

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση βιο-τασιενεργών ουσιών στην αποδόμηση
πετρελαϊκών υδρογονανθράκων»**

ΜΠΟΡΜΠΟΥΔΑΚΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Νικόλαος Καλογεράκης (επιβλέπων καθηγητής)
Δανάη Βενιέρη, Επικ. Καθηγήτρια
Νίκος Πασαδάκης, Καθηγητής

ΧΑΝΙΑ
Φεβρουάριος 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διαρροές πετρελαίου αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τα οικοσυστήματα, δημιουργώντας στις περισσότερες περιπτώσεις σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Όσον αφορά τις περιπτώσεις διαρροών πετρελαίου στη θάλασσα (πετρελαιοκηλίδες), η εξυγίανση του περιβάλλοντος είναι εξαιρετικά δύσκολο να επιτευχθεί. Η μέθοδος της ενισχυμένης βιοαποδόμησης πετρελαίου αποτελεί ένα εξαιρετικό τεχνολογικό επίτευγμα αποκατάστασης θαλάσσιου περιβάλλοντος, το οποίο στηρίζεται στην ικανότητα των αυτόχθονων μικροοργανισμών (βακτήρια και μύκητες) να αποδομούν το πετρέλαιο. Η ενίσχυση των μικροοργανισμών γίνεται με την προσθήκη κατάλληλων θρεπτικών υλικών (φώσφορο, άζωτο), σε συνδυασμό με λιπόφιλες φυσικές ουσίες και επιλεγμένες επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προέλευσης (biosurfactants), με σκοπό την ταχύτερη διέγερση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία σε ένα πείραμα 56 ημερών μελετήθηκε η επίδραση της χρήσης επιλεγμένων λιπόφιλων φυσικών ουσιών (ουρικό οξύ και λεκιθίνη), σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προέλευσης (Rhamnolipids, BB1000, New Cherry), όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους στην αποδόμηση υδρογονανθράκων ακατέργαστου αργού πετρελαίου (crude oil) σε θαλάσσιο περιβάλλον.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων της μεθόδου που ανέπτυξε η EPA (Environmental Protection Agency) [40CFR Ch. I, Pt 300, App.C]. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα μέσω της ανάλυσης του πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) με τη χρήση GC/MS.

ABSTRACT

Oil spills constitute a serious risk to ecosystems, creating in most cases significant environmental problems. Regarding the cases of oil at sea (oil spills), remediation of the environment is extremely difficult to achieve. The method of reinforced biodegradation of oil is an exceptional technological achievement of marine environment restoration. This method is based on the ability of indigenous microorganisms (bacteria and fungi) to degrade oil. The aid of microorganisms is achieved by adding suitable nutrients (phosphor, nitrogen), in combination with lipophilic manure and selected surfactants of biological origin (biosurfactants), in order to rapid stimulation.

In this study, in an experiment of 56 days, observed the effect of the use of selected lipophilic natural fertilizers (uric acid and lecithin), combined with three different biosurfactants (Rahmnolipids, BB1000, New Cherry), regarding their effectiveness in degradation of crude oil hydrocarbons in the marine environment.

The method which has been used to examine bioremediation agents based on a modified bioremediation agent effectiveness testing protocol developed by the EPA (Environmental Protection Agency) [40CFR Ch. I, Pt 300, App.C]. This protocol tests the microbial activity through the analysis of Most Probable Number (MPN) and quantifies the removal of saturated hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using GC / MS.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, το έτος 2015 στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με σκοπό την απόκτηση του διπλώματος μου. Για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Τον κ. Καλογεράκη Νικόλαο, καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Την κ. Μαρία Νικολοπούλου, μεταδιδακτορική στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για την άριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και της συγγραφής της εργασίας.

Τον κ. Πασαδάκη Νικόλαο επίκουρο καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης για την παραχώρηση του εργαστηριακού χώρου του και του εργαστηριακού εξοπλισμού του, ώστε να διεκπεραιωθεί το πείραμα.

Την κ. Βενιέρη Δανάη, επίκουρη καθηγήτρια του Πολυτεχνείου Κρήτης για το χρόνο που διέθεσε για τη διόρθωση και εξέταση της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και να αφιερώσω αυτή την εργασία στους γονείς μου και στην αδερφή μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν ανελλιπώς σε όλες τις επιλογές και στις προσπάθειες μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ – ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ

1.1 Εισαγωγή.....	7
1.2 Σύσταση αργού πετρελαίου.....	8
1.3 Ιδιότητες αργού πετρελαίου.....	9
1.4 Συμπεριφορά αργού πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	10
1.5 Δημιουργία πετρελαιοκηλίδων.....	12
1.6 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων.....	13
1.7 Συνέπειες θαλάσσιας πετρελαϊκής ρύπανσης.....	17
1.7.1 Επιπτώσεις στο περιβάλλον.....	17
1.7.2 Επιπτώσεις στον άνθρωπο.....	18
1.7.3 Κοινωνικές και Οικονομικές επιπτώσεις.....	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή.....	20
2.2 Μηχανικές Μέθοδοι.....	20
2.3 Χημικές Μέθοδοι.....	23
2.4 Εναλλακτικές Μέθοδοι.....	23
2.5 Βιοεξυγίανση.....	24
2.6 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα μεθόδου βιοεξυγίανσης.....	25
2.7 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση πετρελαίου.....	26
2.8 Βιο-τασενεργές ουσίες.....	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Περίληψη μεθόδου.....	29
3.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	30
3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	32
3.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	32
3.3.2 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Bushnell – Hass.....	32
3.3.3 Προετοιμασία τριβλίων με marine agar.....	33
3.3.4 Μικροβιακή απαρίθμηση.....	33
3.3.4.1 Αραιώσεις.....	33
3.3.4.2 Μέθοδος Most Probable Number (MPN).....	33
3.3.4.3 Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού τριβλίων.....	35
3.4 Χημικές Αναλύσεις.....	35
3.4.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	35
3.4.2 Εκχύλιση υγρής – υγρής φάσης (Liquid-Liquid-Extraction).....	36
3.4.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase-Extraction).....	37
3.4.4 Αέρια Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας.....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Δείγμα Control.....	42
4.1.1 GC/MS Ανάλυση.....	42
4.1.2 Μικροβιολογική Ανάλυση.....	43
4.2 Δείγμα BB1000.....	44
4.2.1 GC/MS Ανάλυση.....	44
4.2.2 Μικροβιολογική Ανάλυση.....	46
4.3 Δείγμα RA.....	48
4.3.1 GC/MS Ανάλυση.....	48
4.3.2 Μικροβιολογική Ανάλυση.....	50
4.4 Δείγμα NC.....	51
4.4.1 GC/MS Ανάλυση.....	51
4.4.2 Μικροβιολογική Ανάλυση.....	52
4.5 Συγκεντρωτικά μικροβιολογικά αποτελέσματα των δειγμάτων.....	53
4.6 Συμπεράσματα.....	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ – ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ

1.1 Εισαγωγή

Το πετρέλαιο αποτελεί μέχρι σήμερα τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας. Η συνεχής αύξηση των ενεργειακών αναγκών στις σύγχρονες κοινωνίες, το καθιστά όλο και πιο απαραίτητο αγαθό στη ζωή του ανθρώπου. Η μεταφορά μέσω θαλάσσης αποτελεί το πιο σύνηθες αλλά και το σημαντικότερο μέσο μεταφοράς πετρελαίου από τις πηγές παραγωγής του στις εστίες κατανάλωσης, αφού το 62% του διεθνώς παραγόμενου πετρελαίου μεταφέρεται μέσω των θαλάσσιων οδών. Όπως σε όλες τις ανθρώπινες δραστηριότητες, έτσι και εδώ, υπάρχουν στιγμές που λαμβάνουν χώρα ατυχήματα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες πετρελαίου να καταλήγουν στη θάλασσα ετησίως, σχηματίζοντας πετρελαιοκηλίδες (oil spills). Η ρύπανση που προκαλείται από τις πετρελαιοκηλίδες μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις τόσο στα θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος των πετρελαιοκηλίδων έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνολογίες, ενώ κάποιες βρίσκονται υπ' ανάπτυξη και είναι πιθανόν να υιοθετηθούν στο μέλλον, αφού αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους. Η βιοαποδόμηση (biodegradation) αποτελεί μία νέα τεχνολογία αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων, στηριζόμενη στην αποδόμηση υδρογονανθράκων από αυτόχθονους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στη διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου. Η μέθοδος αυτή μπορεί να λάβει δύο μορφές: βιοενίσχυση (bioaugmentation) και βιοδιέγερση (biostimulation). Η παρούσα εργασία στηρίζεται στη βιοδιέγερση των μικροοργανισμών με χρήση λιπόφιλων φυσικών ουσιών σε συνδυασμό με επιλεγμένες βιο-τασιενεργές ουσίες.

1.2 Σύσταση αργού πετρελαίου

Το αργό πετρέλαιο είναι ορυκτό, μίγμα πολλών χημικών ενώσεων, κυρίως υδρογονανθράκων. Σε μικρές ποσότητες περιέχονται και άλλες ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται ως ετερο-ενώσεις και αποτελούνται κυρίως από άζωτο, θείο, οξυγόνο και μέταλλα. Οι κυριότεροι υδρογονάνθρακες είναι τα αλκάνια (παραφίνες), τα κυκλοαλκάνια (ναφθένια) και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Ανάλογα με τα άτομα άνθρακα που περιέχουν, οι υδρογονάνθρακες βρίσκονται σε στερεή, υγρή, αέρια κατάσταση. Οι υδρογονάνθρακες με ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα (μεθάνιο έως βουτάνιο), είναι αέριοι σε θερμοκρασία δωματίου, οι υδρογονάνθρακες με περισσότερα άτομα άνθρακα είναι υγροί σε θερμοκρασία δωματίου (πεντάνιο, εξάνιο, κλπ). Οι υδρογονάνθρακες με περισσότερα από 17 άτομα άνθρακα ανά μόριο, είναι στερεοί σε θερμοκρασία δωματίου ως καθαρές ενώσεις, αλλά διαλύονται συνήθως στο υγρό μέρος του ακατέργαστου πετρελαίου.

Η ακριβής σύσταση του αργού πετρελαίου ποικίλει ανάλογα με την προέλευση και την ηλικία του. Στον παρακάτω πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες των στοιχείων του αργού πετρελαίου:

Στοιχεία	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Άνθρακας	83-87 %
Υδρογόνο	10-14%
Άζωτο	0.1-2%
Οξυγόνο	0.1-1.5%
Θείο	0.5-6%
Μέταλλα	<0.1%

Πίνακας 1.1: Περιεκτικότητες συστατικών αργού πετρελαίου

1.3 Ιδιότητες αργού πετρελαίου

Η διαφορετικότητα της σύστασης του πετρελαίου επηρεάζει και τις φυσικές του ιδιότητες, με αποτέλεσμα κάθε πετρέλαιο να έχει τη δική του «ταυτότητα» όσον αφορά τις ιδιότητες και τη σύσταση του. Όσον αφορά την εξυγίανση πετρελαιοκηλίδων οι πληροφορίες των ιδιοτήτων του πετρελαίου του ρυπασμένου πεδίου είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς είναι ικανές να καθορίσουν την τεχνολογία που θα εφαρμοστεί, ώστε να έχουμε το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Παρακάτω, παρουσιάζονται οι φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου.

ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ:

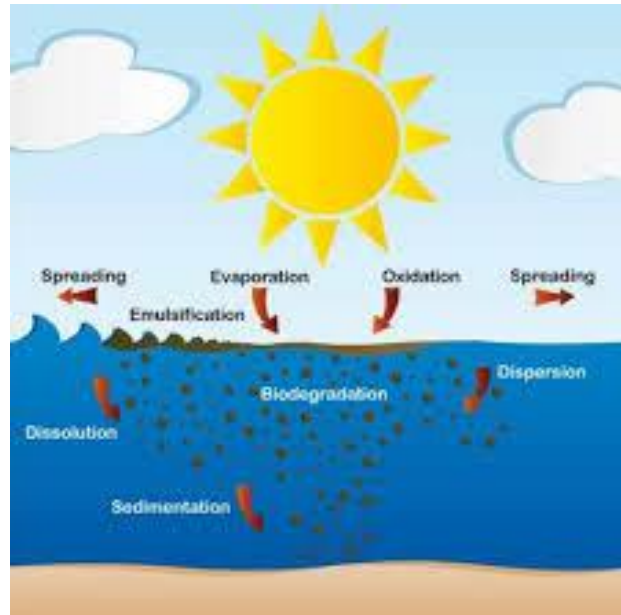
- **Το χρώμα**, το οποίο ποικίλει από ανοιχτό κίτρινο έως σκούρο μαύρο, ανάλογα με το είδος των υδρογονανθράκων και τη γενικότερη σύσταση του πετρελαίου.
- **Η οσμή**, η οποία είναι δυσάρεστη λόγω των ενώσεων θείου που περιέχονται.
- **Η πυκνότητα**, η οποία είναι υπεύθυνη για τη συμπεριφορά του στο νερό και εκφράζεται συνήθως μέσω της ειδικής πυκνότητας, με τιμές 0.73 έως 1.04 gr/cm³.
- **Το ιξώδες**, το οποίο εκφράζει την ιδιότητα του ρευστού να αντιστέκεται σε μια αλλαγή στη μορφή του ή στην μετακίνηση του και μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία.
- **Το σημείο ροής (Pour Point)**, το οποίο δείχνει σε ποια θερμοκρασία το πετρέλαιο γίνεται ημιστερεό ή σταματάει να ρέει. Το σημείο ροής του αργού πετρελαίου κυμαίνεται από -57 0C έως 32 0C.
- **Η διαλυτότητα του στο νερό**, η οποία όσον αφορά το αργό πετρέλαιο είναι ιδιαίτερα χαμηλή και εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τη χημική του σύσταση. Μία τυπική τιμή διαλυτότητας αργού πετρελαίου είναι περίπου 30 mg/L.
- **Το σημείο ανάφλεξης**, το οποίο αποτελεί την κατώτερη θερμοκρασία, στην οποία είναι δυνατή η ανάφλεξη μίγματος ατμών πετρελαίου-αέρα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θέρμανσης. Το πετρέλαιο έχει εξαιρετικά χαμηλό σημείο ανάφλεξης (<30 0 C), γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα εύφλεκτο υλικό.

1.4 Συμπεριφορά πετρελαίου στο θαλασσινό περιβάλλον

Ο χρόνος ζωής καθώς και η συμπεριφορά μιας πετρελαιοκηλίδας, επηρεάζονται από μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών. Οι διεργασίες αυτές ονομάζονται διεργασίες γήρανσης (weathering process) και είναι υπεύθυνες για τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου που συμβαίνουν με την πάροδο του χρόνου. Η δράση τους ξεκινά αμέσως μόλις το πετρέλαιο εισέλθει στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ο ρόλος τους στην αποκατάσταση του περιβάλλοντος είναι καθοριστικός καθώς έχουν σημαντικές επιδράσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Παρακάτω παρουσιάζονται και περιγράφονται οι σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης που λαμβάνουν χώρα σε μια περίπτωση πετρελαιοκηλίδας.

- **Εξάπλωση (Spreading):** Η διεργασία της εξάπλωσης του πετρελαίου στο νερό είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες. Συμβαίνει κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών εμφάνισης της πετρελαιοκηλίδας και περιγράφει την τάση του πετρελαίου να διασκορπίζεται οριζόντια στην επιφάνεια του νερού. Η ταχύτητα εξάπλωσης καθορίζεται ως επί το πλείστον από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες της περιοχής (ταχύτητα του αέρα, υδάτινα ρεύματα, ύψος κύματος, θερμοκρασία επιφάνειας θάλασσας), καθώς και από το πάχος της κηλίδας και τις ιδιότητες του πετρελαίου. Το ιξώδες παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ταχύτητα εξάπλωσης, καθώς πετρέλαια με χαμηλό ιξώδες τείνουν να εξαπλωθούν γρηγορότερα.
- **Εξάτμιση (Evaporation):** Τα συστατικά του πετρελαίου διακρίνονται σε εμμένοντα (persistent) και μη εμμένοντα (non persistent). Τα πρώτα είναι εκείνα τα οποία όταν διαρρέουν στη θάλασσα είναι δύσκολο να διασπαστούν και να αποικοδομηθούν, ενώ τα δεύτερα είναι εκείνα τα οποία εξατμίζονται ή διασκορπίζονται σχεδόν άμεσα χωρίς να δημιουργούν ιδιαίτερα προβλήματα. Η διεργασία της εξάτμισης αφορά τα μη εμμένοντα συστατικά με σημείο βρασμού μικρότερο των 200°C, τα οποία εξατμίζονται εντός των πρώτων 24 ωρών από τη στιγμή της διαρροής. Ο ρυθμός της εξάτμισης εξαρτάται από την χημική σύσταση του πετρελαίου, την ταχύτητα του ανέμου και την επιφανειακή θερμοκρασία. Η ύπαρξη ισχυρών ανέμων και κυματισμών αυξάνει τον ρυθμό εξάτμισης.
- **Γαλακτωματοποίηση (Emulsification):** Το πετρέλαιο που διαρρέει στην επιφάνεια της θάλασσας μπορεί σε συνθήκες ισχυρών ανέμων και έντονου κυματισμού να διασπαστεί σε σταγονίδια που παρασύρονται από τον άνεμο, χωρίς να προσβάλλεται η χημική τους σύσταση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γαλακτωματοποίηση του πετρελαίου στο νερό (oil-in-water emulsion). Η πιο συνηθισμένη περίπτωση γαλακτωματοποίησης είναι αυτή του νερού στο πετρέλαιο (water-in-oil emulsion). Πολλοί τύποι αργού πετρελαίου έχουν την τάση να απορροφούν νερό σχηματίζοντας γαλακτώματα νερού πετρελαίου, με συνέπεια να έχουμε αύξηση του όγκου της πετρελαιοκηλίδας. Σε αυτές τις περιπτώσεις το γαλάκτωμα που διαμορφώνεται είναι πολύ πιο επίμονο από το αρχικό πετρέλαιο και έχει πολύ μεγαλύτερο ιξώδες. Το ποσοστό του νερού στο γαλάκτωμα, μπορεί να φτάσει το 75-80%.

- **Διασπορά (Dispersion):** Η διασπορά αποτελεί το σημαντικότερο μηχανισμό μεταφοράς πετρελαίου κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της γήρανσης. Τα κύματα και οι διάφοροι στροβιλισμοί στην επιφάνεια της θάλασσας, δημιουργούν σταγονίδια πετρελαίου διαφόρων μεγεθών. Οι μεγάλες σταγόνες επιστρέφουν στην επιφάνεια, όπου είτε συσσωματώνονται με άλλες και ξαναδημιουργούν κηλίδα πετρελαίου, είτε εξαπλώνονται δημιουργώντας λεπτό φιλμ. Οι μικρές σταγόνες από την άλλη, αιωρούνται, αναμιγνύονται με το νερό και ξεκινά η βιοδιάσπαση και η καθίζηση. Ο ρυθμός της φυσικής διασποράς και ο ρυθμός εξάτμισης καθορίζουν το χρόνο ζωής μιας πετρελαιοκηλίδας.
- **Ιζηματοποίηση/Καταβύθιση (Sedimentation/Sinking):** Εξαιτίας της αύξησης της πυκνότητας του πετρελαίου από τη δράση των διεργασιών της εξάτμισης και της γαλακτωματοποίησης, είναι πιθανό ορισμένα βαριά κλάσματα να βυθιστούν. Ακόμη, η προσκόλληση ιζημάτων και άλλων οργανικών ουσιών ή και άμμου αποτελεί συχνή αιτία βύθισης.
- **Φώτο-Οξειδωση (Photo-Oxidation):** Πρόκειται για τη χημική αντίδραση του οξυγόνου με τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου. Η οξειδωση συμβαίνει στην επιφάνεια της θάλασσας και επιταχύνεται μετά την εξάπλωση του πετρελαίου και την δημιουργία λεπτών στρωμάτων (films) κηλίδων. Στην περίπτωση παρουσίας ηλιακής ακτινοβολίας, η αντίδραση ονομάζεται φωτοχημική οξειδωση και εξαρτάται από τη χημική σύσταση των υδρογονανθράκων, τη θερμοκρασία, το ηλιακό φως και το πάχος των φιλμ. Θεωρείται ότι ο ρυθμός της διάσπασης των λεπτών φιλμ λόγω φωτοοξειδωσης, σε ιδανικές συνθήκες θάλασσας και υπό την επίδραση ισχυρού ηλιακού φωτός μπορεί να ανέλθει στο 0,1% ανά ημέρα.
- **Διάλυση (Dissolution):** Η διάλυση του πετρελαίου στο νερό αφορά μόνο τα ελαφρά συστατικά του. Τα περισσότερα συστατικά του πετρελαίου είναι ελάχιστα διαλυτά. Η διάλυση αποτελεί διεργασία δευτερεύουσας σημασίας καθώς οι απώλειες σε όγκο του πετρελαίου, είναι ελάχιστες. Όσα από τα συστατικά διαλυτοποιηθούν απομακρύνονται μέσω της εξάτμισης. Η διαδικασία της διάλυσης επιβραδύνεται με την παρουσία μεταλλικών αλάτων στο θαλασσινό νερό.
- **Βιοδιάσπαση (Biodegradation) :** Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου αποτελεί μια βιολογική διεργασία γήρανσης πετρελαίου. Στήριζεται στην ικανότητα μικροοργανισμών (βακτήρια, μικρόβια, μύκητες κ.α.) που περιέχονται στο θαλασσινό νερό να διασπούν συγκεκριμένα συστατικά του πετρελαίου, δίνοντας ως τελικά προϊόντα οξείδια του άνθρακα και νερό. Ο ρυθμός της διεργασίας εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του πετρελαίου, τη θερμοκρασία, τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών στο νερό (κυρίως αζώτου και φωσφόρου) και το οξυγόνο. Το οξυγόνο έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διεργασία αυτή καθώς χωρίς αυτό είναι αδύνατη η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συνεπώς η βιοδιάσπαση του πετρελαίου είναι αδύνατη. Η διαδικασία της βιοδιάσπασης πραγματοποιείται μόνο στην επιφάνεια νερού – πετρελαίου, αφού το οξυγόνο δεν είναι διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες μέσα στο ίδιο το πετρέλαιο.



Εικόνα 1.4 Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου

1.5 Δημιουργία πετρελαιοκηλίδων

Μία από τις σημαντικότερες πηγές θαλάσσιας ρύπανσης είναι τα πετρελαιοειδή. Η συνεχής αύξηση των ποσοτήτων πετρελαίου που μεταφέρονται μέσω θαλάσσης, καθιστούν το πρόβλημα των πετρελαιοκηλίδων ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Οι πετρελαιοκηλίδες προέρχονται κατά κόρων από βιομηχανικές και αστικές εκροές αλλά και από τις θαλάσσιες μεταφορές καυσίμων. Παρόλο που οι θαλάσσιες μεταφορές θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, εντούτοις πολλές είναι οι περιπτώσεις ατυχημάτων, τα οποία δημιούργησαν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Πετρελαιοκηλίδες μπορούν να υπάρξουν εκτός από ωκεανούς και σε άλλα θαλάσσια οικοσυστήματα όπως ποτάμια, κόλπους, κ.α. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ρύπανση του περιβάλλοντος οφείλεται σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Οι αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν ατύχημα και συνεπώς να δημιουργήσουν πετρελαιοκηλίδα είναι οι εξής:

- Βύθιση – σύγκρουση – προσάραξη δεξαμενοπλοίων
- Πυρκαγιά και έκρηξη
- Ανθρώπινα λάθη
- Καταστροφή εξοπλισμού
- Διαρροές αγωγών
- Φυσικές καταστροφές (πχ τυφώνες)
- Πολεμικές ενέργειες

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται αναλυτικά η ποσοστιαία κατανομή πηγών θαλάσσιας πετρελαιικής ρύπανσης, σύμφωνα με επίσημα στοιχεία των Ηνωμένων Εθνών (1992).



