελαίου.

Nitrogen source	Phosphorus source	Oil biodegraded, %
KNO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70
KNO <sub>3</sub>	Octylphosphate	72
KNO <sub>3</sub>	Isooctylphosphate	70
CRNF	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70
CRNF	Octylphosphate	72
Dodecylurea	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	37
Dodecylurea	Octylphosphate	35
Trimethylenetetraurea	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15
Trimethylenetetraurea	Octylphosphate	15
Hexamethylphosphoramide	Hexamethylphosphoramide	15
None added	None added	5

Τα ως άνω συνήθως χρησιμοποιούμενα θρεπτικά συστατικά είναι υδατοδιαλυτά θρεπτικά άλατα, και πολλά εμπορικά ανόργανα λιπάσματα (π.χ., το 23: 2 N: P λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε στην υπόθεση Exxon Valdez). Τυπικά, αυτά εφαρμόζονται στο πεδίο με ψεκασμό σαν υδατικά θρεπτικά διαλύματα ή με διασπορά υπό μορφή ξηρών κόκκων. Αυτή η προσέγγιση εφαρμόστηκε σε πολλές δοκιμές πεδίου και βρέθηκε να είναι αποτελεσματική στην ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης πετρελαίου (Röling κ.ά., 2004. Swannell et al., 1996. Venosa et al., 1996), συμπεριλαμβανομένων των αρκτικών περιβαλλόντων (Prince et al, 2003). Ωστόσο, το πρόβλημα που παραμένει είναι ότι οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες εύκολα “ξεπλένονται” (washout) με τη δράση παλιρροιών και κυμάτων και έτσι η ενισχυμένη βιοαποικοδόμηση είναι δύσκολο να επιτευχθεί σε μη προστατευόμενα θαλάσσια περιβάλλοντα ή σε μέτριας προς υψηλής ενέργειας ακτές.

**Βραδείας απελευθέρωσης λιπάσματα (slow release fertilizers) :** Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να σχεδιαστεί ένα σύστημα διανομής θρεπτικών που να υπερνικά τα προβλήματα έκλυσης (washout problems), χαρακτηριστικά των παλιρροιακών περιβαλλόντων και της ανοιχτής θάλασσας. Η χρήση των λιπασμάτων βραδείας απελευθέρωσης με συνεχή παροχή θρεπτικών ουσιών στις ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές ξεπερνά την απαίτηση πολλαπλών εφαρμογών θρεπτικών υλών στο πεδίο και με αποτέλεσμα οικονομικά οφέλη σε σύγκριση με τη χρήση υδατοδιαλυτών θρεπτικών συστατικών που, προκύπτουν από λιγότερο συχνή

εφαρμογή τους. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης αποτελούνται από ανόργανες θρεπτικές ουσίες σε στερεή μορφή, που επικαλύπτονται με υδροφοβικά υλικά όπως η παραφίνη ή τα φυτικά έλαια (Νικολοπούλου και Καλογεράκης 2009) . Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης είναι πολλά υποσχόμενα με βάση τις μελέτες βιοεξυγίανσης και τις εφαρμογές τους. Το πιο γνωστό λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης, Customblen (μείγμα από φωσφορικό ασβέστιο, φωσφορικό αμμώνιο, και νιτρικό αμμώνιο επικαλυμμένο με φυτικό έλαιο) απέδωσε καλά σε μερικές από τις ακτές του Prince William Sound, ιδιαίτερα σε συνδυασμό και με ένα ελαιόφιλο λίπασμα. (Atlas 1995, Swannell κ.ά ., 1996).

Παρ' όλα αυτά, η πρόκληση που παραμένει στην εφαρμογή λιπασμάτων βραδείας απελευθέρωσης είναι να ελεγχθούν οι ταχύτητες (τα ποσοστά) απελευθέρωσης τους, έτσι ώστε κατάλληλες συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών να μπορούν να διατηρηθούν επί μακρύτερες χρονικές περιόδους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ταχείς ρυθμοί απελευθέρωσης δεν παρέχουν μια μακράς διάρκειας πηγή θρεπτικών συστατικών, ενώ αργοί ρυθμοί απελευθέρωσης δεν επαρκούν για να αυξηθούν οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης. Για παράδειγμα, οι Sveum και Ramstad, 1995 δοκίμασαν το Max Bac, ένα λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης παρόμοιο με το Customblen, και διαπίστωσαν ότι απέτυχε να ενισχυθεί η βιοαποικοδόμηση πετρελαίου σημαντικά λόγω του αργού ρυθμού αποδέσμευσης του. Από την άλλη πλευρά, αν κάποιος χρησιμοποιεί ένα μίγμα από υδατοδιαλυτά και από βραδείας απελευθερώσεως λίπασμα σε μία εφαρμογή μπορεί να ληφθούν καλύτερα αποτελέσματα.

**Ελαιόφιλα (λιπόφιλα) βιοδιεγερτικά θρεπτικά (oleophilic biostimulants) :** Μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση η οποία ξεπερνά το πρόβλημα της ταχείας αραίωσης και ξεπλύματος των υδατοδιαλυτών θρεπτικών που περιέχουν άζωτο και φώσφορο είναι τα ελαιόφιλα βιοδιεγερτικά. Η χρήση πηγών N και P σε ελαιόφιλη μορφή θεωρείται ότι είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος εφαρμογής θρεπτικών συστατικών, αφού ελαιόφιλα πρόσθετα παραμένουν διαλυμένα στην ελαιώδη φάση και έτσι είναι διαθέσιμα στη διεπιφάνεια πετρελαίου-νερού ή ελαίου-ιζήματος όπου ενισχύουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των βακτηρίων. (Santas and Santas, 2000). Το πλέον γνωστό ελαιόφιλο λίπασμα είναι το Inipol EAP22, ένα μικρογαλάκτωμα που περιέχει ουρία ως πηγή N, λωρυλ-φωσφορικά ως P-πηγή, 2-βουτοξυ-1-αιθανόλης ως

επιφανειοδραστικό, και ελαϊκό οξύ για να δώσει στο μίγμα υδροφοβικότητα. Αυτό το λίπασμα έχει υποβληθεί σε εκτεταμένες μελέτες υπό διάφορες συνθήκες ακτογραμμής και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε βιοεπανόρθωση πετρελαίου στις ακτές του Prince William Sound (Swannell κ.ά., 1996. Zhu et al., 2001). Ένα άλλο ελαιόφιλο λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην πετρελαιοκηλίδα του Prestige από αργό πετρέλαιο είναι το S200 που διαφέρει από Inipol EAP 22 μόνο στο τύπο του επιφανειοδραστικού συστατικού (Díez et al, 2005, Jiménez et al., 2006). Άλλα ελαιόφιλα λιπάσματα περιλαμβάνουν πολυμερισμένη ουρία και φορμαλδεΰδη, καθώς και οργανικά λιπάσματα που προέρχονται από φυσικά προϊόντα όπως τα ιχθυάλευρα και κρεατάλευρα ή από φυσικά παραπροϊόντα όπως guano λίπασμα. Ως εναλλακτική λύση για τα χημικά τασιενεργά που υπάρχουν στα περισσότερα εμπορικά λιπόφιλα βιοδιεγερτικά (biostimulant) σκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιοτασιενεργά. Βιοτασιενεργά είναι επιφανειοδραστικές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς. Γλυκολιπίδια, πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, και λιποπεπτίδια, που παράγονται από διάφορα βακτηριακά γένη, έχουν τύχει προσοχής για περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως η βιοαποκατάσταση, το πλύσιμο του εδάφους, και ξέπλυμα του εδάφους. Βιοτασιενεργά φαίνεται να ενισχύσουν τη βιοδιάσπαση με αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των οργανικών ρύπων συμπεριλαμβανομένων των συστατικών του αργού πετρελαίου. Λόγω της βιοδιασπασιμότητας τους και της χαμηλής τοξικότητας είναι πολύ ελπιδοφόρα για χρήση σε τεχνολογίες αποκατάστασης (Mulligan, 2005). Ωστόσο, η επιτυχής εμπορευματοποίηση των βιοτασιενεργών μπορεί να επιτευχθεί, μόνο εάν το κόστος παραγωγής τους είναι χαμηλό και η αποτελεσματικότητά τους σαν παράγοντες διασποράς και αποκατάστασης έχει αποδειχθεί στον τομέα αυτό. Οι ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων βιοτασιενεργών με ποικίλες περιβαλλοντικές εφαρμογές συνεχίζεται (Mulligan, 2005, Saeki κ.ά., 2009).

Η αποτελεσματικότητα των λιπόφιλων βιοδιεγερτικών σκευασμάτων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του χώρου, όπως ο τύπος του ιζήματος και η υψηλής/χαμηλής ενέργειας επίδραση των κυμάτων και της παλίρροιας. Ήδη από τα αρχικά στάδια φάνηκε ότι τα λιπόφιλα λιπάσματα είναι πιο αποτελεσματικά από τα υδατοδιαλυτά, όταν το διαρρέυσαν πετρέλαιο συσσωρεύεται στην παλίρροιακή ζώνη (Sveumetal., 1994), ενώ αντίθετα σε ζώνες χαμηλής ενέργειας δεν παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού της βιοδιάσπασης. Μεταβλητά αποτελέσματα επίσης παρήχθησαν

σχετιζόμενα με την συνεκτικότητα των λιπόφιλων λιπασμάτων. Έρευνες απέδειξαν ότι το Inipol EAP22 παραμένει σε μια αμμώδη ακτή για πολύ καιρό υπό την επίδραση των κυμάτων και της παλίνρροιας σε συνθήκες προσομοίωσης. Ωστόσο, η εμπειρία από πολύ υψηλής ενέργειας ακτές δείχνει ότι ακόμη και τα ελαιόφιλα λιπάσματα μπορούν να “ ξεπλυθούν” γρήγορα. Σημειώνεται ότι η προσθήκη βιοτασιενεργών του ραμνολιπιδίου από μόνη της, είχε μικρή επίδραση στην βιοαποικοδόμηση, ωστόσο, σε συνδυασμό με προσθήκη υδατοδιαλυτών θρεπτικών συστατικών, προκάλεσε σημαντική αύξηση του ρυθμού της βιοαποικοδόμησης (McKew et al., 2007). Αποκλειστική προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών δικαιολογείται μόνο για να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών γηρασμένου πετρελαίου, σε περιπτώσεις όπου τα επίπεδα υποβάθρου του N & P είναι αρκετά υψηλά ώστε να διατηρήσουν αυξημένα ποσοστά βιοαποικοδόμησης.

**Πίνακας 2.5 :** Κάποια από τα σημαντικότερα είδη θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου.

Τύπος θρεπτικού	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή στο πεδίο
<b>Υδατοδιαλυτά</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Άμεσα διαθέσιμα</li> <li>○ Εύκολα στον χειρισμό για να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις στόχοι των θρεπτικών</li> <li>○ Δεν επιδρούν με την οργανική ύλη</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ξεπλένονται γρήγορα από τα κύματα</li> <li>○ Απαιτείται χειρονακτική εργασία για την εφαρμογή τους</li> <li>○ Πιθανή τοξική επίδραση</li> </ul>	<p>Alaska (Pritchard et al., 1992)</p> <p>Delaware (Venosa et al., 1996)</p>
<b>Βραδείας απελευθέρωσης</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Παροχή συνεχούς πηγής θρεπτικών</li> <li>○ Φθηνότερη εφαρμογή σε σχέση με άλλου</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Η μη διατήρηση βέλτιστων ρυθμών απελευθέρωσης θρεπτικών</li> </ul>	<p>Alaska (Pritchard et al., 1992)</p> <p>Nova Scotia (Lee and Trembley 1993)</p> <p>Japan (Maki et al.,</p>

Λιπόφιλα	είδους θρεπτικά		2003)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ικανότητα προσκόλλησης στο πετρέλαιο</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ακριβά</li> <li>○ Μεταβλητής αποτελεσματικότητας</li> <li>○ Ο οργανικός άνθρακας που περιέχουν ενδέχεται να οδηγήσει σε ανοξικές συνθήκες</li> </ul>	Alaska (Pritchard et al., 1992) Nova Scotia (Lee and Levy, 1987; Lee and Levy, 1989; Lee et al., 1995a; Lee et al., 1995b) Cantabrian Coast, Spain (Jiménez et al., 2006 )

Διάφορες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ρυπασμένα από diesel υδάτινα περιβάλλοντα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές N, έδειξαν ότι η προσθήκη N που προέρχεται από νιτρικά ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) είχε καλύτερα αποτελέσματα από την χρήση N που προέρχεται από αμμωνιακά άλατα ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) επιβεβαιώνοντας έτσι προηγούμενες μελέτες σε μη ρυθμισμένα θαλάσσια περιβάλλοντα. Αυτό οφείλεται σε παραγωγή οξέος που προκύπτει από τον μεταβολισμό της αμμωνίας και το οποίο αναστέλλει την διαδικασία βιοαποικοδόμησης. Όταν το pH ρυθμίστηκε, η απόδοση της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου ήταν παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις, με μικρότερη χρονική υστέρηση για την αμμωνία. Αντίθετα, όταν το pH δεν ρυθμιζόταν, βρέθηκε ότι τα νιτρικά είχαν καλύτερη επίδραση στην ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης, χρησιμοποιώντας σαν βιοδείκτη το πριστάνιο. Συνοψίζοντας, πρέπει να σημειωθεί ότι σε περιπτώσεις υδάτινων περιβαλλόντων με χρόνια ρύπανση, πρέπει να γίνει προσεκτική εξέταση των συνθηκών που αναστέλλουν την βιοεξυγίανση, πριν γίνει η προσθήκη βραδείας απελευθέρωσης ή λιπόφιλων λιπασμάτων (Nikolopoulou and Kalogerakis, 2009). Ο πίνακας που ακολουθεί συνοψίζει την χρήση ή μη της βιοεξυγίανσης σαν μέσο αντιμετώπισης θαλάσσιας ρύπανσης βάσει του τύπου της ακτής και του ενεργειακού προφίλ της.

**Πινάκας 2.6 :** Χρήση ή μη της βιοεξυγιάνσης ανάλογα με τον τύπο της ακτής και του ενεργειακού προφίλ της.

Τύπος ακτής	Ενεργειακό προφίλ	
	Υψηλής Ενέργειας	Χαμηλής Ενέργειας
Cliffs, seawalls and piers	Δεν συστήνεται	Δεν συστήνεται
Rock platforms	Δεν συστήνεται	Δεν συστήνεται
Pebble beaches	Λιπόφιλα	Λιπόφιλα
Mixed sand and gravel beaches	Λιπόφιλα	Λιπόφιλα
Mixed sand and gravel beaches	Λιπόφιλα	Βραδείας Ενεργοποίησης
Fine grained sand beaches	Δεν συστήνεται	Βραδείας Ενεργοποίησης ή Υδατοδιαλυτά

### **3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ**

#### **3.1. ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων της βιοεξυγίανσης της Environmental Protection Agency (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος) (EPA) (40 CFRCh. I, Pt 300, App.C). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπά το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στην σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Το πρωτόκολλο αυτό, εξετάζει την μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και πολύαρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) χρησιμοποιώντας την ανάλυση στον Αέριο Χρωματογράφο- Φασματογράφο Μάζας.

Συνοπτικά, η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής στάδια:

- 1) Διεξαγωγή μικροβιολογικών αναλύσεων - βιοαποδόμηση πετρελαίου σε θαλασσινό περιβάλλον.
- 2) Υγρή εκχύλιση των δειγμάτων του πετρελαίου (Liquid-Liquid Extraction).
- 3) Διαχωρισμός των συστατικών των δειγμάτων του πετρελαίου σε κορεσμένα και αρωματικά κλάσματα, με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction).
- 4) Ανάλυση των παραχθέντων κλασμάτων σε χρωματογράφο μάζας υψηλής ανάλυσης GC/MS.