1.6 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων

Οι πετρελαιοκηλίδες χωρίζονται σε τρεις βασικές ομάδες με βάση τον όγκο πετρελαίου που διαρρέει στη θάλασσα (<7 tones, 7-700 tones, >700 tones). Πλειονότητα των ατυχημάτων (~85%) είναι <7 tones. Παρόλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις ατυχημάτων που είχαν σαν αποτέλεσμα τεράστιες ποσότητες πετρελαίου να καταλήξουν στη θάλασσα και να δημιουργήσουν τρομερές οικολογικές καταστροφές. Από το 1974 κρατούνται στοιχεία από τη Διεθνή Ομοσπονδία Ιδιοκτητών Δεξαμενοπλοίων Ρύπανσης (ITOPF) για πετρελαιοκηλίδες που δημιουργήθηκαν λόγω ατυχημάτων. Ο ετήσιος αριθμός πετρελαιοκηλίδων από το 1970 φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΕΤΟΣ	7-700 tonnes	>700 tonnes	ΕΤΟΣ	7-700 tonnes	>700 tonnes
1970	7	29	1995	20	3
1971	18	14	1996	20	3
1972	48	27	1997	28	10
1973	28	31	1998	25	5
1974	90	27	1999	20	5
1975	96	20	2000	21	4
1976	67	26	2001	18	3
1977	70	16	2002	11	3
1978	59	23	2003	18	4
1979	60	32	2004	19	5
1980	52	13	2005	21	4
1981	54	7	2006	11	5
1982	46	4	2007	12	3
1983	52	13	2008	7	1
1984	26	8	2009	7	2
1985	33	8	2010	5	4
1986	27	7	2011	5	1
1987	27	11	2012	7	0
1988	11	10	2013	5	3
1989	32	13	2014	4	1
1990	50	14			
1991	30	7			
1992	31	10			
1993	31	11			
1994	26	9			

Πίνακας 1.5.1 Ετήσιος αριθμός πετρελαιοκηλίδων

Χιλιάδες είναι τα ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων που έχουν καταγραφεί τις τελευταίες δεκαετίες σε ολόκληρο τον κόσμο. Ένα από τα σημαντικότερα ατυχήματα παγκοσμίως, αποτελεί η έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon (Απρίλιος 2010) που συνέβη στον κόλπο του Μεξικού. Υπολογίζεται ότι από αυτό το ατύχημα απελευθερώθηκαν 750.000 τόνοι πετρελαίου, καθιστώντας το ατύχημα αυτό ως το δεύτερο μεγαλύτερο παγκοσμίως. Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα μεγαλύτερα ατυχήματα δεξαμενοπλοίων που έχουν συμβεί σε ολόκληρο τον κόσμο.

Shipname	Year	Location	Spill (tonnes)
Atlantic Empress	1979	Off Tobago, West Indies	287.000
ABT Summer	1991	700 nautical miles off Angola	260.000
Castillo de Bellver	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252.000
Amoco Cadiz	1978	Off Brittany, France	223.000
Haven	1991	Genoa, Italy	144.000
Odyssey	1988	700 nautical miles off Nova Scotia, Canada	132.000
Torrey Canyon	1967	Scilly Isles, UK	119.000
Sea Star	1972	Gulf of Oman	115.000
Irenes Serenade	1980	Navarino Bay, Greece	100.000
Urquiola	1976	La Coruna, Spain	100.000
Hawaiian Patriot	1977	300 nautical miles off Honolulu	95.000
Independenta	1979	Bosphorus, Turkey	95.000
Jakob Maersk	1975	Oporto, Portugal	88.000
Braer	1993	Shetland Islands, UK	85.000
Khark 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	80.000
Prestige	2002	Off the Spanish coast	77.000
Aegean Sea	1992	La Coruna, Spain	74.000
Sea Empress	1996	Milford Haven, UK	72.000
Katina P.	1992	Off Maputo, Mozambique	72.000
Exxon Valdez	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37.000

Πίνακας 1.5.2 Μεγαλύτερα παγκόσμια ατυχήματα δεξαμενοπλοίων



Εικόνα 1.5α Βύθιση δεξαμενοπλοίου ABT Summer, Αγκόλα



Εικόνα 1.5β Πετρελαιοκηλίδα Κόλπου Μεξικού



Εικόνα 1.5γ Έκρηξη πλατφόρμας Deepwater Horizon, κόλπος Μεξικού

1.7 Συνέπειες θαλάσσιας πετρελαϊκής ρύπανσης

Η έκχυση πετρελαίου στη θάλασσα είναι μία από τις χειρότερες μορφές ρύπανσης των θαλάσσιων υδάτων. Ο σχηματισμός πετρελαιοκηλίδων προκαλεί τις περισσότερες φορές σημαντικές επιπτώσεις τόσο στα θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Επιπλέον ανάλογα με το μέγεθος της καταστροφής μπορεί να επιφέρει επιπτώσεις και σε άλλους τομείς όπως αυτούς της οικονομίας και της κοινωνίας της περιοχής. Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος εισάγει στους ωκεανούς 5×10^6 τόνους πετρελαίου το έτος. Αυτό σε συνδυασμό με τη δυσκολία αποκατάστασης του ρυπασμένου πεδίου, καθιστά το πρόβλημα των πετρελαιοκηλίδων ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι επιπτώσεις που εμφανίζονται στον κάθε τομέα.

1.7.1 Επιπτώσεις στο περιβάλλον

Η πετρελαϊκή ρύπανση των θαλασσών και των ακτών υποβαθμίζει σημαντικά την ποιότητα του θαλάσσιου νερού, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει αρνητικά τη χλωρίδα και την πανίδα της ρυπασμένης περιοχής. Η χλωρίδα του θαλάσσιου οικοσυστήματος περιλαμβάνει όλα τα φύκη, το φυτοπλαγκτόν καθώς και όλα τα φυτά που αναπτύσσονται κοντά στις ακτές. Όταν το πετρέλαιο διαρρεύσει στη θάλασσα, η ανάπτυξη όλων αυτών των φυτικών ειδών παρεμποδίζεται. Αρχικά, το ηλιακό φως δεν μπορεί να διαπεράσει με ευκολία το φιλμ πετρελαίου που σχηματίζεται στην επιφάνεια του νερού με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι φωτοσυνθετικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυκών και του φυτοπλαγκτόν. Επιπλέον, το πετρέλαιο μπορεί να προσκολληθεί σε φύλλα φυτών ή να εισχωρήσει στην άμμο (πίσσα) και από εκεί στα φυτά μέσω του ριζικού τους συστήματος, καταστρέφοντας τα άμεσα.

Οι επιδράσεις του πετρελαίου στη χλωρίδα, επηρεάζουν άμεσα και τα ζωικά είδη του θαλάσσιου οικοσυστήματος (ψάρια, μαλάκια, θαλάσσια θηλαστικά, θαλάσσια πτηνά). Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου εξαιτίας της καταστροφής των φυτικών ειδών του βυθού από το πετρέλαιο σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μικροοργανισμών κατανάλωσης του, μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο πολλών θαλάσσιων οργανισμών, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο την άμεση εξάρτηση χλωρίδας-πανίδας στο βιολογικό κύκλο της θαλάσσιας ζωής. Επίσης, η υψηλή τοξικότητα των ουσιών του πετρελαίου μπορεί να επιφέρει τον θάνατο οργανισμών που έρχονται σε άμεση επαφή. Η τροφική αλυσίδα αποτελεί έναν τρόπο μεταφοράς των τοξικών ουσιών του πετρελαίου στους οργανισμούς. Για παράδειγμα ένα μολυσμένο από υδρογονάνθρακες ψάρι μπορεί να μεταφέρει τις τοξικές ουσίες του πετρελαίου σε έναν γλάρο, με αποτέλεσμα το πρόβλημα να γίνεται ακόμη μεγαλύτερο παίρνοντας ανεξέλεγκτες διαστάσεις. Στα θαλάσσια πτηνά συχνά το δέρμα τους καλύπτεται με πετρέλαιο προκαλώντας δυσκολία στο πέταγμα και αλλοιώσεις στο δέρμα. Σε μακροχρόνια έκθεση τους σε πετρελαιοειδή παρατηρούνται αλλοιώσεις στην όσφρηση και στην όραση καθώς και παθολογικές βλάβες στα όργανα τους.



Εικόνα 1.6α Προσκόλληση πετρελαίου στα φτερά πτηνών



Εικόνα 1.6β Επιπτώσεις πετρελαιοκηλίδας στα θαλάσσια θηλαστικά

1.7.2 Επιπτώσεις στον άνθρωπο

Σοβαρές επιπτώσεις μπορούν να προκληθούν στην υγεία του ανθρώπου εξαιτίας των τοξικών ουσιών που περιέχονται στο πετρέλαιο. Πολλές οργανικές ενώσεις είναι καρκινογόνες και εισχωρούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής, του δέρματος και της τροφικής αλυσίδας δημιουργώντας καρκινογενέσεις σε περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης. Άλλες άμεσες επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν στον άνθρωπο είναι πονοκέφαλοι, δύσπνοια, ερεθισμοί στα μάτια, ναυτία και κοιλιακοί πόνοι.

1.7.3 Κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις

Σε περιστατικά μεγάλης οικολογικής καταστροφής από πετρελαιοειδή, οι επιπτώσεις διευρύνονται και στους τομείς της οικονομίας και της κοινωνίας. Αρχικά για την αντιμετώπιση του προβλήματος χρειάζεται να δαπανηθούν τεράστια χρηματικά ποσά με σκοπό την αποκατάσταση του περιβάλλοντος. Ιδιαίτερα, αν πρόκειται για περιοχές που στηρίζονται στην αλιεία και τον τουρισμό ο τομέας της οικονομίας κλονίζεται ακόμη περισσότερο. Η αρνητική εικόνα σε συνδυασμό με την μη αξιοποίηση της περιοχής για την πραγματοποίηση δραστηριοτήτων οδηγούν στην γενικότερη υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των κατοίκων της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

Οι συνέπειες της θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή (όπως αναφέρθηκαν παραπάνω) και κυρίως αυτές που σχετίζονται με μεγάλες διαρροές, κάνουν επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών αντιμετώπισης τους. Οι τεχνολογίες καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων που αναπτύσσονται και εφαρμόζονται σε κάθε περίπτωση, εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του πετρελαίου και την περιοχή που βρίσκεται η ρύπανση. Κύριος στόχος τους είναι η άμεση προστασία και αποκατάσταση του περιβάλλοντος. Τα τελευταία χρόνια οι τεχνολογίες αντιμετώπισης της θαλάσσιας ρύπανσης από τα προϊόντα του πετρελαίου παρουσιάζουν σημαντική πρόοδο, στηριζόμενες σε μηχανικές, χημικές και άλλες εναλλακτικές μεθόδους συμπληρωματικού χαρακτήρα. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι αντιμετώπισης πετρελαϊκής ρύπανσης.

2.2 Μηχανικές μέθοδοι

- **Φράγματα (booms)**

Τα φράγματα είναι πλωτά συστήματα περιορισμού του πετρελαίου, τα οποία χρησιμοποιούνται με σκοπό την ευκολότερη περισυλλογή του. Η εφαρμογή των φραγμάτων είναι τεχνικά δυνατή μόνο εφόσον το πετρέλαιο επιπλέει ακόμα και δεν έχει εξαπλωθεί. Αυτό σημαίνει ότι είναι κρίσιμη η άμεση εφαρμογή τους. Τα φράγματα αποτελούν ένα μηχανικό τείχος το οποίο: αποτρέπει την εξάπλωση και διευκολύνει την περισυλλογή, αποτρέπει τη ρύπανση ευαίσθητων περιοχών και μεταφέρει το πετρέλαιο σε περιοχές όπου είναι εύκολη η περισυλλογή του. Σε ταχύτητες ρευμάτων πάνω από 0.7 – 1 knots (1 knot=1 mile/hour), τα φράγματα αδυνατούν να συγκρατήσουν το πετρέλαιο οπότε η εφαρμογή τους δε συνιστάται ως κατάλληλη μέθοδος.