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

- Ογκομετρικές Φιάλες
- Σφαιρικές Φιάλες
- Διαχωριστικές Χοάνες
- Vials των 2, 5, 20, 40 ml
- Πιπέτες Pasteur
- Ανδροστάσιο
- Ενεργοποιημένο θεικό Νάτριο
- Ξηραντήρας
- Υαλοβάμβακας
- Suprasolve DCM(Διχλωρομεθάνιο)
- Suprasolve εξάνιο
- Ζυγός ακριβείας
- Μηχάνημα Αζώτου
- Περιστροφικός Εξατμιστήρας (Rotary Evaporator)
- Στήλες SPE (Solid Phase Extraction)
- Αέριος Χρωματογράφος-Φασματογράφος μάζας GC/MS

### 3.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Πριν την διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων, έγινε συλλογή καθαρού θαλασσινού νερού από την περιοχή του Αγίου Ονούφριου Χανιών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η εν λόγω περιοχή δεν έχει προηγούμενο ιστορικό ρύπανσης και ο χώρος δεν είναι ρυπασμένος είτε από βιομηχανικά, είτε από άλλα είδη αποβλήτων. Το πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα ελαφρύ αργό πετρέλαιο τύπου URALSK, το οποίο πριν από την χρήση του υποβλήθηκε σε απόσταξη με την μέθοδο ASTM-D-86 έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα πτητικότερα συστατικά του (ελαφρύ κλάσμα C12').



## ΕΙΔΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

### Θρεπτικά Καλλιέργειας-Επιφανειοδραστικά-Ρυθμιστικά

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν **λιπόφιλα** είδη θρεπτικών. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης των έχουν αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενη ενότητα. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκε και αξιολογήθηκε η χρήση ενός επιφανειοδραστικού (**Oil Begone**).

**Πηγές Αζώτου-Λιπόφιλα : Basfoliar Avant Natur SL**

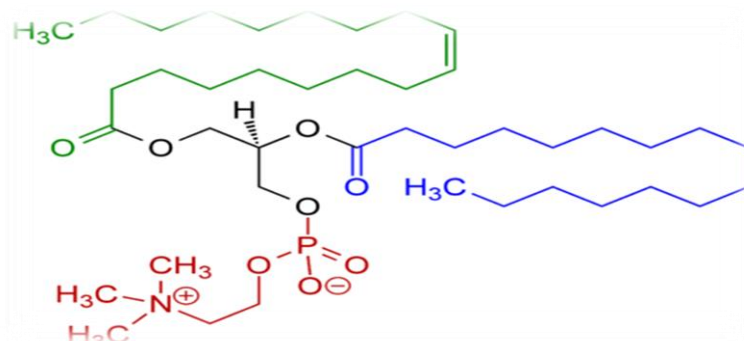
**Πηγές Φωσφόρου-Λιπόφιλα : Λεκιθίνη**

**Επιφανειοδραστικό : Oil Begone**

**Ρυθμιστικό pH : Bashnell Hass**

**Basfoliar Avant Natur SL:** Το Basfoliar Avant Natur SL (COMPOGmb H&Co) ανήκει στην κατηγορία των βιοδιεγερτικών θρεπτικών με υψηλή περιεκτικότητα αμινοξέων (10.3% ελεύθερα αμινοξέα) και 5.5% N οργανικής προέλευσης. Η απευθείας προσφορά ελεύθερων αμινοξέων, ουσιών που άμεσα προσλαμβάνονται και μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς, αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών.

**L-a-Lecithin (Λεκιθίνη):** Η λεκιθίνη (Sigma-Aldrich & Co) είναι ένας γενικός όρος που προσδιορίζει οποιαδήποτε ομάδα κίτρινων-καφέ λιπαρών ουσιών που υπάρχουν στους ζωικούς και φυτικούς ιστούς οι οποίοι αποτελούνται από φωσφορικό οξύ, χολίνη, λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, γλυκολιπίδια, τριγλυκερίδια, και φωσφολιποειδή.



**Εικόνα 3.1 :** Φωσφατιδυλοχολίνη, ένας τύπος φωσφολιπιδίου στην λεκιθίνη.

Η λεκιθίνη που χρησιμοποιήθηκε (L-a-Phosphatidylcholine-(L-a-Lecithin)), προέρχεται αποκλειστικά από σόγια, Type II-S, καθαρότητας περίπου 19%. Πρόκειται για ένα φυσικό φωσφολιπίδιο, λιποδιαλυτό το οποίο παράγεται σαν ένα χαμηλού κόστους παραπροϊόν της ελαιοβιομηχανίας από σπόρους και έχει καλές διασπартικές ιδιότητες (χρησιμοποιείται σαν βιοτασιενεργό).

Τα θρεπτικά προστέθηκαν σε τέτοιες ποσότητες ώστε η τελικά προκύπτουσα αναλογία συγκεντρώσεων να είναι ισοδύναμη με την C:N:P αναλογία μοριακοτήτων 100 :10:1.

**Oil Begone** : Το Oil Begone είναι ένα βιοαποδομήσιμο επιφανειοδραστικό μείγμα ειδικά σχεδιασμένο για να γαλακτωματοποιεί και να διασπείρει διαλύτες, καύσιμα, πετρέλαια και λίπη. Όταν χρησιμοποιείται σε διαρροές καυσίμων, μειώνει την απελευθέρωση των εύφλεκτων αερίων και των επιβλαβών προϊόντων τους. Σε πετρελαιοκηλίδες διασπά το “rainbow film” άμεσα και βοηθά στην απομάκρυνση συστατικών του πετρελαίου από όλες τις επιφάνειες. Είναι άχρωμο, άοσμο, έχει ουδέτερο pH, δεν είναι διαβρωτικό και χρησιμοποιείται ως έχει ή μετά από μερική αραίωση.

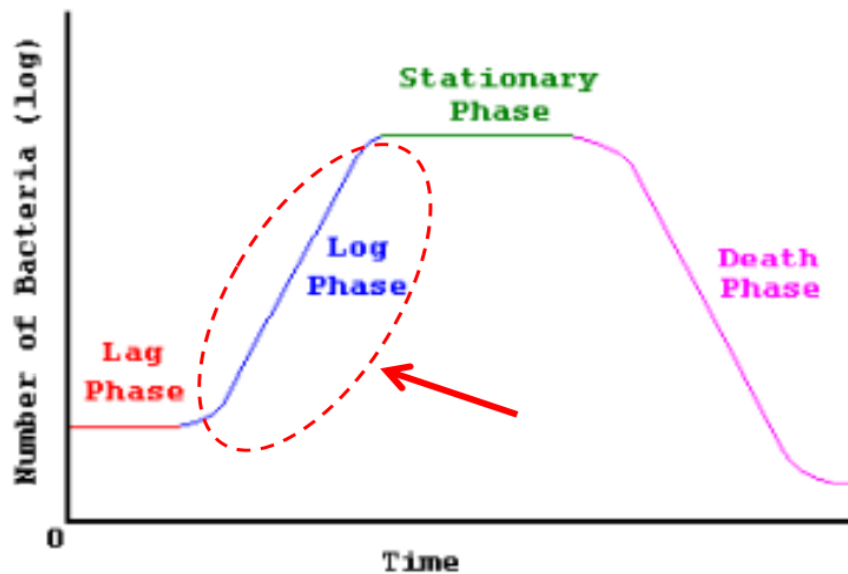
**Bushnell Hass Broth**: Το Bushnell Hass συνίσταται για τον έλεγχο καυσίμων για μικροβιακές μολύνσεις και για την μελέτη της αλλοίωσης των υδρογονανθράκων από την επίδραση των μικροβίων. Το Bushnell Hass παρασκευάζεται από την φόρμουλα των Bushnell και Hass και συστήνεται για την εξέταση μικροβιολογικών αναλύσεων καυσίμων από την επιτροπή SIM. Αυτό το ρυθμιστικό περιέχει όλα τα θρεπτικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, εκτός από την πηγή άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε σαν μέσο αραίωσης κατά την διεξαγωγή μικροβιολογικών αναλύσεων και παρασκευάστηκε διαλύοντας 3.27 gr Bushnell Hass σε 1000ml απιονισμένο νερό.

### **3.3. ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ – ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

#### **3.3.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών καλλιεργειών, εκτελούνται μικροβιακές απαριθμήσεις των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων σε κάθε γεγονός δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας έναν microtiter MPN προσδιορισμό. Αυτός χρησιμοποιείται ως δείκτης της σχετικής αλλαγής στη βιομάζα. Αυτή η δοκιμή στηρίζεται στη χρήση της απόκρισης ανάπτυξης ως ένδειξη ενισχυμένης δραστηριότητας σε σύγκριση με έναν έλεγχο (μάρτυρα) "καμίας προσθήκης". Η απαρίθμηση των συνολικών θαλάσσιων ετερότροφων λήφθηκε από ανάπτυξη ποσοτήτων των 100μL σε προεκτιμώμενες αραιώσεις, που προέκυψαν από τον MPN προσδιορισμό σε ZoBell Marine Agar 2216 (HiMedia). Τα τριβλία επωάσθηκαν στους 20°C για 48 h. Πρότυπες τεχνικές για την εκτέλεση των πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) μικροβιακών απαριθμήσεων περιγράφονται κατωτέρω. Στη συνέχεια αφαιρείται 1 ml ύδατος από κάθε φιάλη και προστίθεται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα αραιώσης που περιέχει 9 mL αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού (αραίωση 1:10) όπως περιγράφεται από τους Wrenn and Venosa. Χρησιμοποιώντας τεχνική αποστείρωσης, αναμειγνύονται και εκτελούνται τμηματικές αραιώσεις (1 mL της προηγούμενης αραιώσης σε 9 mL αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού) μέχρι την  $10^{-9}$  αραιώση. Γενικά, ο πληθυσμός των μικροβίων σε τέτοιου είδους πειράματα ακολουθεί την συμπεριφορά που παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα

## Μαθηματικές παράμετροι της εκθετικής αύξησης των βακτηρίων



και η οποία περιγράφεται από την εξής συνάρτηση :  $N = N_0 \times 2^n = N_0 \times e^{\mu \times t}$   
όπου :

**n** ο αριθμός των γενεών που ολοκληρώθηκαν

**N<sub>0</sub>** ο αρχικός αριθμός κυττάρων

**N** ο τελικός αριθμός κυττάρων

**μ** ο ειδικός ρυθμός αύξησης (specific growth rate)

**t** ο χρόνος αύξησης

### MPN Διαδικασία (μικροβιακοί αποδομητές πετρελαίου)

Οι αποδομητές υδρογονανθράκων εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο του πιο πιθανού αριθμού MPN-Most Probable Number, σύμφωνα με τους Wrenn and Venosa, 1996. Το μέσο ανάπτυξης ήταν ένα Bushnell-Hass minimal salts medium (BHS) που συμπληρώθηκε με πετρέλαιο σαν υπόστρωμα υδρογονανθράκων. Οι πλάκες MPN ήταν 96-πηγαδιών microtiter issue culture plates (μικροσυγκέντρωσης ιστοκαλλιέργειας πλακίδια), με κάθε πηγαδάκι να περιέχει 180 μl BHS, 5 μL πετρέλαιο και 20 μL δείγμα καθορισμένης αραίωσης, όπως περιγράφηκαν ανωτέρω.

Αναλυτικά η διαδικασία ακολουθεί τα βήματα ως εξής :

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

Εισάγονται τα δεδομένα σε πρόγραμμα σύμφωνα με Albert J. Klee, 1993 of the EPA Risk Reduction Engineering Laboratory.

### 3.3.2. ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στις χημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε διχλωρομεθάνιο (Suprasolv DCM-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) και n-εξάνιο ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany). Τα φυσίγγια της στερεάς φάσης από silica / κυανοπροπύλιο ( $\text{SiO}_2/\text{C}_3\text{-CN}$ , 1.0/0.5 g, 6 ml) της εταιρίας Interchim και τα φυσίγγια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση στερεάς φάσης “Varian Bond Elut TPH” ανήκουν στην Agilent technologies. Το πρότυπο δείγμα υδρογονανθράκων (100 ppm σε εξάνιο/ DCM, 9:1) για την καμπύλη βαθμονόμησης που περιείχε αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (n-C10- n-C35, pristine, phytane) και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) της εταιρίας Absolute Standards Inc. Το εσωτερικό πρότυπο μέσης πτητικότητας περιείχε 7 δευτεριωμένα συστατικά:  $\text{d}_8$ -naphthalene,  $\text{d}_{12}$ -chrysene,  $\text{d}_{12}$ -

perylene, d<sub>10</sub>-acenaphthene, d<sub>10</sub>-phenanthrene και d<sub>4</sub>-1,4-dichlorobenzene (2000 ppm σε DCM) και ανήκει στην εταιρία SupelcoCo. Τα πρότυπα surrogate (d<sub>10</sub>-anthracene και 5α-androstane με 2000 ppm σε DCM το καθένα) προμηθεύτηκαν επίσης από την SupelcoCo. Τέλος, ο βιοδείκτης C<sub>30</sub>17α-(H), 21β(H)-hopane ανήκει στην εταιρία Chiron, Norway.

Στο πρώτο στάδιο των χημικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκαν οι εκχυλίσσεις υγρού-υγρού. Το περιεχόμενο των σωλήνων (20 ml) εκχυλίστηκε με την προσθήκη 20 ml διχλωρομεθανίου το οποίο είχε εμπλουτιστεί με πρότυπο surrogate (200 ppm d<sub>10</sub>-anthracene και 5α-androstane). Τα περιεχόμενα των φιαλκών (50 ml) εκχυλίστηκαν δύο φορές με την προσθήκη 20 ml διχλωρομεθανίου εμπλουτισμένα με 50 μl προτύπου surrogate (200 ppm d<sub>10</sub>-anthracene και 5α-androstane). Ύστερα από ανάμειξη πολλών λεπτών, η φιάσκα αφέθηκε να ηρεμήσει έτσι ώστε να διαχωριστούν τα στρώματα του διχλωρομεθανίου και το νερού με σαφήνεια. Στην συνέχεια το στρώμα του διχλωρομεθανίου αποστραγγίστηκε διερχόμενο από ένα χωνί το οποίο είχε πληρωθεί με ενεργοποιημένο θεικό νάτριο. Συνεπακόλουθα, το διχλωρομεθάνιο του δείγματος εξατμίστηκε σε περιστροφικό ρότορα.

Στην συνέχεια, το ανακτηθέν πετρέλαιο κλασματοποιείται μέσω στερεάς εκχύλισης όπως περιγράφεται από Alzaga et al., 2004. Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο 5-10 mg ξηρού πετρελαίου διαλυτοποιούνται σε n-εξάνιο, μεταφέρονται σε SPE φυσίγγια και στην συνέχεια εκκλύονται με 4 ml n-εξανίου (F1-αλιφατικά) και 5 ml n-εξανίου-DCM (1:1) (F2-αρωματικά). Πριν την φόρτωση των δειγμάτων, τα φυσίγγια ξεπλένονται με 4 ml εξανίου. Τέλος, γίνεται χρήση αζώτου για την αποξήρανση των δύο κλασμάτων. Το βάρος των F1-αλιφατικών και F2-αρωματικών καταγράφεται πριν αυτά επαναδιαλυθούν σε 1 ml n-εξανίου και 1 ml n-εξανίου-DCM (1:1) αντίστοιχα και οδηγηθούν για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο μάζας GC/MS.

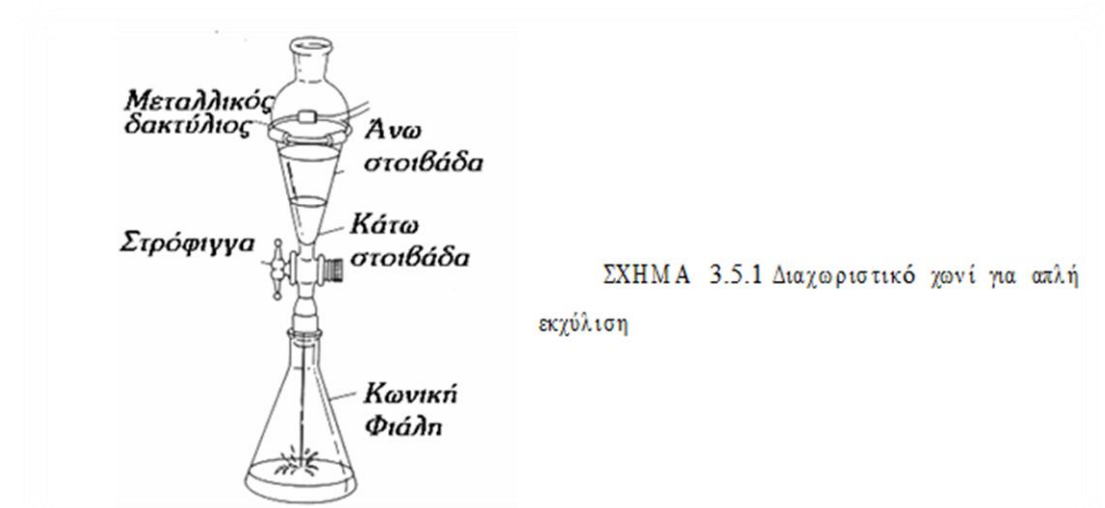
Η αρχική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου που προστίθεται σε κάθε κλάσμα πριν την εισαγωγή τους στον αέριο χρωματογράφο μάζας είναι 1 ppm. Το διάλυμα αυτό περιέχει τέσσερα δευτεριωμένα συστατικά : d<sub>8</sub>-naphthalene, d<sub>10</sub>-phenanthrene, d<sub>12</sub>-chrysene και d<sub>12</sub>-perylene. Η αρχική θερμοκρασία φούρνου έχει ρυθμιστεί στους 60°C ενώ σταδιακά αυξάνεται με ρυθμό 6°C/min μέχρι τους 300°C. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε μέσω ενός split-splitless injector. Εξωτερικές βαθμονομήσεις πολλών

επιπέδων έγιναν και για τα αλκάνια και για τους πολυαρωματικούς υδρογονοάνθρακες (PAH) εύρους από 1 ppb μέχρι 20 ppm. Οι μεγάλοι υδρογονάνθρακες στο Crude Oil ανιχνεύθηκαν βάση των χρόνων συγκράτησης τους και βάση της σύγκρισης των με αυτούς των αναλυτικών προτύπων. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι για να διασφαλιστεί ότι η παρατηρούμενη μείωση της συγκέντρωσης των προς ανάλυση συστατικών οφείλεται στην βιοαποδόμηση και όχι σε άλλα αίτια, είναι απαραίτητο να κανονικοποιήσουμε τις συγκεντρώσεις των προς ανάλυση συστατικών βάση ενός εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο στην παρούσα ανάλυση ήταν το C<sub>30</sub>17α(H), 21β(H)-hopane. Παρακάτω ακολουθεί η θεωρία των πειραματικών διεργασιών που περιγράφηκαν σε αυτήν την ενότητα.

### 3.3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ

Η πιο σημαντική κατηγορία μεθόδων διαχωρισμού είναι αυτές οι οποίες βασίζονται στην εκλεκτική κατανόμη του αναλύτη ή των παρεμποδιστών μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων. Κατά το διφασικό διαχωρισμό αποκαθίσταται ισορροπία με κατανομή της ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων κατά καθορισμένο τρόπο και αναλογία. Η κατάσταση στη θέση ισορροπίας είναι ουσιαστικά απόρροια του νόμου φάσεων του Gibbs με βάση τον οποίο όταν έχουμε δύο φάσεις και ένα συστατικό κατανεμημένο μεταξύ αυτών, τότε ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας είναι 3. Με σταθερές την πίεση και τη θερμοκρασία απομένει ένας βαθμός ελευθερίας και συγκεκριμένα η συγκέντρωση. Έτσι προκύπτει ο νόμος κατανομής του Nerst. Για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός θα πρέπει οι δύο φάσεις να μην αναμιγνύονται και η ουσία X να είναι διαλυτή και να κατανέμεται με την ίδια μορφή και στις δύο φάσεις. Η σταθερά της παραπάνω ισορροπίας ονομάζεται **συντελεστής ή σταθερά κατανομής (KD)** της ουσίας X μεταξύ των φάσεων 1 και 2, και ισούται με το λόγο των συγκεντρώσεων (ενεργοτήτων) της ουσίας στις δύο φάσεις. Η εκχύλιση είναι η διαδικασία όπου μεταφέρεται μια ουσία από μια φάση όπου βρίσκεται είτε υπό μορφή διαλύματος είτε διασποράς, σε μια υγρή φάση. Η εκχύλιση είναι μια χαμηλού κόστους σημαντικότερη μέθοδος διαχωρισμού με εφαρμογή στο διαχωρισμό των αρωματικών ενώσεων από υγρά καύσιμα με βάση την κηροζίνη, για τη βελτίωση της ποιότητας καύσης και στο διαχωρισμό αρωματικών ενώσεων από παραφινικές και ναφθενικές ενώσεις, για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών θερμοκρασίας-ιξώδους

των λιπαντικών ελαίων. Επίσης αποτελεί μέθοδο καθαρισμού κατά την παραγωγή αρωματικών ενώσεων π.χ. τολουόλιου από παράγωγα της πετρελαιοβιομηχανίας. Στην πλέον απλή περίπτωση της εκχύλισης υγρού – υγρού η ουσία κατανέμεται μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων.



Η ανάμειξη δύο υγρών φάσεων με ανάδευση αποτελεί βασική λειτουργία στη διεργασία της εκχύλισης ενώ η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια : της **επαφής**, του **διαχωρισμού** και της **ανάκτησης του διαλύτη**. Αυτά εκτελούνται με συνεχείς ή ασυνεχείς λειτουργίες. Η ασυνεχής λειτουργία που πραγματοποιήθηκε κατά την παρούσα μελέτη ο διαλύτης και το διάλυμα αναμιγνύονται και μετά αφήνονται να διαχωριστούν σε δύο φάσεις: το εκχύλισμα E που περιέχει την επιθυμητή ουσία και το υπόλειμμα R, που είναι πτωχό διάλυμα που περιέχει μικρή ποσότητα διαλύτη. Το χαρακτηριστικό στο οποίο βασίζεται αυτός ο διαφασικός διαχωρισμός είναι οι διαφορές στη διαλυτότητα των ενώσεων (και όχι σε διαφορές στην πτητικότητα, όπως συμβαίνει στην απόσταξη).

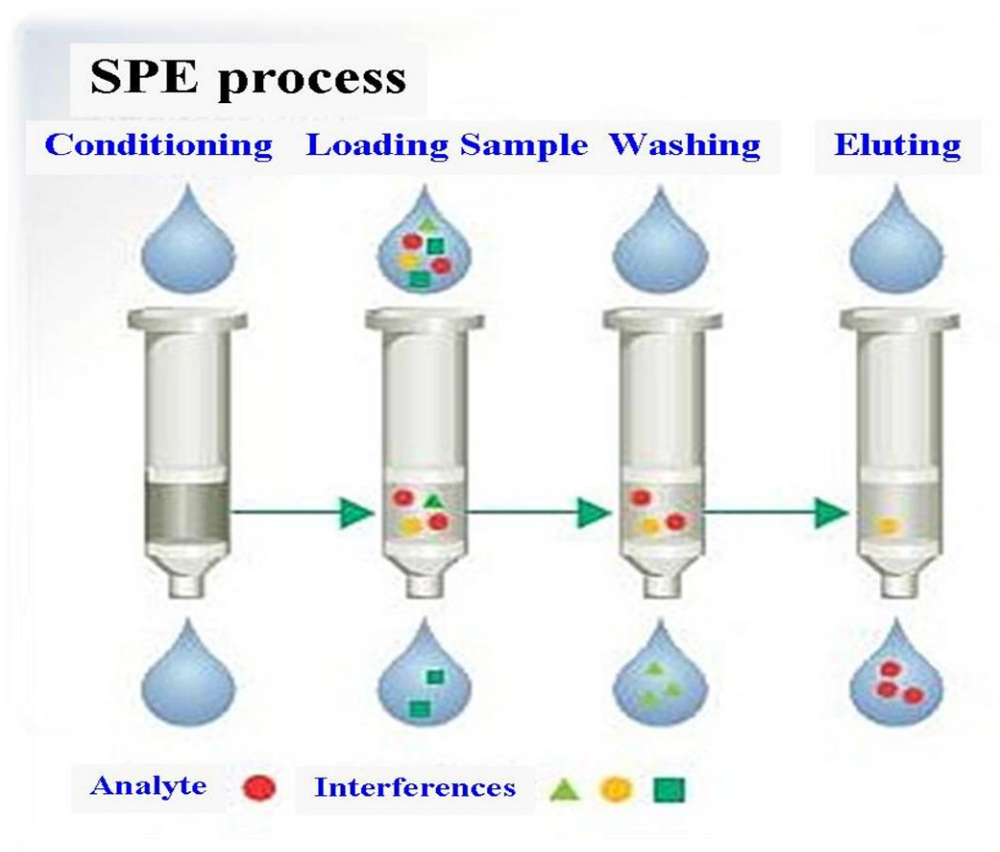
#### 3.3.4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Η **εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE)** αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σύγχρονη τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση (δοκιμή ή ανάλυση) δείγματος. Η SPE αντικαθιστά αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού με υγρό. Κατά την SPE πραγματοποιείται η **προσυγκέντρωση** (pre-concentration) της



προσδιοριζόμενης ουσίας (αναλύτη) από μεγάλους όγκους δειγμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις η ευαισθησία των διάφορων αναλυτικών μεθόδων δεν επαρκεί για μετρήσεις σε πολλά δείγματα στα οποία ο αναλύτης βρίσκεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον η παρουσία διάφορων ενώσεων στο αρχικό δείγμα είναι πολύ πιθανό να παρεμποδίζει την απευθείας μέτρηση (άμεση εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική συσκευή). Στις περιπτώσεις αυτές μεγάλοι όγκοι δειγμάτων (αερίων ή υγρών) υπόκεινται σε διαδικασία SPE έτσι, ώστε η συνολική ποσότητα του αναλύτη να "παγιδευτεί" στον μικρό όγκο της στερεάς φάσης από την οποία μπορεί να παραληφθεί εύκολα με μικρό όγκο διαλύτη, συγχρόνως απαλλαγμένη από άλλα συστατικά που θα παρεμπόδιζαν τη μέτρηση. Με την SPE πραγματοποιείται ο διαχωρισμός μεταξύ μιας υγρής φάσης (ενός δείγματος ή διαλύματος συστατικών) και μιας στερεής (προσροφητική) φάσης. Η τεχνική επιτρέπει τη συγκέντρωση των χρήσιμων συστατικών από το διάλυμα ή το δείγμα, με προσρόφηση τους επί του στερεού προσροφητικού. Σήμερα ένας μεγάλος αριθμός προσροφητικών είναι διαθέσιμα και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι η χημικώς τροποποιημένη gel διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), διάφορα πολυμερή προσροφητικά υλικά και ο πορώδης άνθρακας.

Η γενική διαδικασία είναι να φορτωθεί ένα διάλυμα επί της στερεάς φάσης της SPE, να ξεπλυθούν τα ανεπιθύμητα συστατικά, και στη συνέχεια να ξεπλυθούν τα χρήσιμα συστατικά από την προσροφητική φάση με ένα άλλο διαλύτη σε ένα σωλήνα συλλογής. Η προσροφητική φάση μπορεί να περιέχεται σε διάφορες μορφές, δίσκους SPE, σύριγγες-φυσίγγια SPE (τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος), πλάκα πολλαπλών φυσιγγίων. Η μορφή προσροφητικού για την μέθοδο SPE που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι η σύριγγα-φυσίγγιο SPE. Η επιλογή ενός κατάλληλου προσροφητικού εξαρτάται από την κατανόηση του μηχανισμού(ων) αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσροφητικού και των προς ανάλυση συστατικών. Η κατανόηση με τη σειρά της εξαρτάται από τη γνώση των υδροφοβικών, πολικών και ιοντοανταλλακτικών ιδιοτήτων τόσο της διαλυμένης ουσίας όσο και του προσροφητικού μέσου. Οι πιο κοινοί μηχανισμοί συγκράτησης στην SPE βασίζονται στις δυνάμεις Van der Waals («μη πολικές αλληλεπιδράσεις»), σε δεσμούς υδρογόνου, σε δυνάμεις διπόλου - διπόλου («πολικές αλληλεπιδράσεις») και αλληλεπιδράσεις κατιόντων - ανιόντων.



Εικόνα 3.2 : Βασική λειτουργία της SPE



Εικόνα 3.3 : Διακρίνεται η ανάκτηση των n-αλκανίων.



**Εικόνα 3.4 :** Διακρίνεται η ανάκτηση των αρωματικών υδρογονανθράκων.

### **3.3.5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΩΝ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ GC-MS**

Η χρωματογραφία είναι μια φυσικοχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενός μίγματος στα συστατικά του. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του μίγματος ανάμεσα σε δύο φάσεις. Η μία φάση παραμένει σταθερή στο σύστημα και λέγεται ακίνητη φάση (stationary) ενώ η άλλη λέγεται κινητή φάση (mobile) και διέρχεται μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της ακίνητης φάσης προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση προκαλώντας έτσι το διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος. Η ταξινόμηση των διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών στηρίζεται κυρίως στη φύση της κινητής (υγρή ή αέρια) ή στατικής φάσης (στερεή ή υγρή σε στερεό υπόστρωμα), στο μηχανισμό διαχωρισμού και τη μορφή της στατικής φάσης. Γενικά, η κινητή φάση είναι είτε αέρια, είτε υγρή οπότε προκύπτουν έτσι δύο βασικοί τύποι χρωματογραφίας, η χρωματογραφία αερίων (gas chromatography, GC) όπου η κινητή φάση είναι αέριο και η χρωματογραφία υγρών (liquid chromatography, LC) όπου η κινητή φάση είναι υγρό. Κατά τον ίδιο τρόπο η ακίνητη φάση μπορεί να είναι είτε υγρή, είτε στερεή,

οπότε προκύπτουν τέσσερις υποομάδες χρωματογραφίας: η αέρια- υγρή (gas-liquid chromatography, GLC), η αέρια-στερεή (gas-solid chromatography, GSC), η υγρή-υγρή (liquid-liquid chromatography, LLC) και η υγρή-στερεή (liquid- solid chromatography, LSC).

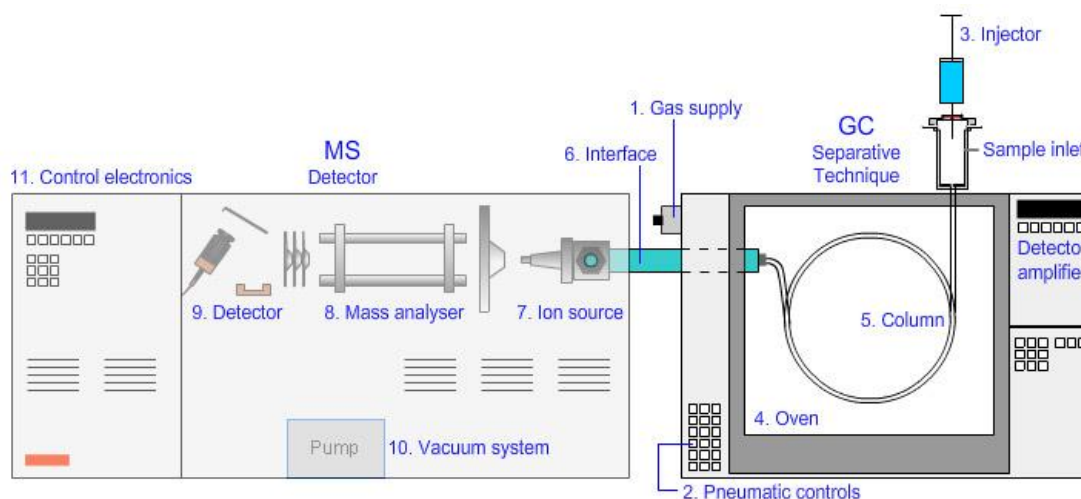
Η χρωματογραφία αερίων (gas chromatography, GC) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό διαφόρων φυσικοχημικών μεγεθών. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι η πτητικότητα και η σταθερότητα της προς ανάλυση ουσίας στη θερμοκρασία της στήλης.