- **Πετρελαιοσυλλέκτες (oil skimmers)**

Ο πετρελαιοσυλλέκτης είναι μια διάταξη ανάκτησης πετρελαίου ή μίγματος πετρελαίου – νερού από τη θαλάσσια επιφάνεια. Η χρήση τέτοιων συλλεκτών τις περισσότερες φορές συνδυάζεται με την εφαρμογή φραγμάτων, τα οποία περικλείουν το πετρέλαιο αυξάνοντας τη συγκέντρωσή του. Ένας συλλέκτης πετρελαίου αποτελείται από μία συσκευή ανάκτησης πετρελαίου, μια αντλία για τη μεταφορά του πετρελαίου σε βυτίο και μία συσκευή για να διατηρεί σταθερό το επίπεδο σε σχέση με τη θάλασσα. Σχεδόν όλοι οι συλλέκτες χρησιμοποιούν μία από τις παρακάτω μεθόδους για την ανάκτηση:

Ανάκτηση με ρόφηση: Το πετρέλαιο ανακτάται με αντλία. Η ανάκτηση με ρόφηση είναι αποτελεσματικότερη σε περιπτώσεις πετρελαίου με μεγάλο ιξώδες. Οι συλλέκτες που χρησιμοποιούν αυτή την τεχνική πρέπει να έχουν μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού νερού – πετρελαίου και μεγάλη ικανότητα ανάκτησης.

Ανάκτηση με προσκόλληση: Η μέθοδος χρησιμοποιεί την απορροφητική ικανότητα ορισμένων μερών του συλλέκτη όπως είναι ένας κινούμενος ιμάντας, ένα τύμπανο, ένας δίσκος ή ένα σχοινί. Αυτή η μέθοδος αφορά πετρέλαια μεσαίου ιξώδους.

Πρακτικοί τρόποι σχεδίασης: Η μέθοδος στηρίζεται στην προσαρμογή συλλεκτών στο σχεδιασμό ενός πλοίου, αλλά και στο στρόβιλο ενός φράγματος σε σχήμα V. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αποτελεσματικότητα της σχεδόν σε όλες τις θαλάσσιες συνθήκες.

Οι συλλέκτες πετρελαίου διακρίνονται σε μηχανικούς και ελαιοφιλικούς. Οι πρώτοι βασίζονται στη διαφορά πυκνότητας μεταξύ ρύπου και νερού, ενώ οι δεύτεροι στηρίζονται στη χρήση ελαιοφίλων υλικών. Παρακάτω αναφέρονται παραδείγματα μηχανικών και ελαιοφίλων συλλεκτών.

Μηχανικοί πετρελαιοσυλλέκτες

- Ο φυγοκεντρικός (vortex) συλλέκτης, όπου ένα περιστρεφόμενο μέρος συγκεντρώνει το πετρέλαιο στο μέσο του συλλέκτη σπρώχνοντάς το στο επάνω μέρος, ενώ το νερό ως βαρύτερο πάει προς τα κάτω.
- Ο συλλέκτης τύπου WEIR: Ο συλλέκτης τοποθετείται λίγο κάτω από την επιφάνεια του νερού και ε τη βοήθεια της βαρύτητας το πετρέλαιο καταλήγει στο φρεάτιο του συλλέκτη, από όπου αντλείται στην δεξαμενή αποθήκευσης
- Ο συλλέκτης κυλιόμενου ιμάντα, όπου ένας κεκλιμένος κυλιόμενος ιμάντας από μη ελαιοφιλικό υλικό μεταφέρει το πετρέλαιο στην περιοχή περισυλλογής.

Ελαιόφιλοι πετρελαιοσυλλέκτες

- Ο συλλέκτης με δίσκους, όπου οι δίσκοι περιστρέφονται στο μίγμα νερού – πετρελαίου, με αποτέλεσμα το πετρέλαιο να προσκολλάται πάνω τους .
- Ο συλλέκτης με σχοινί, ο οποίος διαθέτει ένα ελαιόφιλο σχοινί το οποίο επιπλέει και είτε περιστρέφεται μεταξύ δύο τροχαλιών είτε σύρεται στην επιφάνεια της θάλασσας από πλοίο. Το πετρέλαιο συλλέγεται σε φρεάτιο απ' όπου αντλείται.
- Ο συλλέκτης, όπου ένας ιμάντας μεταφέρει το πετρέλαιο από την επιφάνεια με προσκόλληση και μετά συμπιέζεται για να αποδώσει το πετρέλαιο.
- Ο συλλέκτης τύπου τυμπάνου, όπου το πετρέλαιο προσκολλάται σε τύμπανο το οποίο είναι ημιβυθισμένο σε οριζόντια θέση και φέρει επίστρωση από ελαιόφιλο υλικό.

• Απορροφητικά Υλικά

Τα απορροφητικά είναι υλικά με απορροφητικές ή προσκολλητικές ιδιότητες προκειμένου να περισυλλέξουν ρευστά. Τα απορροφητικά υλικά αποτελούν μία ακόμη μηχανική μέθοδο περισυλλογής πετρελαίου από την επιφάνεια του νερού. Τα υλικά αυτά διακρίνονται ανάλογα με την πρώτη ύλη κατασκευής τους. Έτσι μπορούν να διακριθούν στις εξής βασικές κατηγορίες:

- Κατεργασμένα Φυτικά (Natural Organic Sorbents)
- Κατεργασμένα Ορυκτά (Mineral Sorbents)
- Συνθετικά – Πολυμερή (Synthetic Sorbents)

Τα απορροφητικά υλικά διασκορπίζονται (με εξαίρεση τα απορροφητικά φράγματα) στην κηλίδα όπου αφήνονται να απορροφήσουν το πετρέλαιο και στη συνέχεια περισυλλέγονται. Τα υλικά αυτά κατασκευάζονται με τη μορφή φραγμάτων, μαξιλαριών ή φύλλων.

2.3 Χημικές Μέθοδοι

- **Προσθήκη χημικών ουσιών**

Η προσθήκη χημικών ουσιών διασποράς (chemical dispersants) αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ενίσχυση της φυσικής διασποράς του πετρελαίου μέσω των χημικών ουσιών. Τα χημικά διασποράς προστίθενται είτε από αέρα μέσω γεωργικών αεροπλάνων, είτε από θάλασσα με τη χρήση πλοιαρίων. Συνήθως αποτελούνται από δύο βασικές χημικές ουσίες, μία τασιενεργή ουσία και ένα διαλύτη. Όταν η τασιενεργή ουσία έρθει σε επαφή με το πετρέλαιο μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ του πετρελαίου και του νερού με αποτέλεσμα μέρος της πετρελαιοκηλίδας να διασπάται σε μικρότερα σταγονίδια, διασπαρμένα στο νερό. Το μέγεθος αυτών των σταγονιδίων διαφέρει, έτσι τα μεγάλα σταγονίδια επιστρέφουν στην επιφάνεια ενώ τα μικρότερα παραμένουν αιωρούμενα στο νερό. Για να είναι επιτυχής η μέθοδος πρέπει να γίνει προσθήκη της σωστής ποσότητας των χημικών ουσιών. Σε αυτή την περίπτωση δημιουργείται ένα πλούσιο το οποίο θα προχωρά προς τα κάτω αφού γίνει η ρίψη των χημικών ουσιών. Ο διαλύτης ουσιαστικά χρησιμοποιείται για να αυξήσει ακόμη περισσότερο την αποδοτικότητα της μεθόδου, αφού μπορεί να εισέρχεται με ευκολία στην οργανική φάση «μεταφέροντας» ταυτόχρονα την τασιενεργή ουσία.

2.4 Εναλλακτικές Μέθοδοι

- **Ανάφλεξη στην ανοιχτή θάλασσα (in situ burning)**

Η μέθοδος αυτή αν και φαίνεται πολύ απλή στην εφαρμογή της έχει πολλά προβλήματα. Παρόλα αυτά θεωρείται ως η πιο «αποτελεσματική» μέθοδος αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων από τη βιομηχανία. Τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η μέθοδος της επιτόπιας ανάφλεξης του επιπλέοντος πετρελαίου είναι τα εξής:

- Αδυναμία ανάφλεξης ή διατήρησης της καύσης (πάχος πετρελαιοκηλίδας τουλάχιστον 2-3 mm για να υπερισχύσει της ψύξης λόγω του νερού και των ανέμων).
- Τα ελαφριά συστατικά του πετρελαίου εξατμίζονται κάνοντας την ανάφλεξη δυσκολότερη.
- Πετρέλαιο που έχει υποστεί σημαντική γήρανση (weathered oil) είναι δύσκολο να αναφλεχθεί.

Ακόμη η μέθοδος αυτή δημιουργεί ιδιαίτερα σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα όπως παραγωγή μαύρου καπνού που μπορεί να επικαθίσει σε περιοχές μέχρι και 100km μακριά, τα υπολείμματα της καύσης είναι πιθανό να είναι πιο δύσκολα βιοδιασπώμενα και μία πιθανή καθίζηση τους να επιφέρει τοξικότητα στο βυθό.

- **Φυσική αποκατάσταση (Natural degradation)**

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην φυσική βιοδιάσπαση του πετρελαίου μέσω των αυτοχθόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στη διεπιφάνεια πετρελαίου – νερού, αλλά και στις διάφορες φυσικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα (π.χ. εξάτμιση) μόλις το πετρέλαιο εισέλθει στο νερό. Η μέθοδος αυτή δε χρησιμοποιείται συχνά. Συνήθως χρησιμοποιείται στην περίπτωση παρακολούθησης της κίνησης της κηλίδας στην ανοιχτή θάλασσα. Ακόμη, συνιστάται στην περίπτωση που οποιαδήποτε ανθρώπινη παρέμβαση στο περιβάλλον εγκυμονεί μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Σε περιπτώσεις κινδύνου μεταφοράς του πετρελαίου σε ακτή δεν ενδείκνυται σαν μέθοδος.

2.5 Βιοεξυγίανση (Bioremediation)

Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης αποτελεί μία καινούρια τεχνολογία αρκετά ελπιδοφόρα όσον αφορά τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων. Ουσιαστικά πρόκειται για μία τροποποιημένη μορφή φυσικής αποκατάστασης του περιβάλλοντος. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αύξηση του ρυθμού φυσικής βιοδιάσπασης του πετρελαίου με την παρέμβαση του ανθρώπου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους: *βιοενίσχυση (bioaugmentation)* και *βιοδιέγερση (biostimulation)*.

- **Βιοδιέγερση (Biostimulation):**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι υπάρχουν πάντα μικροοργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν το πετρέλαιο, η ανάπτυξη και η δράση των οποίων εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο ρυπασμένο πεδίο. Σε μία πετρελαιοκηλίδα έχουμε μεγάλη ποσότητα άνθρακα χωρίς τις απαιτούμενες ποσότητες αζώτου και φωσφόρου. Η προσθήκη λιπασμάτων με σκοπό την επίτευξη της απαιτούμενης σχέσης C:N:P (120:10:1 σε mol), για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελεί το αντικείμενο αυτής της μεθόδου. Εκτός από την χρήση λιπασμάτων, συχνά γίνεται και προσθήκη ελαιοφιλικών πρόσθετων (που είναι υδρόφοβα), τα οποία όμως έχουν αποδειχθεί τοξικά σε ορισμένους θαλάσσιους μικροοργανισμούς που βιοδιασπούν τα πετρελαιοειδή. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος πλέον γίνεται χρήση βιολογικά παρασκευασμένων επιφανειακά δραστικών ουσιών (biosurfactants).

➤ **Βιοενίσχυση (Biaugmentation):**

Σε αυτή την περίπτωση γίνεται προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διασπούν τα πετρελαιοειδή και λόγω του υψηλού αριθμού των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται ένας υψηλότερος ρυθμός βιοδιάσπασης. Στην ελεύθερη αγορά υπάρχουν σκευάσματα που περιέχουν εξειδικευμένα κονσόρσια μικροοργανισμών που διασπούν τα πετρελαιοειδή και συγχρόνως περιέχουν θρεπτικές ουσίες κυρίως αζώτου και φωσφόρου (N και P). Η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε περιοχές μόνιμης πετρελαϊκής ρύπανσης, ενώ υπάρχει αρκετός σκεπτικισμός σχετικά με την αποδοτικότητα της μεθόδου καθώς συχνά οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί ξεπερνούν σε αριθμό τους προστιθέμενους.