Στην GC η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο ενώ η ακίνητη φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό που καλύπτει το στερεό υπόστρωμα, αν έχουμε στήλες πλήρωσης, ή το εσωτερικό τοίχωμα, αν έχουμε τριχοειδείς στήλες. Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών του μίγματος διαμέσου της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες, εξαρτώμενες από την τάση ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Τα βασικά τμήματα ενός χρωματογράφου αερίων είναι ο **εγχυτήρας (injector)**, η **αναλυτική στήλη**, ο **ανιχνευτής** και ο **καταγραφέας**. Η φασματοσκοπία μάζας (Mass spectroscopy) είναι αναλυτική μέθοδος που στηρίζεται στην παραγωγή ιόντων από τα μόρια των συστατικών όταν αυτά βομβαρδίζονται από μία δέσμη ηλεκτρονίων ικανή να τα διασπάσει. Τα θραύσματα (fragments) που παράγονται-κατιόντα και ελεύθερες ρίζες-επιταχύνονται σε συνθήκες κενού με την βοήθεια ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Κάθε θραύσμα έχει συγκεκριμένη σχέση μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) και επειδή το σύνολο των παραγόμενων θραυσμάτων έχει μοναδιαίο φορτίο, η τιμή  $m/z$  είναι ισοδύναμη του μοριακού βάρους των θραυσμάτων. Ο συνηθέστερος τρόπος ιονισμού είναι αυτός του ιονισμού με ηλεκτρόνια (electron impact). Τα μόρια του δείγματος που εισέρχονται στον χώρο ιονισμού, όπου επικρατεί κενό της τάξης των  $10^{-2}$  έως  $10^{-5}$  Torr. Το ηλεκτρονικό νήμα παράγει θερμαινόμενα ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχύνονται και συγκρούονται με το ρεύμα των μορίων του δείγματος. Η ενέργεια της δέσμης είναι συνήθως 50-70 eV. Τα ιόντα που δημιουργούνται από τις συγκρούσεις επιταχύνονται από τα ηλεκτρικά πεδία που δημιουργούνται μεταξύ των πλακών (focusing lens) και εισέρχονται στον αναλυτή. Άλλοι τρόποι ιονισμού είναι ο χημικός ιονισμός (chemical ionization) και ο ιονισμός πεδίου (Field ionization). Αρχικά, το δείγμα εισάγεται στον

εγχυτήρα με μια σύριγγα ή αυτόματο δειγματολήπτη. Στον εγχυτήρα, ο οποίος θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία, γίνεται η εξάτμιση των προς ανάλυση ουσιών. Μέσω του φέροντος αερίου, οι αναλύτες που εξατμίστηκαν μεταφέρονται στην αναλυτική στήλη η οποία βρίσκεται σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο. Οι αναλύτες ταξιδεύουν δια μέσου της στήλης με έναν ρυθμό που πρωταρχικώς καθορίζεται από τις φυσικές τους ιδιότητες, τη θερμοκρασία και τη σύσταση της στήλης. Ο αναλύτης που κινείται γρηγορότερα από όλους εξέρχεται πρώτος από τη στήλη και οι υπόλοιποι ακολουθούν τη σχετική σειρά. Καθώς οι αναλύτες εκλούνται από τη στήλη εισέρχονται στον ανιχνευτή. Εκεί δημιουργείται ένα ηλεκτρονικό σήμα το οποίο ενισχύεται και κατόπιν καταγράφεται από τον καταγραφέα. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών που μπορούν να συνδυαστούν με την χρωματογραφία αερίων καθιστώντας την έτσι ως μια πολύ ευαίσθητη, γρήγορη και αξιόπιστη αναλυτική τεχνική. Μεταξύ των ανιχνευτών αυτών περιλαμβάνονται ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID), το φασματόμετρο μάζας (mass spectrometer, MS), ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (thermal conductivity detector, TCD), ο ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD), ο ανιχνευτής φωτοϊονισμού (photo ionization detector, PID), ο ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (flame photometric detector, FPD) κ.ά. Ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με την φασματοσκοπία μάζας δημιουργεί ένα ισχυρό αναλυτικό σύστημα, δεδομένου ότι η χρωματογραφία εξασφαλίζει τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος και η φασματοσκοπία ταυτοποιεί κάθε ένα από τα συστατικά αυτά. Η συλλογή των δεδομένων σε μία ανάλυση GC-MS πραγματοποιείται, είτε με την παρακολούθηση ξεχωριστών ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM) είτε σαρώνοντας μια ολόκληρη περιοχή μαζών (Total ion current-chromatogram, TIC).



**Εικόνα 3.5 :** Αέριος φασματογράφος μάζας.



**Εικόνα 3.6 :** Αρχή λειτουργίας GC-MS.

### Διαδικασία Ανάλυσης στο GC-MS

Η ανάλυση GC-MS έγινε με την χρήση της μεθόδου του εσωτερικού προτύπου (internal standard), το οποίο αποτελείται από τέσσερα δευτεριωμένα συστατικά : naphthalene-d8, phenanthrene-d10, crysene-12, perylene-d12 (χωρίς χρήση αλκυλιωμένων παραγώγων). Από το πρότυπο δείγμα δημιουργήθηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις 0.5 ppm έως 20 ppm τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική βαθμονόμηση του οργάνου. Το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Δημιουργείται μια καμπύλη βαθμονόμησης με πέντε σημεία για κάθε συστατικό, πριν την ανάλυση των δειγμάτων, στα 0.5-20 ppm. Η βαθμονόμηση διεξάγεται σε πρότυπο δείγμα συστατικών για να προσδιοριστούν οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης (relative response factor) για κάθε αναλύτη. Τα δεδομένα της καμπύλης βαθμονόμησης με ανάλυση προτύπων δειγμάτων τα οποία περιέχουν και εσωτερικό πρότυπο. Η αναλογία του εμβαδού της κορυφής κάθε συστατικού που αναλύεται , προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου απεικονίζεται στον κατακόρυφο άξονα, ενώ στον οριζόντιο απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του πετρελαίου. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του σχετικού συντελεστή απόκρισης RRF (relative response factor). Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο.

Η GC-MS ανάλυση διεξάγεται ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- 1) Ένα ml C<sub>6</sub> τοποθετείται σε φιαλίδιο των 1.5 ml για το FI.
- 2) Ένα ml από το διάλυμα C<sub>6</sub>:DCM τοποθετείται σε φιαλίδιο των 1.5 ml για το FII.
- 3) Σε αυτό το διάλυμα του 1ml από το κάθε κλάσμα προστίθεται 2.5 ml από το διάλυμα 400 ppm των εσωτερικών προτύπων και το δείγμα είναι έτοιμο για εισαγωγή στο GC. Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων στο δείγμα είναι 1 ppm.
- 4) Ένα τυφλό δείγμα του οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων.
- 5) Αναγνωρίζονται οι αναλύτες βασιζόμενοι στους χρόνους συγκράτησης και στα φάσματα μαζών.
- 6) Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης.
- 7) Ποσοτικοποίηση του κάθε αναλύτη με βάση τους σχετικούς συντελεστές απόκρισης που έχουν υπολογιστεί από την βαθμονόμηση.

**Πινάκας 3.1 :** Ταξινόμηση των αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης.

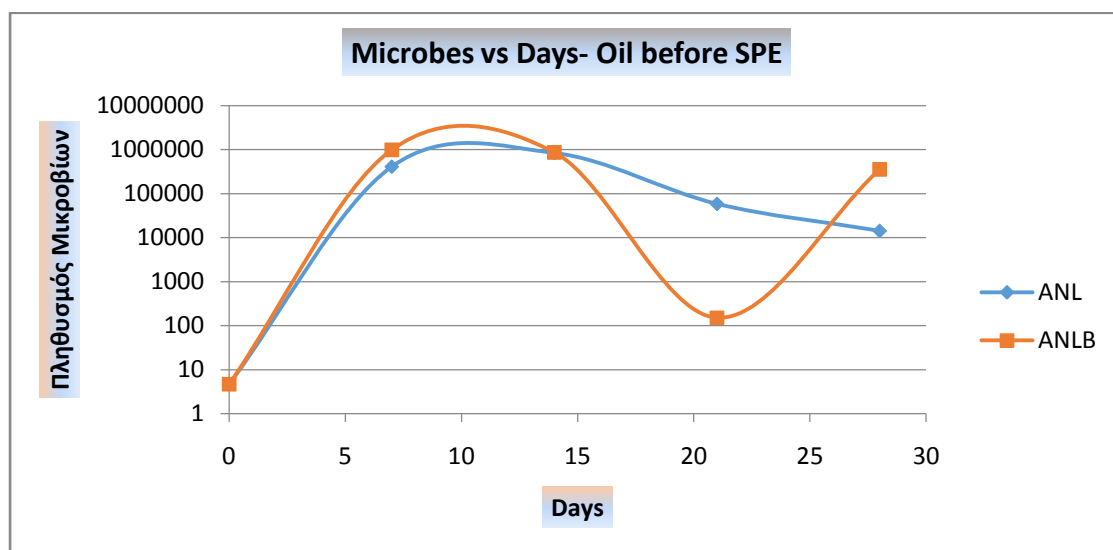
Εσωτερικό πρότυπο	Naphthalene –d8	Phenanthrene- d10	Crysene-d12	Perylene-d12
Αλκάνια	nC10-Nc15	nC16-nC23	nC24-nC29	NC30-NC35
		Pristane		
		Phytane		C3017β(H),21 α (H)
		5a-androstane		hopane
Αρωματικές Ενώσεις	naphthalene	Dibenzothiophene	Fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene
		Fluorene	Pyrene	Benzo(k)fluoranthene
		Anthracene	Chrysene	Benzo(e)pyrene
		Phenanthrene		



### 3.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

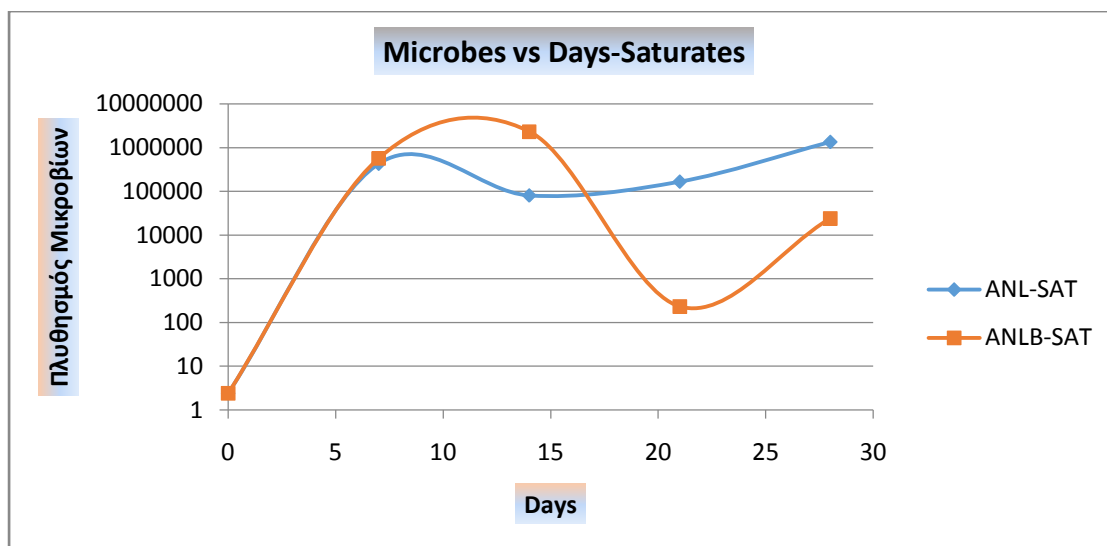
#### 3.4.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού κατά την διάρκεια εξέλιξης του πειράματος στα αρχικά δείγματα και στα αντίστοιχα επεξεργασμένα δείγματα κορεσμένων και αρωματικών.

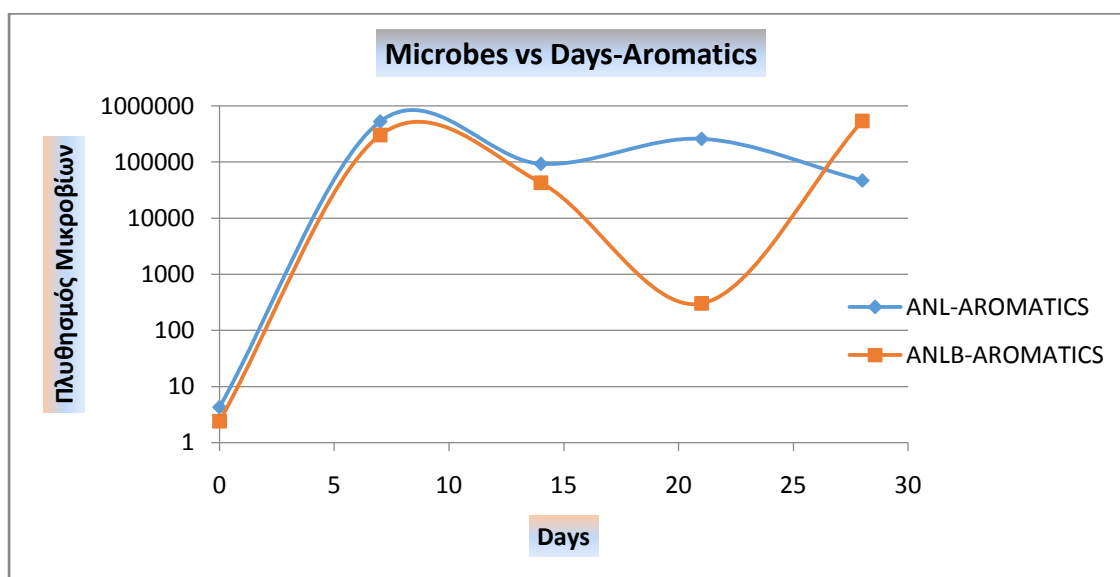


**Διάγραμμα 3.1 :** Μεταβολή του πληθυσμού των μικροβίων στο Crude Oil πριν την SPE, κατά την διάρκεια εξέλιξης του πειράματος.





**Διάγραμμα 3.2 :** Μεταβολή του πληθυσμού των μικροβίων στα κορεσμένα συστατικά κατά την διάρκεια εξέλιξης του πειράματος.

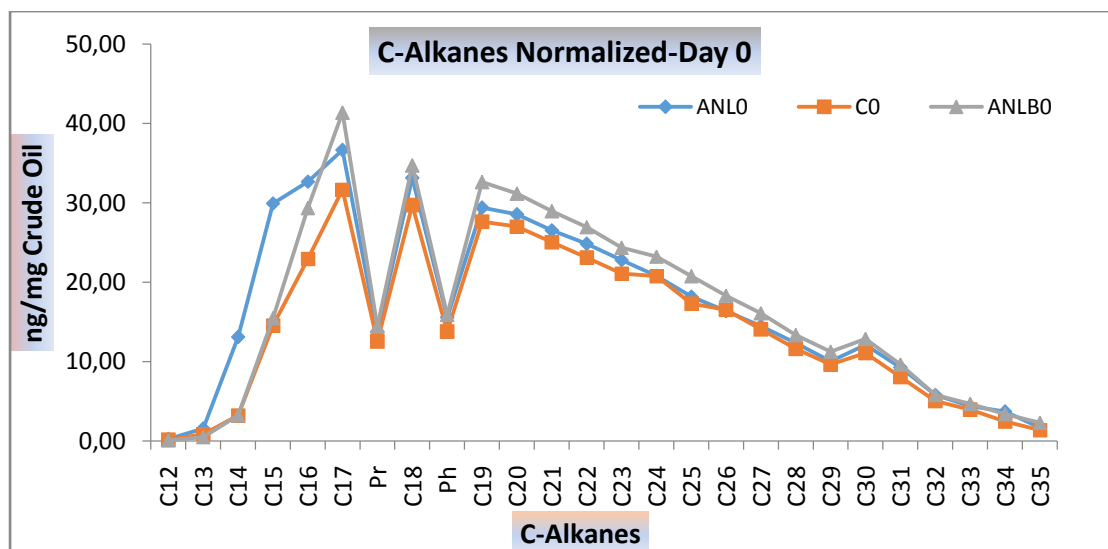


**Διάγραμμα 3.3 :** Μεταβολή του πληθυσμού των μικροβίων στα αρωματικά συστατικά κατά την διάρκεια εξέλιξης του πειράματος.

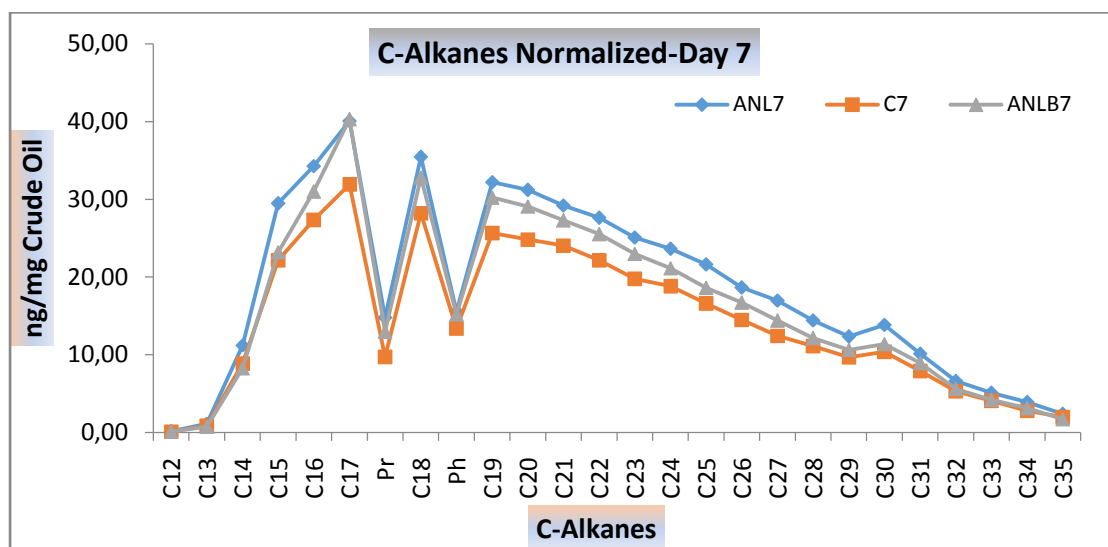
Στα **διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3** παρατηρείται πως ο πληθυσμός των μικροβίων αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό. Πιο συγκεκριμένα, στο **διάγραμμα 3.1** επιβεβαιώνεται η ύπαρξη μικροβίων στα αρχικά δείγματα πριν τον διαχωρισμό σε αρωματικά και κορεσμένα συστατικά. Επιπλέον, παρατηρείται πως η μέγιστη μικροβιακή ανάπτυξη

και για τα δύο δείγματα (ANL, ANLB) λαμβάνει χώρα μεταξύ 7<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> ημέρας ενώ από την 14<sup>η</sup> μέχρι την 21<sup>η</sup> παρατηρείται φάση θανάτου, όντας πολύ εντονότερη στο δείγμα ANLB από το ANL. Από την 21<sup>η</sup> έως την 28<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται ηπιότερη φάση θανάτου για το ANL ενώ μια εκ νέου αύξηση του πληθυσμού των μικροβίων για το ANLB. Στο **διάγραμμα 3.2**, παρατηρείται μέγιστο ανάπτυξης για το ANL ακριβώς την 7<sup>η</sup> ημέρα ενώ από την 7<sup>η</sup> μέχρι την 14<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούνται η στατική και η φάση θανάτου. Αντίστοιχα, για το ANLB το μέγιστο της ανάπτυξης παρατηρείται μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα, μέχρι και την 14<sup>η</sup> τα μικρόβια βρίσκονται στην στατική φάση ενώ από την 14<sup>η</sup> μέχρι την 21<sup>η</sup> ημέρα λαμβάνει χώρα η φάση θανάτου, η οποία είναι εμφανώς εντονότερη από την αντίστοιχη του ANL. Και για τα δύο δείγματα μετά την 21<sup>η</sup> ημέρα υπάρχει μια εκ νέου αύξηση του πληθυσμού που για το ANLB είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη σχετικά με το ANL. Τέλος, στο **διάγραμμα 3.3** παρατηρείται και για τα δύο δείγματα μια ανάλογη εκθετική αύξηση του πληθυσμού των μικροβίων μέχρι την 7<sup>η</sup> ημέρα ακολουθούμενη από μια πολύ σύντομη στατική φάση. Πιο συγκεκριμένα, για το ANL την 14<sup>η</sup> ημέρα έχει ολοκληρωθεί η φάση θανάτου η οποία ακολουθείται από μια φάση προσαρμογής ώστε τελικά τα μικρόβια την 21<sup>η</sup> ημέρα να βρίσκονται σε μια εκ νέου εκθετική φάση. Αντίθετα, τα μικρόβια στο ANLB βρίσκονται στην φάση θανάτου από την 14<sup>η</sup> έως την 21<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 28<sup>η</sup> παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού τους. Παρόλο που και στα δύο δείγματα ο μέγιστος πληθυσμός μικροβίων είναι περίπου ίδιος την 7<sup>η</sup> ημέρα, παρατηρείται για το ANLB απότομη μείωση του πληθυσμού των μικροβίων και εν συνεχεία απότομη αύξηση τους, ενώ για το ANL η πληθυσμιακές μεταβολές των μικροβίων είναι λιγότερο έντονες.

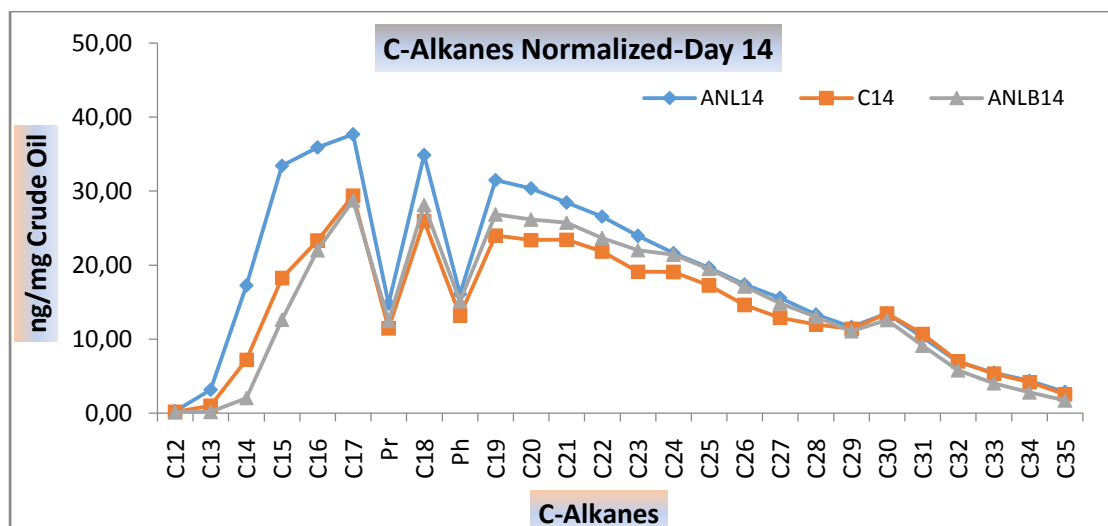
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που περιγράφουν την μεταβολή της συγκέντρωσης των κανονικών αλκανίων για κάθε πειραματική δοκιμή και στη συνέχεια τα αντίστοιχα γραφήματα των αρωματικών συστατικών. Τα δείγματα αναφέρονται ως C\_n, ANL\_n και ANLB\_n όπου C το δείγμα Control και n ο αριθμός των ημερών κατά τις οποίες το πετρέλαιο υπέστη βιοαποδόμηση.



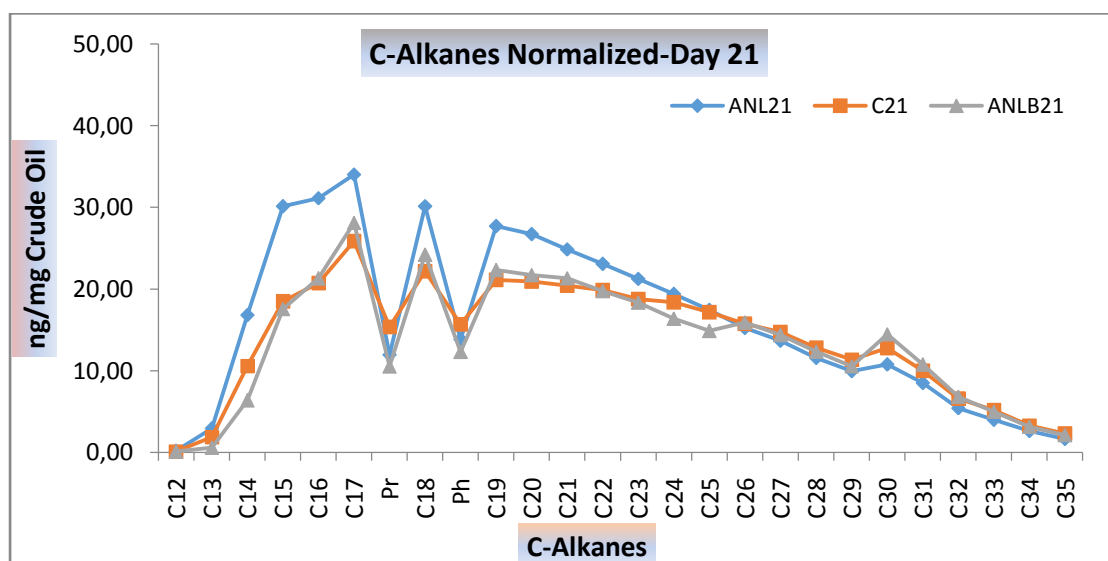
**Διάγραμμα 3.4 :** Κανονικοποιημένη συγκέντρωση αλκανίων για την μηδενική ημέρα.



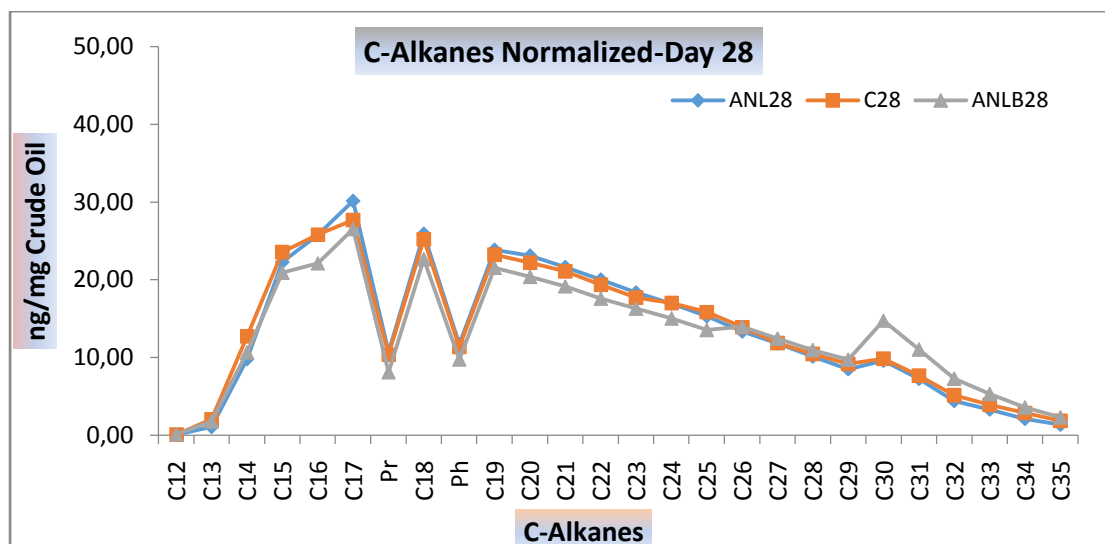
**Διάγραμμα 3.5 :** Κανονικοποιημένη συγκέντρωση αλκανίων για την έβδομη μέρα.