Εργαστηριακές μελέτες αλλά και εφαρμογές αυτών των τεχνικών στο πεδίο, έχουν δείξει ότι και οι δύο μέθοδοι μπορούν να ενισχύσουν την βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Ωστόσο σε σύγκριση μεταξύ τους, η μέθοδος της βιοδιέγερσης είναι αποτελεσματικότερη, καθώς η προσθήκη μικροοργανισμών που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες δεν θα ενισχύσει περισσότερο τη διάσπαση του πετρελαίου από μία απλή προσθήκη θρεπτικών.

2.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου βιοεξυγίανσης

Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης δεν αποτελεί μία ουτοπική μέθοδο, η οποία δε συναντά προβλήματα και δυσκολίες σχετικά με την εφαρμογή της και την αποτελεσματικότητά της. Όπως κάθε μέθοδος έτσι κι αυτή παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

Πλεονεκτήματα :

- Απλή εφαρμογή, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις προσωπικού και μηχανικού εξοπλισμού.
- Χαμηλό κόστος λειτουργίας σε σύγκριση με άλλες τεχνικές βιοαποκατάστασης.
- Ελάχιστες έως και μηδενικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την εφαρμογή της.
- Χρόνος αποκατάστασης σχετικά μικρός (6-24 μήνες).

Μειονεκτήματα :

- Είναι πολύ δύσκολη η επίτευξη μείωσης συγκεντρώσεως ρύπων άνω του 95% και συγκεντρώσεων συστατικών του πετρελαίου κάτω του 0.1 ppm.

- Αποτελεί μία δευτερεύουσα μέθοδο αποκατάστασης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υψηλά επίπεδα ρύπανσης.
- Η απόδοση της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να ελέγχονται και να ρυθμίζονται συνεχώς ώστε να επιτυγχάνονται βέλτιστοι ρυθμοί δράσης των μικροοργανισμών και συνεπώς να έχουμε βέλτιστη αποδόμηση των ρύπων.
- Σε περιπτώσεις ρύπων υψηλής τοξικότητας η διαδικασία της βιοεξυγίανσης επιμηκύνεται χρονικά.

2.7 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την βιοδιάσπαση του πετρελαίου

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου βιοεξυγίανσης εξαρτάται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη δράση των μικροοργανισμών και συνεπώς την αποικοδόμηση του ρύπου. Οι κυριότεροι τέτοιοι παράγοντες είναι οι εξής:

➤ ΡΗ

Η τιμή του ρΗ μπορεί να επηρεάσει τη δράση των μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί απαιτούν ουδέτερο ρΗ, όμως στο θαλασσινό νερό η τιμή του ρΗ κυμαίνεται μεταξύ 7.5 και 8.4. Έχει παρατηρηθεί ότι η βέλτιστη αποικοδόμηση πετρελαίου εμφανίζεται σε ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες.

➤ Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό παράγοντα βιοδιάσπασης πετρελαίου. Ιδανικές τιμές θερμοκρασίας για υψηλούς ρυθμούς αποικοδόμησης είναι 15 °C – 20°C. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 5°C η δράση των μικροοργανισμών σταματά, ενώ σε περιπτώσεις θερμοκρασιών πάνω από 60°C οι μικροοργανισμοί καταστρέφονται.

➤ Οξυγόνο

Η παρουσία οξυγόνου κρίνεται απαραίτητη για την αποδόμηση υδρογονανθράκων. Η μείωση του οξυγόνου οδηγεί σε μείωση της βιοδιάσπασης. Συνήθως το οξυγόνο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στα κατώτερα στρώματα της υδάτινης στήλης.

➤ Θρεπτικές Ουσίες (Nutrients)

Η προσθήκη θρεπτικών ουσιών και κυρίως αζώτου και φωσφόρου (N και P), κρίνεται απαραίτητη για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Η δημιουργία πετρελαιοκηλίδας στη θάλασσα, έχει σαν αποτέλεσμα τα επίπεδα άνθρακα να αυξηθούν σημαντικά, ενώ τα επίπεδα των άλλων ανόργανων ουσιών να παραμένουν σταθερά, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η σωστή αναλογία

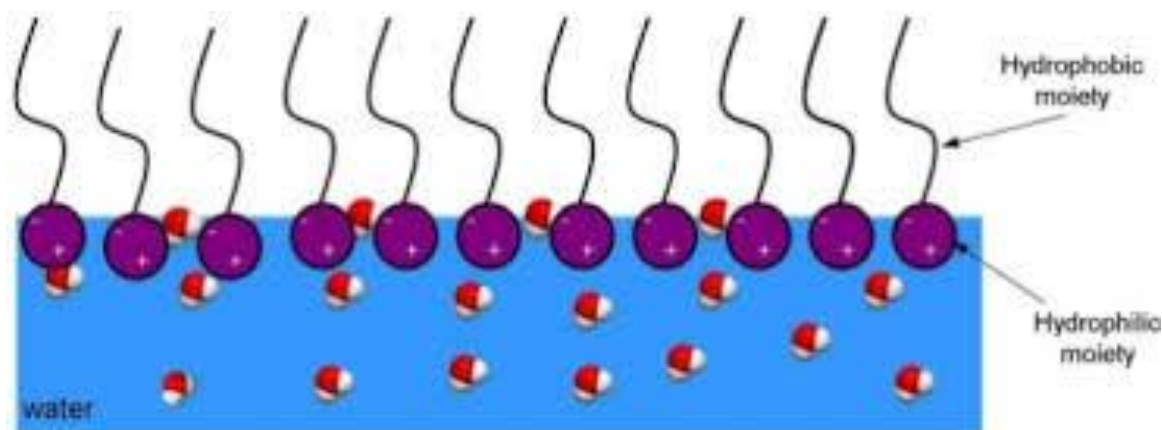
C:N:P (120:10:1 σε mol), δυσκολεύοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

➤ Αλατότητα

Οι αλλαγές στα επίπεδα αλατότητας επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Οι περισσότεροι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί αυξάνονται λίγο ή καθόλου σε αλατότητα μικρότερη από 1.5 – 2%. Σε περιπτώσεις αύξησης των επιπέδων αλατότητας έχει παρατηρηθεί μείωση του ρυθμού μεταβολισμού των υδρογονανθράκων σε ένα εύρος τιμών από 3.3-28.4%.

2.8 Βιο-τασιενεργές ουσίες (biosurfactants)

Οι τασιενεργές ή επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) είναι ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια διαφόρων συστατικών. Κύρια ιδιότητα τους είναι η μείωση των επιφανειακών τάσεων στις διεπιφάνειες των ρευστών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με ανάμιξη είτε με διάχυση ανάμεσα στις δύο φάσεις ενός μίγματος. Οι τασιενεργές ενώσεις έχουν το χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι περιέχουν στο μόριο τους μια υδρόφιλη ομάδα, (πολική κεφαλή), που τις καθιστά υδατοδιαλυτές, καθώς και μια υδρόφοβη (μη πολική ουρά). Ο τρόπος δράσης των τασιενεργών στηρίζεται στην ταυτόχρονη δράση του υδρόφιλου και του υδρόφοβου τμήματος του μορίου τους. Προσθέτοντας τασιενεργό στο νερό εμπλουτίζονται τα σημεία του ρύπου επιφανειακά. Το υδρόφοβο τμήμα του τασιενεργού προσανατολίζεται προς τον υδρόφοβο ρύπο, π.χ. πετρέλαιο, ενώ το υδρόφιλο τμήμα προσανατολίζεται προς το νερό. Λόγω της επιφανειοδραστικότητας τους τα μόρια των τασιενεργών διεισδύουν στο υπόστρωμα δηλαδή ανάμεσα στον ρύπο και την ινώδη επιφάνεια με αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση και απομάκρυνση του ρύπου.



Εικόνα 2.8 Μηχανισμός δράσης τασιενεργών ουσιών

Μέχρι πρόσφατα ως πρώτη ύλη για την παραγωγή τασιενεργών ήταν το πετρέλαιο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες να αποτελούν ρίσκο για το περιβάλλον, καθώς σχημάτιζαν επικίνδυνες ενώσεις, οι οποίες δεν αποικοδομούνται πλήρως στο έδαφος ή στο νερό. Εξαιτίας αυτών των περιβαλλοντικών προβλημάτων αλλά και των προβλημάτων υγείας στους χρήστες- καταναλωτές των τασιενεργών, όπως αλλεργίες, δερματοπάθειες, κ.α., τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια αντικατάστασής τους από βιολογικά προϊόντα (βιο-τασιενεργές ουσίες). Οι βιο-τασιενεργές ουσίες συντίθενται από ζωντανά κύτταρα κυρίως βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων. Είναι ουσίες φιλικές στο περιβάλλον και αποτελεσματικές στην αποικοδόμηση των συστατικών πετρελαίου, γεγονός που τις καθιστά αναγκαίες. Οι κυριότερες κατηγορίες βιο-τασιενεργών είναι:

- *Γλυκολιπίδια (ραμνολιπίδια, σοφορολιπίδια, τρεχαλολιπίδια)*
- *Λιποπτεπτίδια / λιποπρωτεΐνες (σουρφακτίνη, ιτουρίνη, φενγγυσίνη)*
- *Πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις*
- *Φωσφολιπίδια (λεκιθίνη)*
- *Τασιενεργά σωματίδια*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Περίληψη Μεθόδου

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της χρήσης επιλεγμένων λιπόφιλων φυσικών ουσιών (ουρικό οξύ και λεκιθίνη) , σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές βιο-τασιενεργές ουσίες, όσον αφορά την βιοαποδόμηση πετρελαϊκών υδρογονανθράκων σε θαλάσσιο περιβάλλον. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης στηρίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης που ανέπτυξε η EPA [40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C]. Το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με σκοπό τον καθορισμό της ικανότητας ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο. Το πρωτόκολλο απαιτεί την εξέταση της μικροβιακής δραστηριότητας καθώς επίσης και την ποσοτικοποίηση των χημικών μεταβολών (απομάκρυνση κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων) στη σύσταση του πετρελαίου. Για την διεκπεραίωση του πειράματος έγιναν τόσο μικροβιολογικές όσο και χημικές αναλύσεις. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις περιλαμβάνουν την καλλιέργεια μικροβιακών πληθυσμών καθώς και τον έλεγχο βιωσιμότητας τους μέσω της μεθόδου του πιο πιθανού αριθμού (MPN- Most Probable Number). Οι χημικές αναλύσεις γίνονται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση τα δείγματα προετοιμάζονται και γίνεται εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου σε διχλωρομεθάνιο (DCM) – εκχύλιση υγρής – υγρής φάσης LLE (Liquid-Liquid Extraction), με σκοπό το διαχωρισμό του πετρελαίου από το θαλασσινό νερό. Στη δεύτερη φάση πραγματοποιείται η εκχύλιση στερεής φάσης SPE (Solid Phase Extraction) των δειγμάτων, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός του πετρελαίου σε κορεσμένα και αρωματικά κλάσματα. Η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων κλασμάτων (αρωματικών και κορεσμένων) των δειγμάτων γίνεται μέσω του Αέριου Χρωματογράφου-Φασματομέτρου Μάζας υψηλής ανάλυσης GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Για την αποτελεσματική ολοκλήρωση του πειράματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο δοκιμής, απαιτείται η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης των διαφόρων αναλυτών προς έναν μη-βιοδιασπάσιμο δείκτη (C2- ή C3-φενανθρένιο, C2-χρυσένιο ή χοπάνιο).

3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων συλλέχθηκε θαλασσινό νερό από την παραλία του Αγίου Ονούφριου στην περιοχή Ακρωτηρίου Χανίων, περιοχή η οποία δεν επιβαρύνεται με βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Το νερό συλλέχθηκε στις 16/03/15, περίοδο που δεν υπήρχαν βροχοπτώσεις. Το πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα ελαφρύ αργό πετρέλαιο (crude oil), το οποίο πριν τη χρήση του υποβλήθηκε σε τεχνητή γήρανση με θέρμανση στους 200°C όπως ορίζει η μέθοδος ASTM D86 (Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products), ώστε να απομακρυνθεί το ελαφρύ κλάσμα των υδρογονανθράκων (<C15). Αυτό συνέβη για την καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών περιβάλλοντος, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των ελαφριών συστατικών του πετρελαίου εξατμίζεται τις πρώτες ώρες εμφάνισης της πετρελαιοκηλίδας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα συστατικά όλων των δειγμάτων.

	seawater [mL]	crude oil [μL]	Uric acid [μL]	Lecithin [mg]	New Cherry [μL]	BB1000 [μL]	Rhamnolipids Actygea [mL]
CONTROL		0.1g					
C0#1	20	102					
C7#1	20	102					
C7#2	20	102					
C14#1	20	102					
C14#2	20	102					
C21#1	20	102					
C21#2	20	102					
C35#1	20	102					
C35#2	20	102					
C56#1	20	102					
C56#2	20	102					
UL+New Cherry							
ULNC0#1	20	102	100	47	120		
ULNC7#1	20	102	100	47	120		
ULNC7#2	20	102	100	47	120		
ULNC7#3	20	102	100	47	120		
ULNC14#1	20	102	100	47	120		
ULNC14#2	20	102	100	47	120		
ULNC14#3	20	102	100	47	120		
ULNC21#1	20	102	100	47	120		
ULNC21#2	20	102	100	47	120		
ULNC21#3	20	102	100	47	120		
ULNC35#1	20	102	100	47	120		
ULNC35#2	20	102	100	47	120		
ULNC35#3	20	102	100	47	120		
ULNC56#1	20	102	100	47	120		
ULNC56#2	20	102	100	47	120		
ULNC56#3	20	102	100	47	120		

UL+BB1000	seawater [mL]	crude oil [μL]	Uric acid [μL]	Lecithin [mg]	New Cherry [μL]	BB1000 [μL]	Rhamnolipids Actygea [mL]
ULBB0#1	20	102	100	47		50	
ULBB7#1	20	102	100	47		50	
ULBB7#2	20	102	100	47		50	
ULBB7#3	20	102	100	47		50	
ULBB14#1	20	102	100	47		50	
ULBB14#2	20	102	100	47		50	
ULBB14#3	20	102	100	47		50	
ULBB21#1	20	102	100	47		50	
ULBB21#2	20	102	100	47		50	
ULBB21#3	20	102	100	47		50	
ULBB35#1	20	102	100	47		50	
ULBB35#2	20	102	100	47		50	
ULBB35#3	20	102	100	47		50	
ULBB56#1	20	102	100	47		50	
ULBB56#2	20	102	100	47		50	
ULBB56#3	20	102	100	47		50	
UL+rhamnolipids Actygea							
ULRA0#1	20	102	100	47			1.5
ULRA7#1	20	102	100	47			1.5
ULRA7#2	20	102	100	47			1.5
ULRA7#3	20	102	100	47			1.5
ULRA14#1	20	102	100	47			1.5
ULRA14#2	20	102	100	47			1.5
ULRA14#3	20	102	100	47			1.5
ULRA21#1	20	102	100	47			1.5
ULRA21#2	20	102	100	47			1.5
ULRA21#3	20	102	100	47			1.5
ULRA35#1	20	102	100	47			1.5
ULRA35#2	20	102	100	47			1.5
ULRA35#3	20	102	100	47			1.5
ULRA56#1	20	102	100	47			1.5
ULRA56#2	20	102	100	47			1.5
ULRA56#3	20	102	100	47			1.5

Πίνακας 3.2 Συστατικά δειγμάτων

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα έγιναν δειγματοληψίες για 0,7,14,21,35 και 56 ημέρες. Για καθεμία από τις τρεις βιο-τασιενεργές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν (Rhamnolipids Actygea, New Cherry, BB1000) υπήρχαν τρία διαφορετικά δείγματα σε κάθε δειγματοληψία, ενώ υπήρχαν και δύο δείγματα ελέγχου (control). Αφού τα δείγματα ετοιμάστηκαν αναγράφηκε πάνω τους το όνομα της βιο-τασιενεργής ουσίας, η ημέρα της δειγματοληψίας και ο αριθμός επανάληψης, τοποθετήθηκαν σε ειδικό αναδευτήρα (shaker), με σκοπό την προσομοίωση των θαλάσσιων περιβαλλοντικών συνθηκών (κυματισμοί, ρεύματα κ.α.)

3.3 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

3.3.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

1. Ογκομετρικοί κύλινδροι
2. Διαβαθμισμένες γυάλινες φιάλες του 1L
3. Απιονισμένο νερό
4. Χαρτί ζύγισης
5. Ηλεκτρονική Ζυγαριά ακρίβειας 0.1 mg
6. Μαγνητικός Αναδευτήρας
7. Bushnell-Hass medium
8. Marine agar broth
9. Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)
10. Αποστειρωτικός κλίβανος
11. Εργαστηριακός Φούρνος
12. Εργαστηριακός απαγωγός UV
13. Τριβλία
14. Ηλεκτρονικές πιπέτες 20 μ L-200 μ L και 2 μ L-20 μ L
15. Multi Pipettes 5-50 μ L και 20-200 μ L
16. Ανακινήτηρας Vortex
17. Πιπέτες των 2ml και 10 ml
18. Falcons των 25ml
19. Pans (αλουμινένια κεσεδάκια)
20. tips
21. Σωλήνες αραίωσης (dilution tubes)
22. Επωαστικός θάλαμος
23. Ζυγαριά ακριβείας 0.1mg
24. Microtitier MPN plates(96-well)
25. Βαφή INT

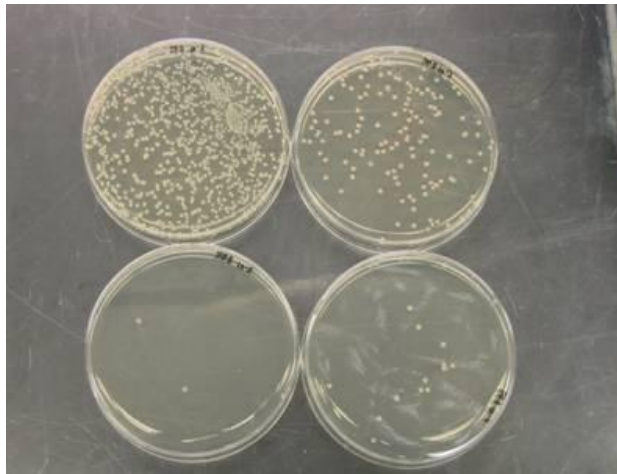
Οι μικροβιολογικές αναλύσεις έγιναν σε πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες. Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν αρχικά στον αποστειρωτικό κλίβανο και στη συνέχεια στον απαγωγό με ακτίνες UV.

3.3.2 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Bushnell – Hass

Για τη δημιουργία μίγματος Bushnell – Hass τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 2L απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια ζυγίζονται στην ηλεκτρονική ζυγαριά 40g χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 6,54g Bushnell – Hass και τοποθετούνται στην ογκομετρική φιάλη, όπου και ανακινούνται. Τέλος, το θρεπτικό μίγμα τοποθετείται στον κλίβανο για αποστείρωση.

3.3.3 Προετοιμασία τριβλίων με marine agar

Σε ογκομετρική φιάλη 1L τοποθετούνται 750ml απιονισμένου νερού. Στην ηλεκτρονική ζυγαριά ζυγίζονται 41.4g Marine Agar και τοποθετούνται στην ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια το θρεπτικό μίγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια οδηγείται στον αποστειρωτικό κλίβανο. Αφού το μίγμα αποστειρωθεί πλήρως, το αφήνουμε να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και γεμίζουμε τα τριβλία (εντός του απαγωγού), τα οποία τοποθετούνται στο ψυγείο.



Εικόνα 3.3.3 Μέθοδος CFU

3.3.4 Μικροβιακή απαρίθμηση

3.3.4.1 Αραιώσεις

Η διαδικασία των αραιώσεων περιλαμβάνει την αραιώση των δειγμάτων με θρεπτικό Bushnell – Hass σε ειδικούς σωλήνες αραιώσης (dilution tubes). Συγκεκριμένα, σε πλήρως αποστειρωμένους σωλήνες αραιώσης τοποθετούνται 9ml Bushnell – Hass, ενώ μόνο στον πρώτο σωλήνα τοποθετείται 1ml δείγματος, το οποίο αναδεύεται. Στη συνέχεια παίρνοντας 1ml από κάθε προηγούμενο σωλήνα και τοποθετώντας στον επόμενο (αραίωση 1:10) διαδοχικά, ολοκληρώνεται η διαδικασία. Στο συγκεκριμένο πείραμα έγιναν 10 διαδοχικές αραιώσεις για κάθε δείγμα (10^{-10} αραιώση).

3.3.4.2 Μέθοδος Most Probable Number (MPN)

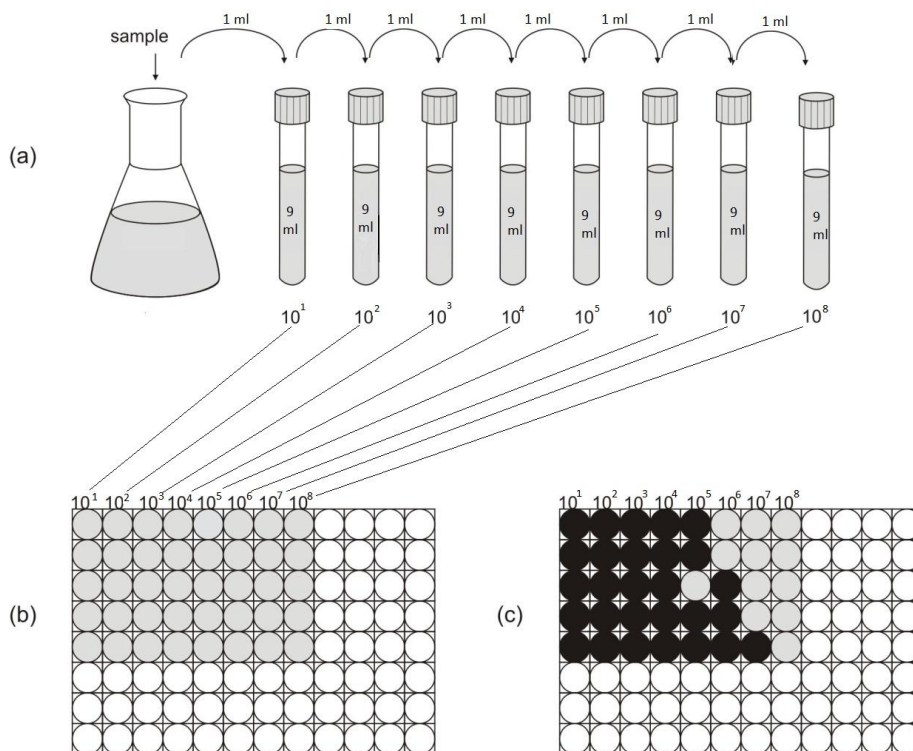
Η μέθοδος αυτή παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα σχετικά με την βιωσιμότητα των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ο προσδιορισμός του πιο πιθανού αριθμού γίνεται με καταγραφή θετικών και αρνητικών πηγαδιών. Ως θετικά καταγράφονται τα πηγαδάκια που παρουσιάζουν μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ ως αρνητικά αυτά που δεν παρουσιάζουν μικροβιακή ανάπτυξη. Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το χρωματισμό τους, καθώς τα θετικά πηγαδάκια παρουσιάζουν ένα κόκκινο-μοβ χρωματισμό. Αφού γίνει η καταγραφή θετικών-αρνητικών πηγαδιών, τα δεδομένα εισάγονται στο πρόγραμμα EPA-MPN calculator, για τον ακριβή υπολογισμό του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων.

Εμβολιασμός 96 microtiter well MPN plates

Σε πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες, σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται:

- 180 μ L Bushnell - Hass
- 5 μ L crude oil
- 20 μ L για καθεμία από τις παραπάνω αραιώσεις (για κάθε αραιώση γίνονται 3 επαναλήψεις).