**Διάγραμμα 3.6 :** Κανονικοποιημένη συγκέντρωση αλκανίων για την δέκατη τέταρτη μέρα.

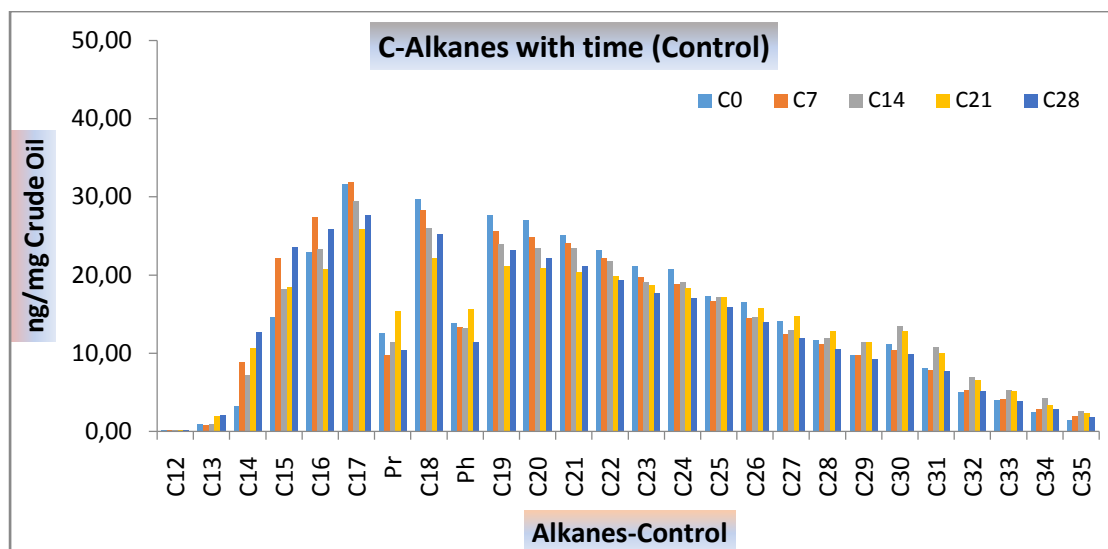


**Διάγραμμα 3.7 :** Κανονικοποιημένη συγκέντρωση αλκανίων για την εικοστή πρώτη μέρα.

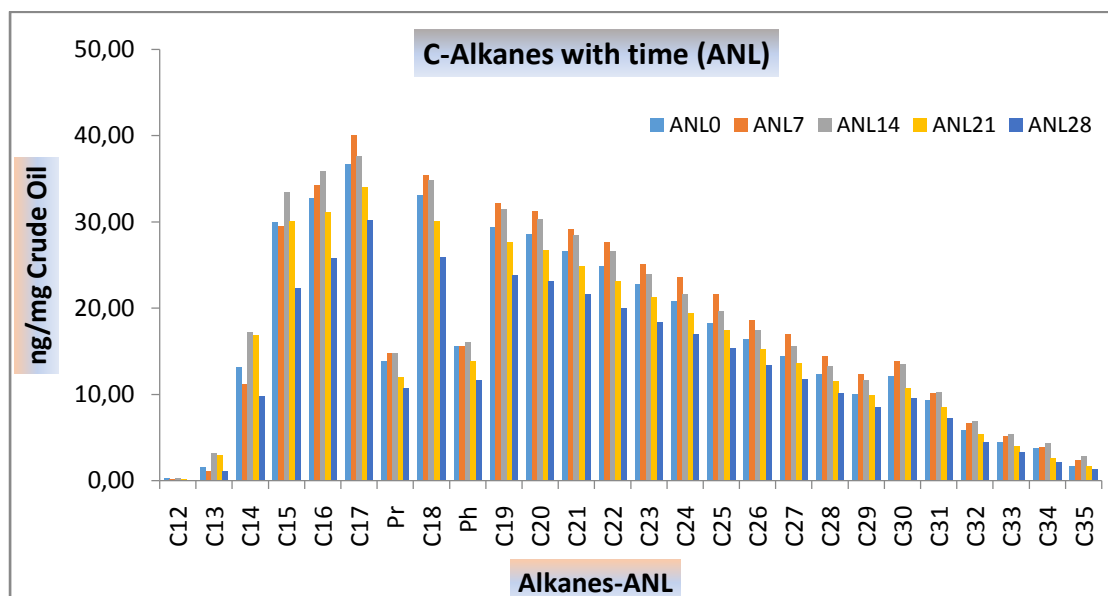


**Διάγραμμα 3.8 :** Κανονικοποιημένη συγκέντρωση αλκανίων για την εικοστή όγδοη μέρα.

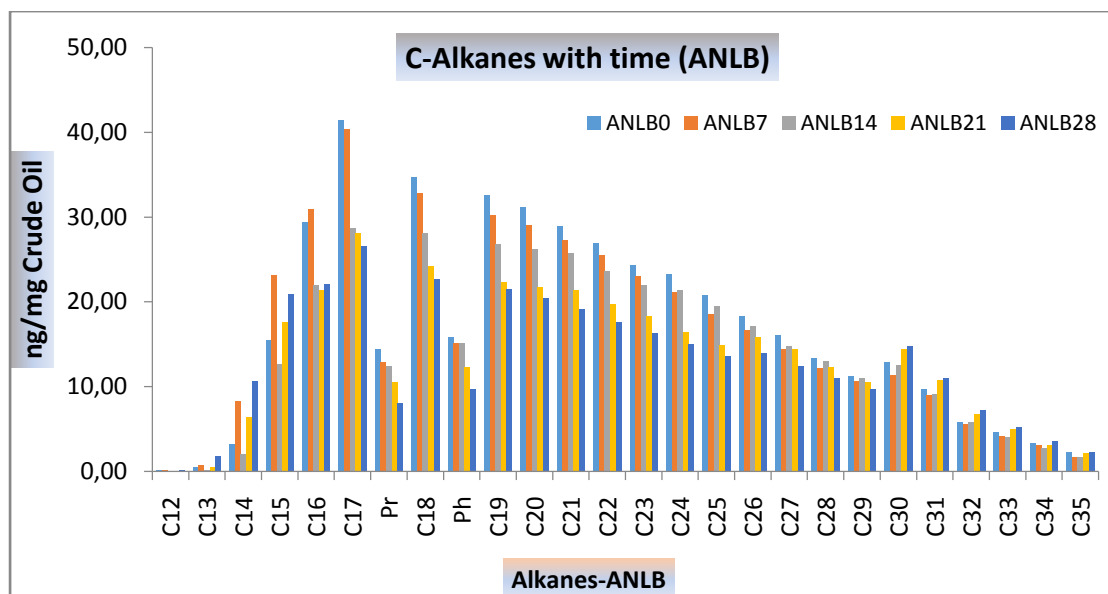
Από τα **διαγράμματα 3.4-3.8** που παρουσιάζουν την σχετική μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των κανονικών αλκανίων παρατηρείται γενικά μια παρόμοια συμπεριφορά και για τα τρία δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, κατά την μηδενική ημέρα το δείγμα το ANLB παρουσιάζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των συστατικών, ακολουθεί το ANL και τελευταίο κατατάσσεται το CONTROL. Κατά την 7<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις των συστατικών του ANLB είναι πλέον χαμηλότερες από αυτές του ANL και προσεγγίζουν τις τιμές του CONTROL το οποίο έχει μεταβληθεί ελάχιστα σε σχέση με την μηδενική ημέρα. Κατά την 14<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών του ANLB, όντας εντονότερη στα ελαφριά συστατικά (C14-C20) και πολύ κοντά πλέον στις τιμές του CONTROL, με τα αντίστοιχα συστατικά του ANL να παραμένουν σχετικά ανεπηρέαστα. Στα βαρύτερα συστατικά (C25+), δραστική μείωση παρουσιάζει το ANL με τις τιμές των τριών δειγμάτων να τείνουν να ταυτιστούν. Κατά την 21<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται ανάλογη μείωση και στα τρία δείγματα, με αυτήν του ANL να είναι εντονότερη. Το ANLB και το CONTROL τείνουν να ταυτιστούν. Τέλος στην 28<sup>η</sup> ημέρα, οι συγκεντρώσεις των συστατικών του ANLB είναι οι χαμηλότερες και από τα τρία δείγματα με εξαίρεση τα βάρια συστατικά (C30-C35). Οι τιμές των συγκεντρώσεων για το ANL και το CONTROL σχεδόν συμπίπτουν.



**Διάγραμμα 3.9 :** Μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αλκανίων για το Control σε σχέση με τον χρόνο.

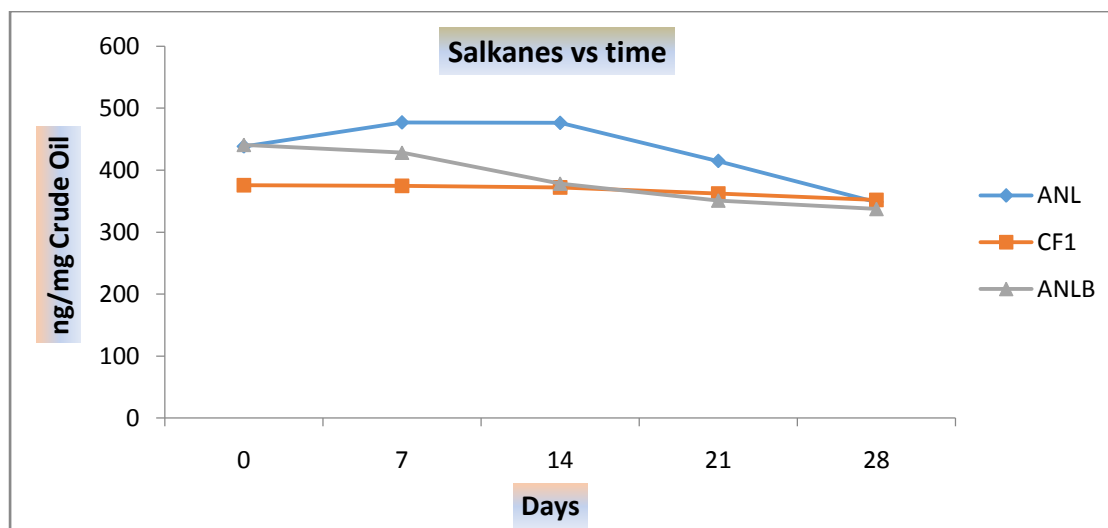


**Διάγραμμα 3.10 :** Μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αλκανίων για το δείγμα ANL σε σχέση με τον χρόνο.

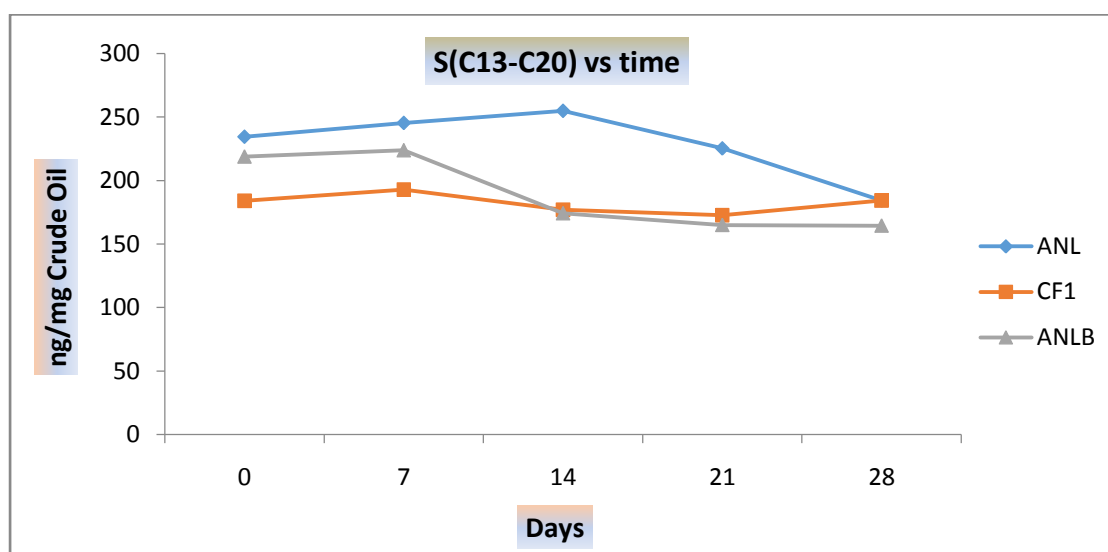


**Διάγραμμα 3.11 :** Μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αλκανίων για το δείγμα ANLB σε σχέση με τον χρόνο.

Τα **διαγράμματα 3.9-3.11** αποτυπώνουν την μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αλκανίων των τριών δειγμάτων καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στο **διάγραμμα 3.9** του δείγματος CONTROL παρατηρείται μια ομοιόμορφη μεταβολή της συγκέντρωσης των συστατικών με τον χρόνο για τα συστατικά C17-C30 ενώ στα ελαφρύτερα συστατικά (C14-C16) και στα βαρύτερα (C30-C35) παρατηρούνται αυξομειώσεις των μεταβολών της συγκέντρωσης. Στο **διάγραμμα 3.10** του δείγματος ANL παρατηρείται ομοιόμορφη μεταβολή της συγκέντρωσης σε όλο το φάσμα των συστατικών (C14-C35). Τέλος για το **διάγραμμα 3.11** του δείγματος ANLB παρατηρείται ομοιόμορφη μεταβολή των συγκεντρώσεων στα συστατικά από C16-C29 ενώ αυξομειώσεις παρατηρούνται στα υπόλοιπα-ελαφρύτερα και βαρύτερα.

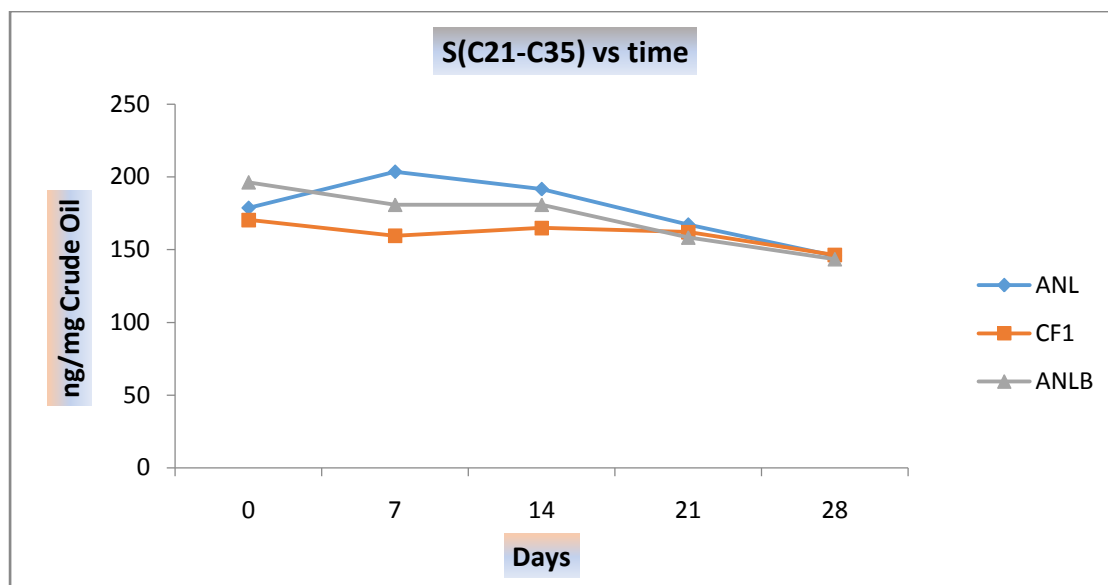


**Διάγραμμα 3.12 :** Σχετική μεταβολή του αθροίσματος των κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων των αλκανίων για τα τρία δείγματα σε σχέση με τον χρόνο.

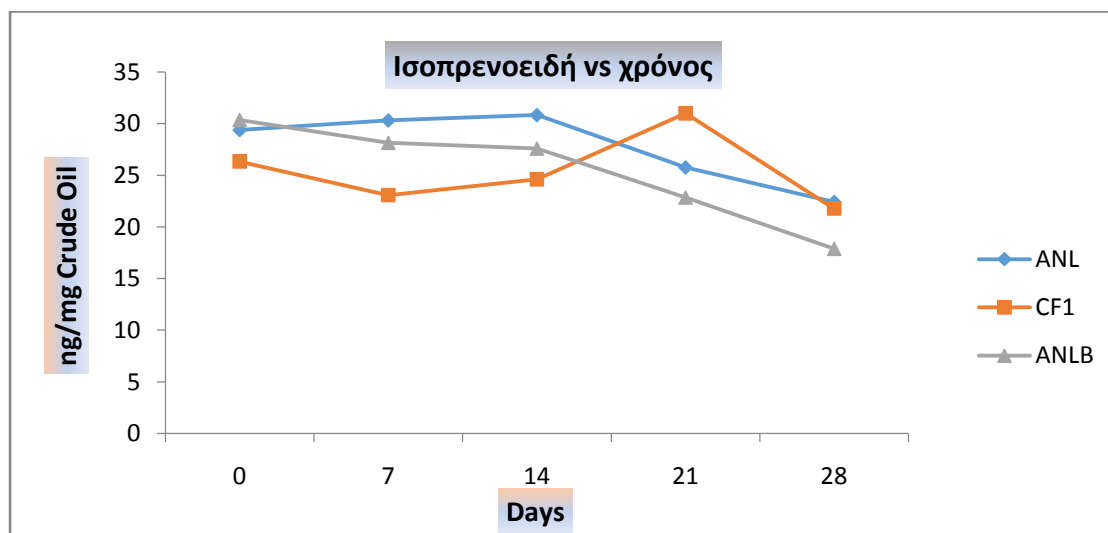


**Διάγραμμα 3.13 :** Σχετική μεταβολή του αθροίσματος των κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων των αλκανίων C13-C20 για τα τρία δείγματα σε σχέση με τον χρόνο.





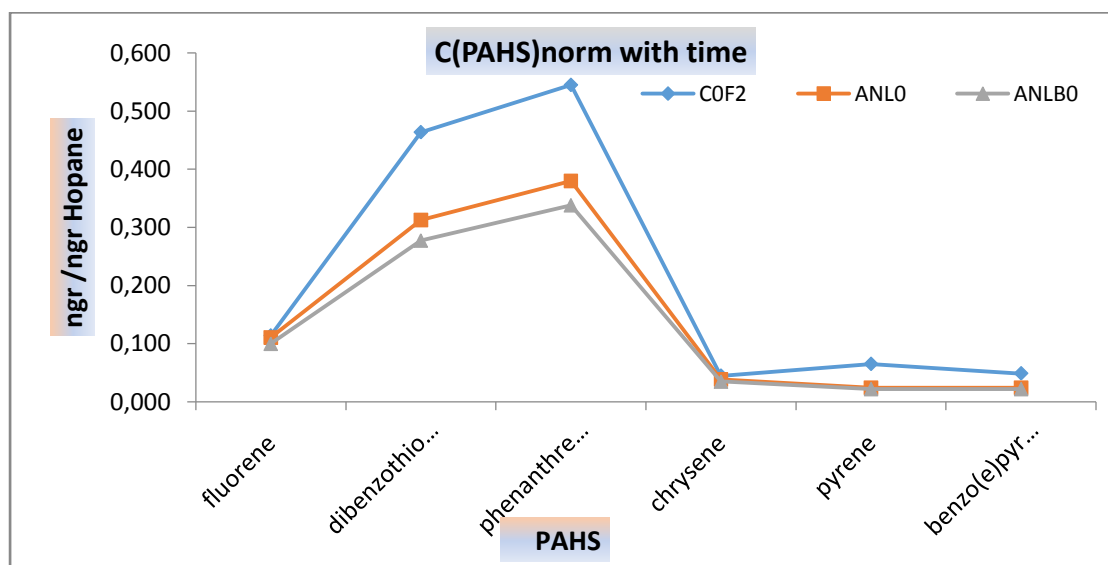
**Διάγραμμα 3.14 :** Σχετική μεταβολή του αθροίσματος των κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων των αλκανίων C21-C35 για τα τρία δείγματα σε σχέση με τον χρόνο.