Αφού ετοιμαστούν, τα πηγαδάκια τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στους 20°C για 14 ημέρες. Μετά το πέρας των 14 ημερών, γίνεται προσθήκη 50 μ L βαφής INT. Έπειτα από μία ημέρα επώασης, τα θετικά πηγαδάκια διακρίνονται λόγω του κόκκινου-μοβ χρωματισμού τους και καταγράφονται.



Εικόνα 3.3.4.2 Διαδικασία μεθόδου MPN

3.3.4.3 Απαρίθμηση μικροβιακού πληθυσμού τριβλίων (Colony Forming Units-CFU)

Η ποσοτική εκτίμηση των βιώσιμων βακτηρίων ή μυκητιακών κυττάρων γίνεται μέσω της μεθόδου Colony Forming Units (CFU). Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή υπολογίζει τον αριθμό των μονάδων σχηματισμού αποικιών των ετερότροφων θαλάσσιων μικροοργανισμών, χωρίς να αναφέρεται σε αριθμό ζωντανών κυττάρων.

Οι μετρήσεις των αποικιών γίνονται σε τριβλία, τα οποία περιέχουν θρεπτικό μέσο marine agar και 100μL δείγματος από τις αραιώσεις που θέλουμε να εξετάσουμε κάθε φορά. Αφού τα τριβλία ετοιμαστούν τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για 4-5 ημέρες και έπειτα γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών των μικροοργανισμών.

3.4 Χημικές Αναλύσεις

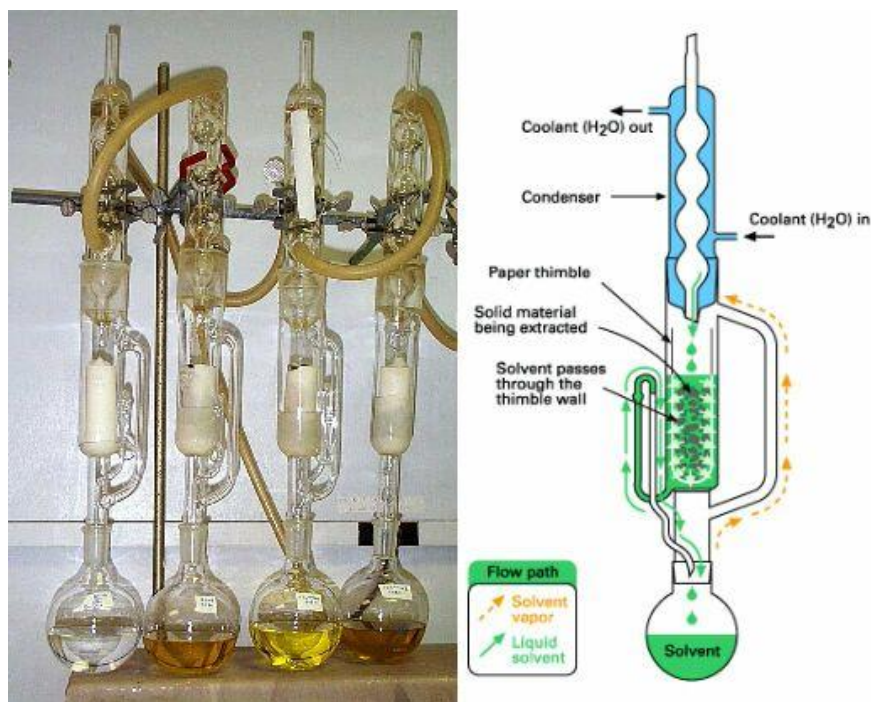
3.4.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

1. Απαγωγός
2. Εκχυλιστήρες Soxhlet
3. Κωνικές φιάλες
4. Σφαιρικές φιάλες
5. Ογκομετρικός κύλινδρος
6. Υαλοβάμβακας
7. Γυάλινες στήλες
8. Διχλωρομεθάνιο (DCM)
9. Θειικό νάτριο
10. Πιπέτες Pasteur
11. Πουάρ
12. Φιαλίδια (vials)
13. Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotorvapor)
14. Αφυγραντήρας κενού
15. Μηχάνημα Αζώτου (Nitrogen Flow)
16. Ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας 0.0001g
17. Εξάνιο (C₆)
18. Στήλες SPE
19. Αέριος Χρωματογράφος-Φασματογράφος Μάζας (GC-MS)

3.4.2 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η διεργασία της εκχύλισης αποτελεί μία από τις συνηθέστερες εργαστηριακές μεθόδους διαχωρισμού ουσιών. Σκοπός της είναι η μεταφορά μιας διαλυμένης ουσίας από ένα διαλύτη σε έναν άλλο (εκχύλιση υγρού-υγρού). Η διαλυμένη ουσία εκχυλίζεται από τον ένα διαλύτη στον άλλο επειδή είναι καλύτερα διαλυτή στον δεύτερο. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση το δείγμα και ο διαλύτης τοποθετούνται σε μία διαχωριστική χοάνη και αναδεύονται, ενώ παράλληλα απελευθερώνονται οι παραγόμενοι ατμοί του διαλύτη. Στη δεύτερη φάση το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία έως ότου γίνει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (περίπου 1 λεπτό) και τελικά στην τρίτη φάση γίνεται ανάκτηση του διαλύτη.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσες μέσω της συσκευής Soxhlet χρησιμοποιώντας ως διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM). Πριν από τη διεργασία της εκχύλισης προστέθηκαν στο δείγμα 50μL ενός πρότυπου διαλύματος ανάκτησης (surrogate recovery standard) συγκέντρωσης 200ppm σε 10-phenanthrene και 5a-androstane, το οποίο αποτελεί ένδειξη του βαθμού αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Στη συνέχεια, με την στρόφιγγα της χοάνης κλειστή, το δείγμα τοποθετείται στη διαχωριστική χοάνη με 25ml DCM. Με προσεκτικές κινήσεις το μίγμα ανακινείται, ενώ παράλληλα ανοίγοντας τη στρόφιγγα απελευθερώνονται οι παραγόμενοι ατμοί του διαλύτη. Με το πέρας των παραπάνω διεργασιών αφήνουμε το μίγμα σε ηρεμία μέχρις ότου να γίνουν διακριτές οι δύο φάσεις. Παράλληλα, προετοιμάζεται η στήλη που θα περάσει το εκχύλισμα, στην οποία τοποθετείται υαλοβάμβακας και ποσότητα θειικού νατρίου (Na_2SO_4) ενεργοποιημένου στους 400°C για 4 ώρες. Αφού όλο το εκχύλισμα περάσει την στήλη θειικού νατρίου, ακολουθεί έκπλυση της στήλης με επιπλέον ποσότητα DCM, με σκοπό την πλήρη ανάκτηση του εκχυλίσματος. Έπειτα, ακολουθεί η τοποθέτηση της σφαιρικής φιάλης που περιέχει το εκχύλισμα σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) για περίπου 15 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μεταφέροντας το εκχύλισμα με χρήση DCM (suprasolve) σε ζυγισμένα φιαλίδια, τα οποία τελικά τοποθετούνται σε ξηραντήρα κενού.



Εικόνα 3.4.2 Συσκευή εκχύλισης Soxhlet

3.4.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων, πριν τη χημική ανάλυση τους στον αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας (GC/MS). Χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και τη δέσμευση ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων από αυτά. Μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης επιλύοντας σημαντικά προβλήματα όπως είναι:

- Η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών,
- Η χρήση και η απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών, εύφλεκτων και τοξικών ουσιών,
- Ο ατελής διαχωρισμός φάσεων.

Επιπλέον, η ταχύτητα στην εφαρμογή και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της, καθιστούν την SPE μια αποτελεσματικότερη μέθοδο εκχύλισης.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, η SPE χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό κορεσμένων και αρωματικών κλασμάτων πετρελαίου. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν DCM για τα αρωματικά και εξάνιο (C_6) για τα κορεσμένα κλάσματα. Πριν την έναρξη της εκχύλισης τοποθετούνται 5-10mg δειγμάτων σε φιαλίδια και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά 1ml εξανίου. Αφού προετοιμαστούν τα δείγματα, ακολουθεί έκπλυση της συσκευής SPE, αρχικά με DCM και στη συνέχεια με εξάνιο. Η συσκευή SPE αποτελείται από 12 στήλες (μία για κάθε δείγμα), οι οποίες προσομοιώνονται με 2ml C_6 προτού τα δείγματα τοποθετηθούν σε αυτές. Με την προσθήκη των δειγμάτων στις στήλες ξεκινάει η διαδικασία της

εκχύλισης. Όταν τα δείγματα περάσουν τις στήλες γίνεται τοποθέτηση 4ml C₆ σε κάθε στήλη για την ανάκτηση των κορεσμένων κλασμάτων. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη 4ml DCM σε κάθε στήλη με σκοπό την ανάκτηση και των αρωματικών κλασμάτων των δειγμάτων. Τόσο οι αρωματικοί όσο και οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες συγκεντρώνονται σε φιαλίδια και αφήνονται να εξατμιστούν. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη μεταφορά των δύο κλασμάτων σε προζυγισμένα φιαλίδια, τα οποία τοποθετούνται σε ξηραντήρα κενού, ενώ ζυγίζονται ξανά πριν οδηγηθούν στη συσκευή Αέριου Χρωματογράφου – Φασματογράφου Μάζας (GC/MS) για χημική ανάλυση.



Εικόνα 3.4.3 Συσκευή SPE

3.4.4 Αέρια Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μάζας (GC/MS)

Η αέρια χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (GC/MS) είναι μία σύζευξη δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία (GC) διαχωρίζει τα συστατικά ενός χημικού δείγματος αποτελεσματικά και το φασματόμετρο μάζας (MS) παρέχει τις πληροφορίες που βοηθούν στην αναγνώριση της δομής κάθε συστατικού. Πρόκειται για μία αρκετά αξιόπιστη τεχνική ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση πετρελαιοειδών λόγω του μεγάλου αριθμού συστατικών που περιέχουν και της δυσκολίας χρωματογραφικού διαχωρισμού τους. Σκοπός της χημικής ανάλυσης είναι η τεκμηρίωση και η αξιολόγηση του βαθμού αποδόμησης δειγμάτων πετρελαίου.

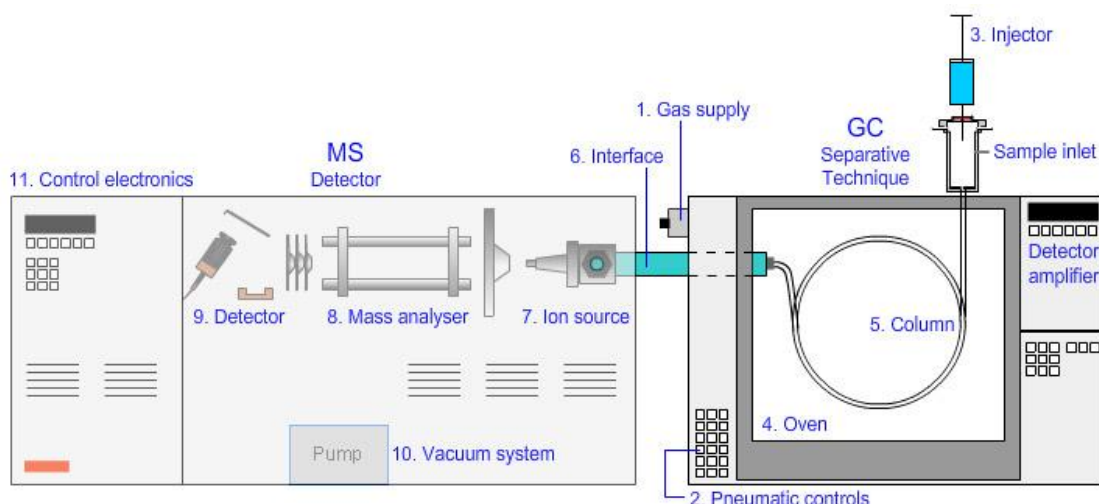
Οργανολογία αέριου χρωματογράφου (Gas Chromatography)

Η βασική αρχή ενός αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνει την πτητικότητα του δείγματος σε ένα θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής (injector), το διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος σε μία ειδική στήλη με βάση το χρόνο και την ανίχνευση κάθε συστατικού από έναν ανιχνευτή. Ένα σημαντικό τμήμα του αέριου χρωματογράφου είναι η χρήση ενός φέροντος αερίου (carrier gas), όπως το υδρογόνο, το ήλιο, το αργό ή το άζωτο, που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του δείγματος διαμέσου της στήλης. Το φέρον αέριο δεν πρέπει να αντιδρά με το δείγμα ή τη στήλη, προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα.