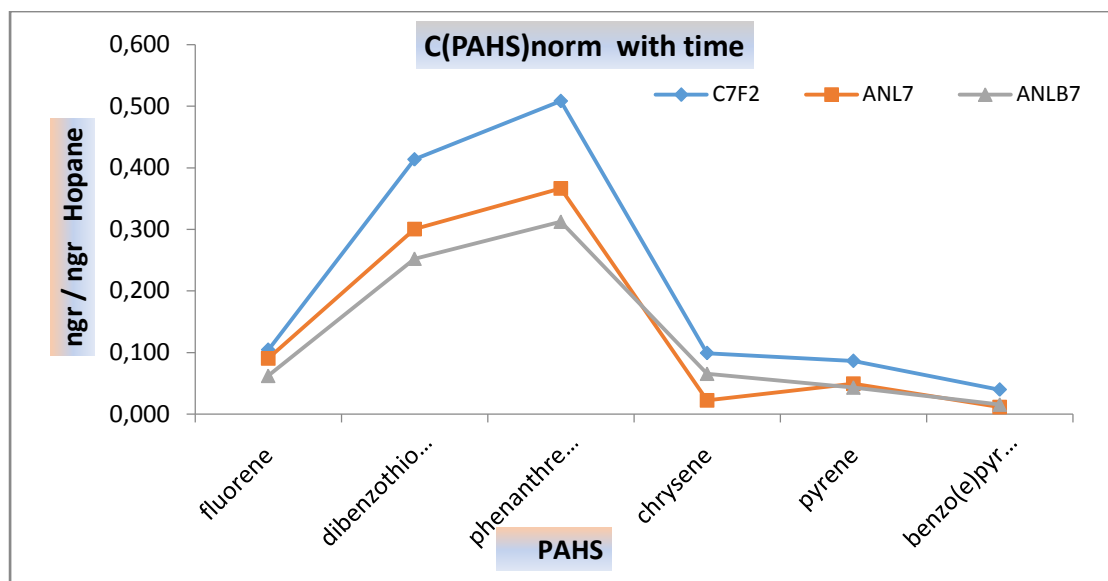
**Διάγραμμα 3.15 :** Σχετική μεταβολή του αθροίσματος των κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων των ισοπρενοειδών για τα τρία δείγματα σε σχέση με τον χρόνο.

Στα **διαγράμματα 3.12-3.15** παρουσιάζεται η μεταβολή του συνόλου της συγκέντρωσης των αλκανίων αρχικά (διάγραμμα 3.12) και στην συνέχεια η μεταβολή των επιμέρους συστατικών (C13-C20, C21-C35, ισοπρενοειδή). Στο **διάγραμμα 3.12** οι συγκεντρώσεις των συστατικών του CONTROL παρουσιάζουν ελάχιστη

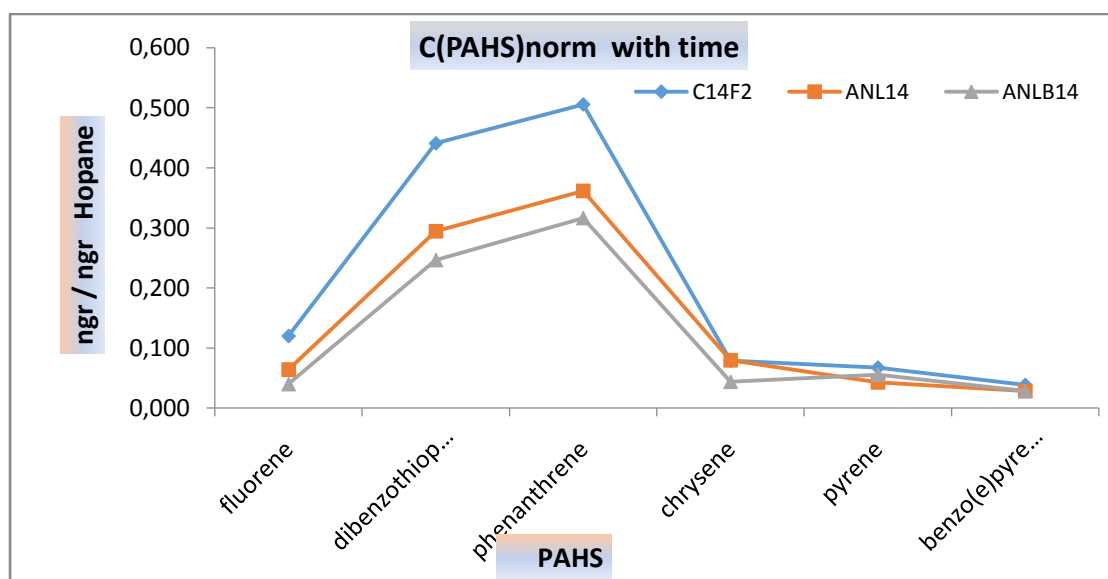
μεταβολή. Οι αντίστοιχες στο ANL δείγμα μεταβάλλονται μετά την 14<sup>η</sup> ημέρα ενώ για το ANLB, η μεταβολή παρατηρείται εξ'αρχής. Στο **διάγραμμα 3.13**, για το άθροισμα των συστατικών από C13-C20, ομοίως δεν παρατηρείται μεταβολή για το CONTROL, για το ANL η μεταβολή πραγματοποιείται μετά την 14<sup>η</sup> ημέρα, ενώ τέλος στο ANLB η μεταβολή παρατηρείται μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα όντας πιο έντονη σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα. Η μεταβολή της συγκέντρωσης των συστατικών του CONTROL στο **διάγραμμα 3.14** (C21-C35) είναι ελάχιστη ενώ για το ANL η μεταβολή ουσιαστικά αρχίζει από την 7<sup>η</sup> ημέρα και για το ANLB η μεταβολή παρατηρείται εξ'αρχής και πιο έντονη. Τέλος, στο **διάγραμμα 3.15** παρατηρείται η μεταβολή της συγκέντρωσης των συστατικών των ισοπρενοειδών. Είναι εμφανές ότι τα βιομόρια αυτά αποδομούνται και στο ANL και στο ANLB, με την μεταβολή στο ANLB να παρατηρείται εξ'αρχής και στο ANL να ξεκινά από την 14<sup>η</sup> ημέρα και μετά. Στο CONTROL η μεταβολή που παρατηρείται είναι πιο αργή.



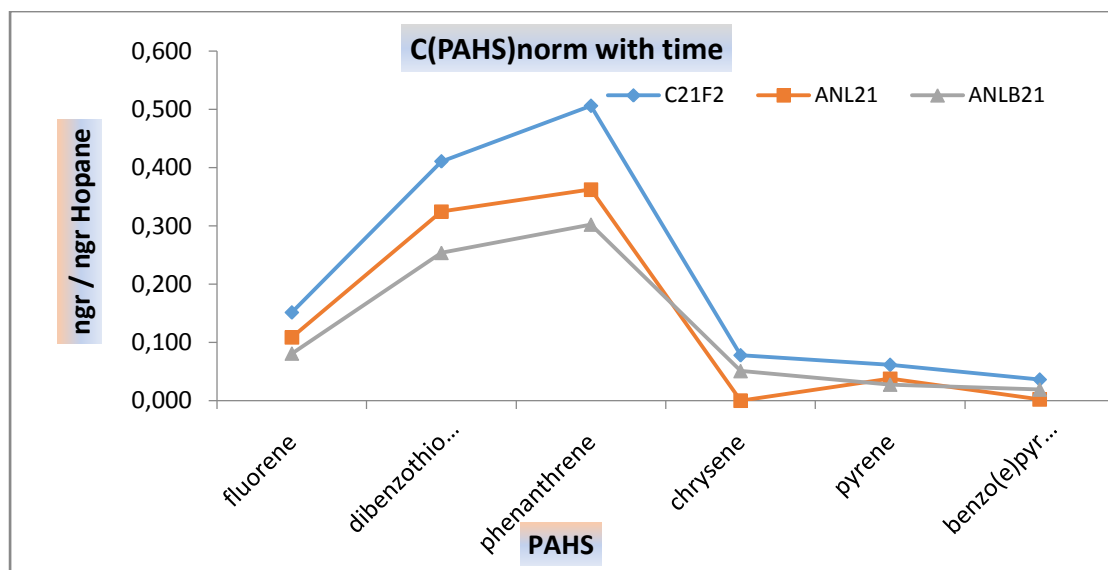
**Διάγραμμα 3.16 :** Σχετική απεικόνιση της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για την μηδενική ημέρα.



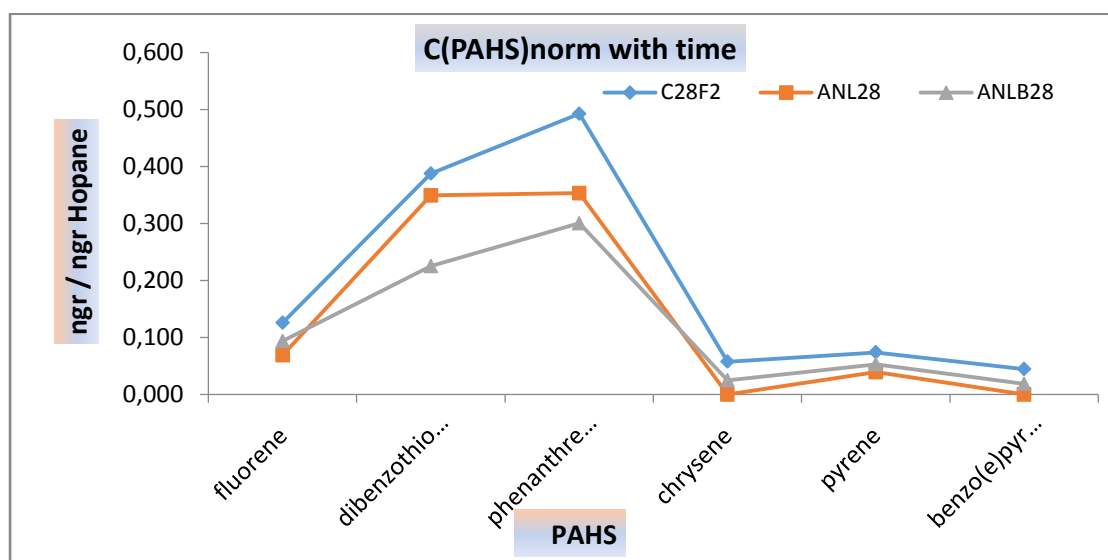
**Διάγραμμα 3.17:** Σχετική απεικόνιση της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για την έβδομη ημέρα.



**Διάγραμμα 3.18:** Σχετική απεικόνιση της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για την δέκατη τέταρτη ημέρα.



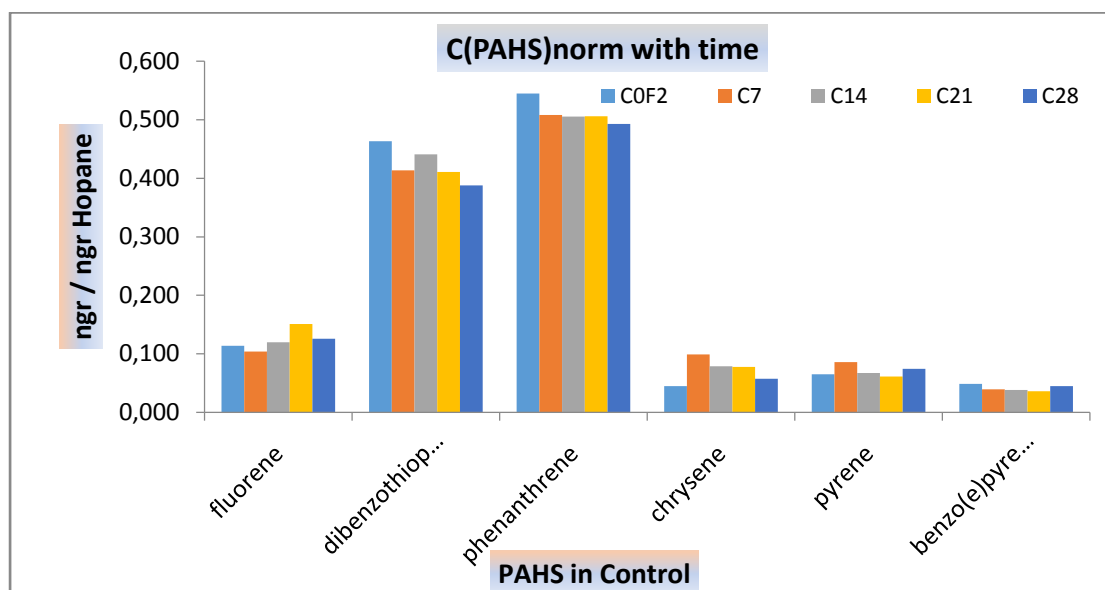
**Διάγραμμα 3.19:** Σχετική απεικόνιση της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για την εικοστή πρώτη ημέρα.



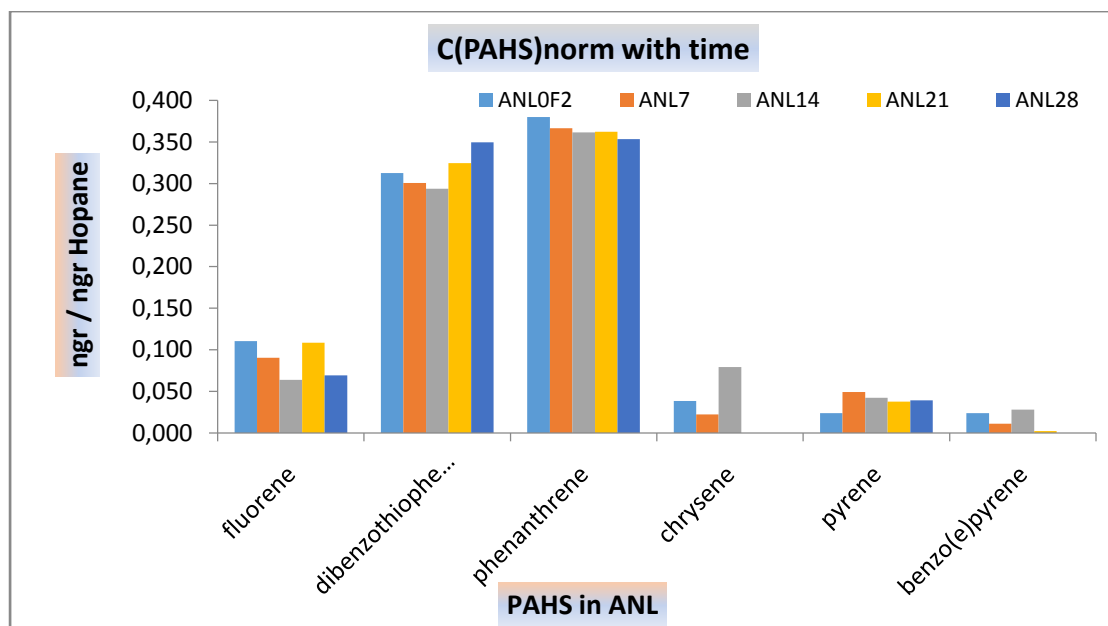
**Διάγραμμα 3.20:** Σχετική απεικόνιση της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για την εικοστή όγδοη ημέρα.

Τα **διαγράμματα 3.16-3.20** απεικονίζουν την μεταβολή της κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για τα τρία δείγματα για όλες τις μέρες που διήρκησε το πείραμα και παρατηρείται ομοιόμορφη κατανομή στην συγκέντρωση των συστατικών και στα τρία δείγματα. Εξ'αρχής παρατηρείται

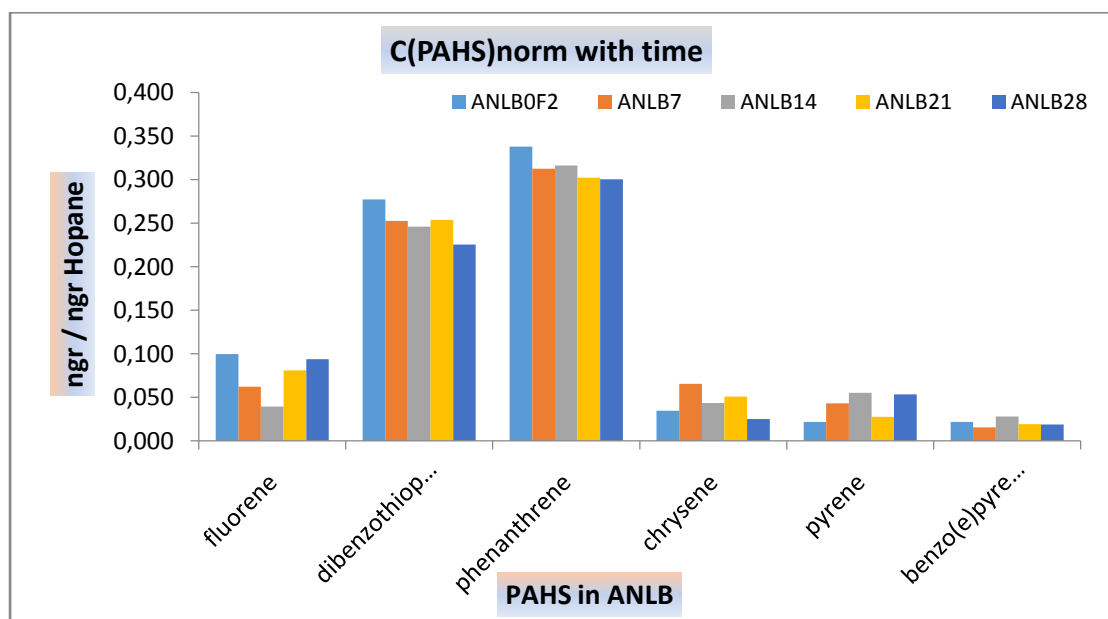
μεταβολή στο ANL δείγμα με ταυτόχρονη μείωση του ANLB. Το CONTROL δεν παρουσιάζει ουσιαστική μεταβολή μέχρι και την 14<sup>η</sup> ημέρα. Γενικά, η μεταβολή των συγκεντρώσεων των αρωματικών συστατικών είναι πολύ αργή για όλες τις μέρες. Ειδικότερα, στο **διάγραμμα 3.21** του δείγματος CONTROL παρατηρείται μια μικρή μεταβολή στο dibenzothiophene και στο phenanthrene με τα υπόλοιπα συστατικά να παραμένουν σχετικά ανεπηρέαστα. Στο **διάγραμμα 3.22** του δείγματος ANL, παρατηρείται μηδενισμός του chrysene και του benzo(e)pyrene ήδη από την 21<sup>η</sup> ημέρα και μικρή μεταβολή των υπολοίπων συστατικών. Τέλος, στο **διάγραμμα 3.23** του ANLB δείγματος παρατηρείται ομοιόμορφη μεταβολή στο fluorene, στο dibenzothiophene, στο phenanthrene και στο chrysene με το pyrene και το benzo(e)pyrene να μην μεταβάλλονται.



**Διάγραμμα 3.21 :** Μεταβολή της συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για το δείγμα Control σε σχέση με τον χρόνο.



**Διάγραμμα 3.22 :** Μεταβολή της συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για το δείγμα ANL σε σχέση με τον χρόνο.



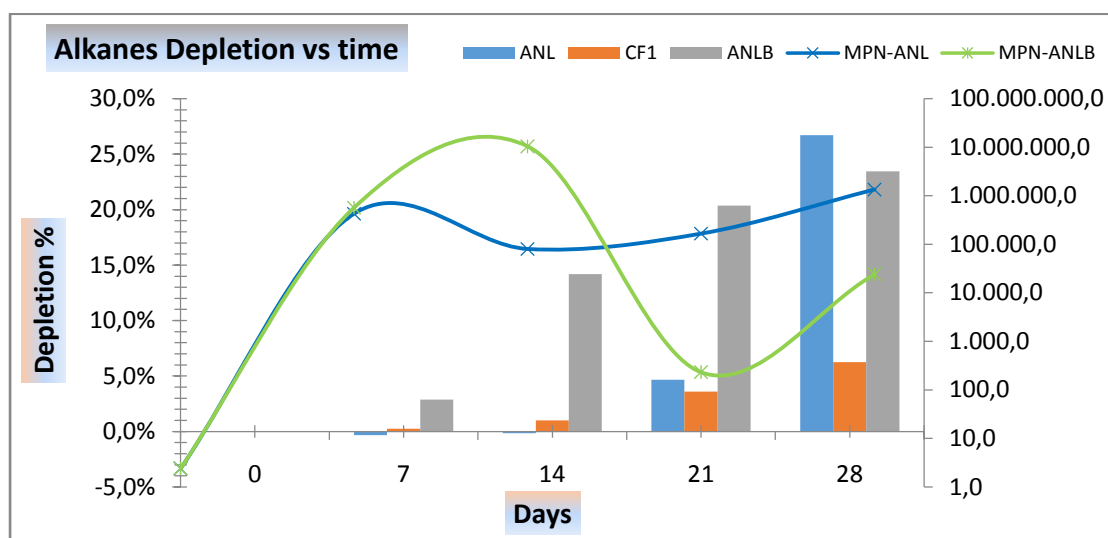
**Διάγραμμα 3.23 :** Μεταβολή της συγκέντρωσης των αρωματικών συστατικών για το δείγμα ANLB σε σχέση με τον χρόνο.

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

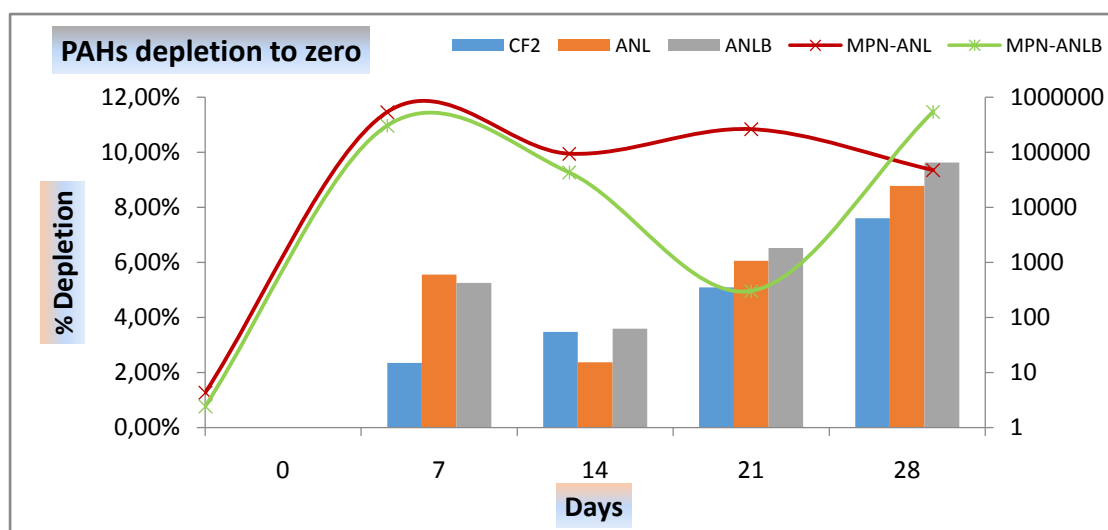
Ο ισχυρισμός ότι η προσθήκη θρεπτικών συστατικών ενισχύει την διεργασία της βιοαποδόμησης αποδεικνύεται από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τα οποία συνοψίζονται στα **διαγράμματα 3.24 και 3.25**. Πιο συγκεκριμένα, από το **διάγραμμα 3.24**, πού περιγράφει την εξέλιξη της βιοαποδόμησης των αλκανίων και την μεταβολή του πληθυσμού των μικροβίων καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος, συμπεραίνεται πως η μέγιστη βιοαποδόμηση αλκανίων επιτυγχάνεται στο δείγμα ANL (~26%) με τον αντίστοιχο πληθυσμό των μικροβίων να παρουσιάζει μια μικρή αναστολή της ανάπτυξης του μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα που διαρκεί μέχρι την 14<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια να αυξάνεται με έναν χαμηλό ρυθμό μέχρι το πέρας του πειράματος. Το δείγμα ANLB παρουσίασε μέγιστη βιοαποδόμηση αλκανίων περίπου 22% με την αντίστοιχη μέγιστη ανάπτυξη των μικροβίων του δείγματος να είναι σχεδόν δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του ANL. Θα περίμενε κανείς, δεδομένου του μεγάλου πληθυσμού των μικροβίων στο ANLB, τα ποσοστά βιοαποδόμησης για αυτό το δείγμα να συνεχίσουν να αυξάνονται μέχρι το τέλος του πειράματος. Ο παραπάνω ισχυρισμός επαληθεύεται μέχρι την 14<sup>η</sup> ημέρα όπου ο ρυθμός βιοαποδόμησης του ANLB είναι αισθητά καλύτερος από αυτόν του ANL. Ωστόσο, από την 14<sup>η</sup> ημέρα και μετά παρατηρείται μια σημαντική πληθυσμιακή μείωση των μικροβίων του ANLB που οδηγεί σε δραστική μείωση του ρυθμού βιοαποδόμησης. Η αντίστοιχη μείωση του πληθυσμού των μικροβίων στο ANL είναι μικρότερη οδηγώντας τελικά, στην 28<sup>η</sup> ημέρα, σε μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποδόμησης. Η μείωση του πληθυσμού των μικροβίων και στις δύο περιπτώσεις ενδεχομένως να οφείλεται σε εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, φαινόμενο που εμφανίζεται εντονότερα στο ANLB λόγω του μεγαλύτερου μικροβιακού φορτίου.

Όσον αφορά το **διάγραμμα 3.25** και τα αρωματικά συστατικά, η βιοαποδόμηση του δείγματος ANLB (~9%) είναι μεγαλύτερη από αυτήν του ANL (~7%) αλλά και στις δύο περιπτώσεις η βιοαποδόμηση των αρωματικών συστατικών είναι μικρότερη από αυτήν των αλκανίων, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο. Μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται και εδώ μείωση των μικροβίων η οποία είναι σημαντική για το ANLB και φτάνει το κατώτερο της όριο την 21<sup>η</sup> ημέρα, με τον πληθυσμό τους να αυξάνει και πάλι από την 21<sup>η</sup> μέχρι την 28<sup>η</sup> ημέρα. Το φαινόμενο αυτό αντικατοπτρίζεται και στην βιοαποδόμηση όπου αυξάνεται κανονικά μέχρι την 7<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στην

συνέχεια για την 14<sup>η</sup> ημέρα παρουσιάζεται μειωμένη και τελικά αυξάνεται την 21<sup>η</sup> και 28<sup>η</sup> ημέρα, παράλληλα με την αύξηση των μικροβίων. Μια αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζει και η βιοαποδόμηση στο ANL όπου την 14<sup>η</sup> ημέρα παρουσιάζει μείωση συνεπακόλουθη της μικρής μείωσης του πληθυσμού των μικροβίων. Πιθανότατα η μείωση του μικροβιακού πληθυσμού και εδώ να οφείλεται στην μείωση των θρεπτικών.



**Διάγραμμα 3.24 :** Μεταβολή της βιοαποδόμησης των αλκανίων με τον χρόνο και του πληθυσμού των μικροβίων με τον χρόνο αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 3.25 :** Μεταβολή της βιοαποδόμησης των αρωματικών συστατικών με τον χρόνο και του πληθυσμού των μικροβίων αντίστοιχα.



Συνοψίζοντας, είναι προφανές ότι η προσθήκη θρεπτικών συστατικών ενισχύει σημαντικά την βιοαποδόμηση του πετρελαίου όπως παρατηρείται και από την σύγκριση του CONTROL με τα δείγματα ANL και ANLB. Ο συνδυασμός Avant Natur και Lecithin (δείγμα ANL) οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποδόμησης στα κανονικά αλκάνια ενώ ο συνδυασμός Avant Natur, Lecithin και Oil Begone (δείγμα ANLB) οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποδόμησης στα αρωματικά συστατικά. Η προσθήκη του επιφανειοδραστικού Oil Begone έγινε έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση του σε συνδυασμό με θρεπτικά συστατικά στην διεργασία της βιοαποδόμησης. Πράγματι, όπως φαίνεται και από τα τελικά διαγράμματα η προσθήκη του Oil Begone βελτιώνει το ρυθμό βιοαποδόμησης (δρα από την 7<sup>η</sup> μέρα) και πιθανόν να οδηγούσε σε καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα, και στην βιοαποδόμηση των αλκανίων αν δεν λάμβανε χώρα η δραστική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, που πιθανόν οφείλεται στη μείωση των θρεπτικών συστατικών ή σε δημιουργία ενδιάμεσου μηχανισμού οργανικού υποστρώματος-επιφανειοδραστικού-μικροοργανισμών. Επομένως, μελλοντικά κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί η ανανέωση των θρεπτικών συστατικών κατά την διάρκεια της εξέλιξης του πειράματος ώστε να διασαφηνιστεί ποίος συνδυασμός θρεπτικών συστατικών θα έδινε καλύτερα αποτελέσματα στην βιοαποδόμηση μιας πετρελαιοκηλίδας.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1 :</b> Πετρελαιοφόρο YONG WIN 3 .....	8
<b>Εικόνα 1.2 :</b> Παραδείγματα οικολογικής καταστροφής από ατύχημα πετρελαιοφόρου- δημιουργία χαρακτηριστικής μεμβράνης στην επιφάνεια του νερού .....	9
<b>Εικόνα 1.3 :</b> Εξάπλωση του πετρελαίου που διέρρευσε από το Exxon Valdez.....	16
<b>Εικόνα 1.4 :</b> Αεροφωτογραφία της πετρελαιοκηλίδας του Exxon Valdez .....	16
<b>Εικόνα 1.5 :</b> Εφαρμογή της μεθόδου Booming and Skimming στον κόλπο του Μεξικού .....	18
<b>Εικόνα 1.6 :</b> Πλύσιμο των ακτογραμμών της παραλίας Quayle, νήσος Smith, Αλάσκα .....	19
<b>Εικόνα 1.7 :</b> Εφαρμογή της μεθόδου ελεγχόμενης καύσης στην επιφάνεια της θάλασσας στην πλατφόρμα Deepwater Horizon .....	20
<b>Εικόνα 1.8 :</b> Μηχανισμός βιοδιάσπασης πετρελαίου από μικρόβια με την προσθήκη ελαιόφιλων λιπασμάτων .....	22
<b>Εικόνα 2.1 :</b> Οι διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον .....	29
<b>Εικόνα 2.2 :</b> Κύματα και αναταραχή στην επιφάνεια της θάλασσας προκαλεί διάσπαση του πετρελαίου σε σταγονίδια διαφόρων μεγεθών .....	31
<b>Εικόνα 2.3 :</b> Διεργασίες γήρανσης της πετρελαιοκηλίδας με τον χρόνο .....	34
<b>Εικόνα 2.4 :</b> Γραφική απεικόνιση επιφανειοδραστικών ουσιών.....	53
<b>Εικόνα 2.5 :</b> Μηχανισμός δράσης επιφανειοδραστικών ενώσεων.....	55
<b>Εικόνα 3.1 :</b> Φωσφατιδυλοχολίνη, ένας τύπος φωσφολιπιδίου στην λεκιθίνη <b>Σφάλμα!</b> <b>Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
<b>Εικόνα 3.2 :</b> Βασική λειτουργία της SPE .....	74
<b>Εικόνα 3.3 :</b> Διακρίνεται η ανάκτηση των n-αλκανίων .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
<b>Εικόνα 3.4 :</b> Διακρίνεται η ανάκτηση των αρωματικών υδρογονανθράκων.....	75
<b>Εικόνα 3.5 :</b> Αέριος φασματογράφος μάζας. ....	77
<b>Εικόνα 3.6 :</b> Αρχή λειτουργίας GC-MS.....	78

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] The International Tanker Owners Pollution Federation Ltd. Oil tanker statistics : 2013, Last reviewed : <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>
- [2] Exxon Valdez Oil Trustee Council
- [3] Ν. Καλογεράκης, Χανιά 2010, «Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος»
- [4] Ν. Πασαδάκης, Χανιά 2002, «Οργανική Γεωχημεία Ιζηματογενών Πετρωμάτων»
- [5] Μ. Nikolopoulou, Ν. Kalogerakis «Biostimulation Strategies for Enhanced Bioremediation of Marine Oil Spills Including Chronic Pollution»
- [6] Μαρία Νικολοπούλου, Χανιά 2005, «Ενισχυμένη βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με την χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων»
- [7] The International Tanker Owners Pollution Federation Ltd. Weathering. <http://www.itopf.com/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/weathering/>
- [8] Ευθύμιος Νταράκας, Θεσσαλονίκη 2014, «Διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων». <http://users.auth.gr/darakas/Wastewater.pdf>
- [9] [http://www.chem.auth.gr/content/organic\\_lab/CHEM/EXTRACT.pdf](http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf)
- [10] Αναλυτική και ενόργανη χημική ανάλυση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [11] Deep Horizon.
- [12] <https://en.wikipedia.org/wiki/Biostimulation>
- [13] Guide to Solid Phase Extraction, Bulletin 910
- [14] Trine S. Jensen, Eric Arvin, Denmark 2000 «Quantification of Compositional Changes of Petroleum Hydrocarbons by GC/FID and GC/MS during a Long-Term Bioremediation Experiment
- [15] The Biggest Oil Spills in History