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται στην κορυφή της στήλης συνήθως με μικροσύριγγα διαμέσου ενός ελαστικού διαφράγματος. Το στόμιο εισαγωγής πρέπει να διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία προκειμένου το δείγμα να εξατμίζεται αμέσως. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά το μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών χρόνων που απαιτεί το κάθε συστατικό για να διανύσει την απόσταση από το ένα άκρο της στήλης στο άλλο. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της ένεσης και της έκλουσης ονομάζεται *χρόνος κατακράτησης (retention time)*. Ο χρόνος κατακράτησης μπορεί να οδηγήσει στη διάκριση ορισμένων ενώσεων, ωστόσο δεν αποτελεί αξιόπιστο παράγοντα για την ταυτοποίηση ενώσεων. Τέλος, όταν τα κλάσματα φτάσουν στον ανιχνευτή, τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό ή οδηγούνται σε υπολογιστή.

Οργανολογία Φασματομέτρου Μαζών (MS)

Η ανάλυση με φασματομετρία μάζας περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: εξαέρωση δείγματος, δημιουργία ιόντων (συνήθως θετικών), διαχωρισμό ιόντων με βάση τον λόγο μάζας/φορτίου (m/z), όπου m είναι η μάζα του ιόντος σε ατομικές μονάδες και z το φορτίο του και μέτρηση του ρεύματος των ιόντων που παράγεται όταν προσπίπτει σε κατάλληλο μεταλλάκτη. Όλοι οι τύποι φασματομέτρων μαζών αποτελούνται από ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, μία πηγή ιόντων, έναν μοριακό επιταχυντή και έναν ανιχνευτή. Ο ρόλος του σημείου εισόδου είναι η εισαγωγή μικροποσότητας δείγματος στην πηγή ιόντων με σταθερή ροή σε αέρια κατάσταση. Για το λόγο αυτό η θερμοκρασία στο σημείο εισόδου θα πρέπει να είναι υψηλή (400°C). Στη συνέχεια το δείγμα οδηγείται στην πηγή ιονισμού, όπου παράγονται ιόντα εξαιτίας της πρόσκρουσης των μορίων του δείγματος με ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται σε υψηλή τάση. Τα μόρια του δείγματος συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια υψηλής τάσης δημιουργώντας θραύσματα, τα οποία συνεχίζουν να κινούνται ως μεμονωμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά οδηγούνται σε ένα μαγνητικό πεδίο μεταβαλλόμενης τάσης, όπου για κάθε τιμή τάσης, μόνο μία μάζα μπορεί να επιταχυνθεί ώστε να φτάσει στον ανιχνευτή. Η τάση του πεδίου μεταβάλλεται προκειμένου ένα ευρύ φάσμα μαζών να καταλήξει στον ανιχνευτή. Τέλος, ο ανιχνευτής μετρά και καταγράφει ηλεκτρονικά την μάζα των σωματιδίων.



Εικόνα 3.4.4 Διάταξη αέριου χρωματογράφου/φασματομέτρου μάζας (GC/MS)

Διαδικασία ανάλυσης GC/MS

Η GC/MS ανάλυση διεξάγεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία:

- Στα φιαλίδια που περιέχουν τα κορεσμένα (F1) και αρωματικά (F2) κλάσματα, προστίθεται 1ml C₆ και 1ml DCM, αντίστοιχα.
- Στα παραπάνω διαλύματα προστίθενται 5μl από το διάλυμα των εσωτερικών προτύπων συγκέντρωσης 200 ppm. Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 1ppm. Αυτό το διάλυμα περιέχει τέσσερα δευτεριωμένα συστατικά: d8-naphthalene, d10-anthracene, d12-chrysene και d12-perylene.
- Ένα τυφλό δείγμα και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων.
- Οι απαραίτητες πληροφορίες (όνομα, ποσότητα, συνθήκες, κ.α.) σε σχέση με το δείγμα που εισάγεται κάθε φορά προς ανάλυση περιγράφονται στο acquisition form του προγράμματος του αέριου χρωματογράφου.
- Το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 1 ppm αντί 40 ppm. Έτσι αποκτάται μια καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4.4 πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 1, 5, 10, 25 και 50 ppm. Η βαθμονόμηση των 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο μίγμα συστατικών για να προσδιοριστούν οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης (RRFs) για κάθε αναλυτή. Το πρότυπο μίγμα (εκτός του βιοδείκτη) για την καμπύλη βαθμονόμησης αποκτήθηκε από την Absolute Standards, Inc. Οι βιοδείκτες C3017β(H),21α(H)-hopane και C3017α(H),21β(H)hopane που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την Chiron.
- Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RRF = (A_x \times C_{is}) / (C_x \times A_{is}) \text{ όπου:}$$

RRF = Σχετικός συντελεστής απόκρισης

A_x = Το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται (αναλυτή),

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

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

C_{is} = Συγκέντρωση του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου (1 ng/μl). (Αυτή η συγκέντρωση

- Αναγνωρίζεται κάθε αναλύτης βασιζόμενοι στη integrated abundance από το πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν.
- Ποσοτικοποιείται ο κάθε αναλύτης χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αυτό που έχει χρόνο έκλουσης κοντά στον δοσμένο αναλυτή είναι σταθερή στην εξίσωση για την καμπύλη βαθμονόμησης.)

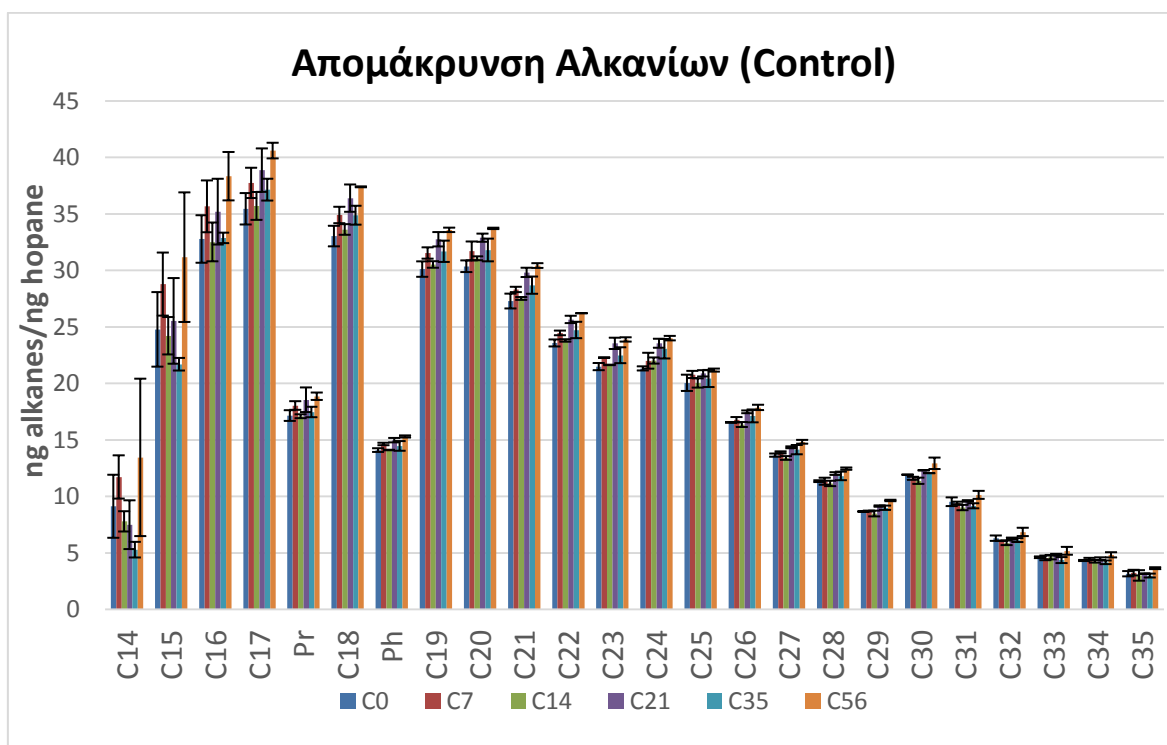
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των χημικών και μικροβιολογικών μετρήσεων για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων, προέκυψαν έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων του αέριου χρωματογράφου/φασματομέτρου μάζας (GC/MS) μέσω του προγράμματος Agilent Chemstation Data Browser, ενώ για τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων (MPN) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα EPA-MPN. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται παρακάτω σε διαγράμματα Excel.

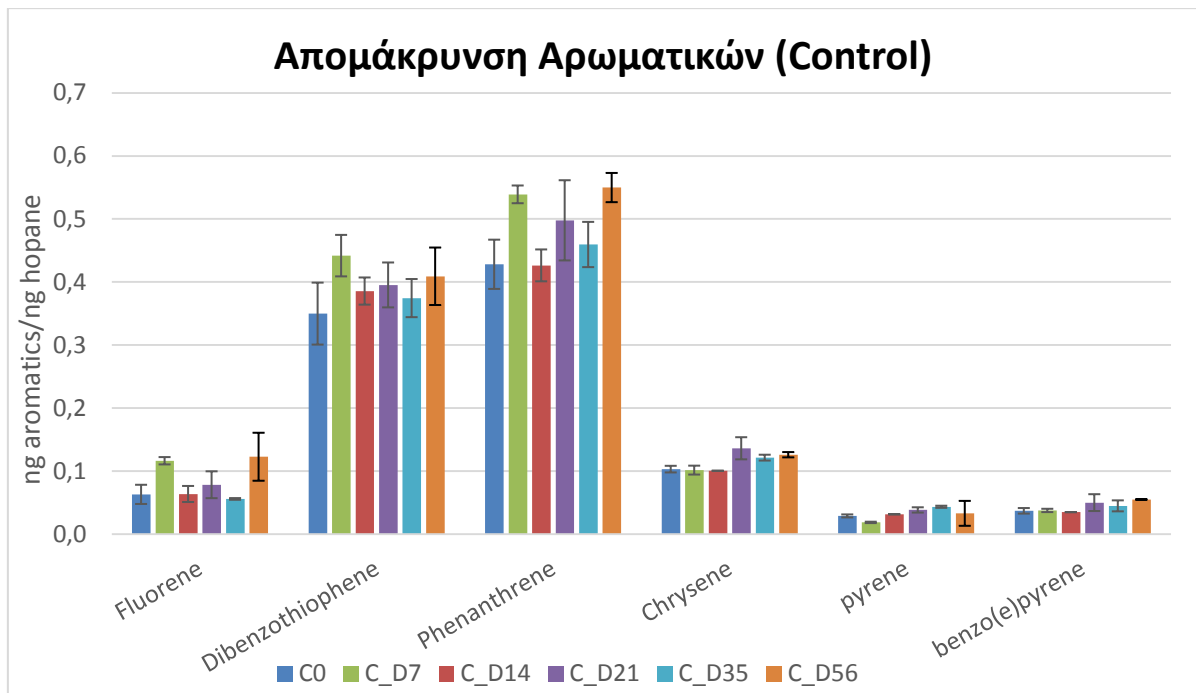
4.1 Δείγμα Control

4.1.1 GC/MS Ανάλυση



Διάγραμμα 4.1.1α Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος Control

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των αλκανίων για το δείγμα Control. Όπως παρατηρείται δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να συμπεραίνουμε ότι δεν υπήρξε αποδόμηση των αλκανίων από τους μικροοργανισμούς για το συγκεκριμένο δείγμα.



Διάγραμμα 4.1.1β Συγκεντρώσεις Αρωματικών δείγματος Control

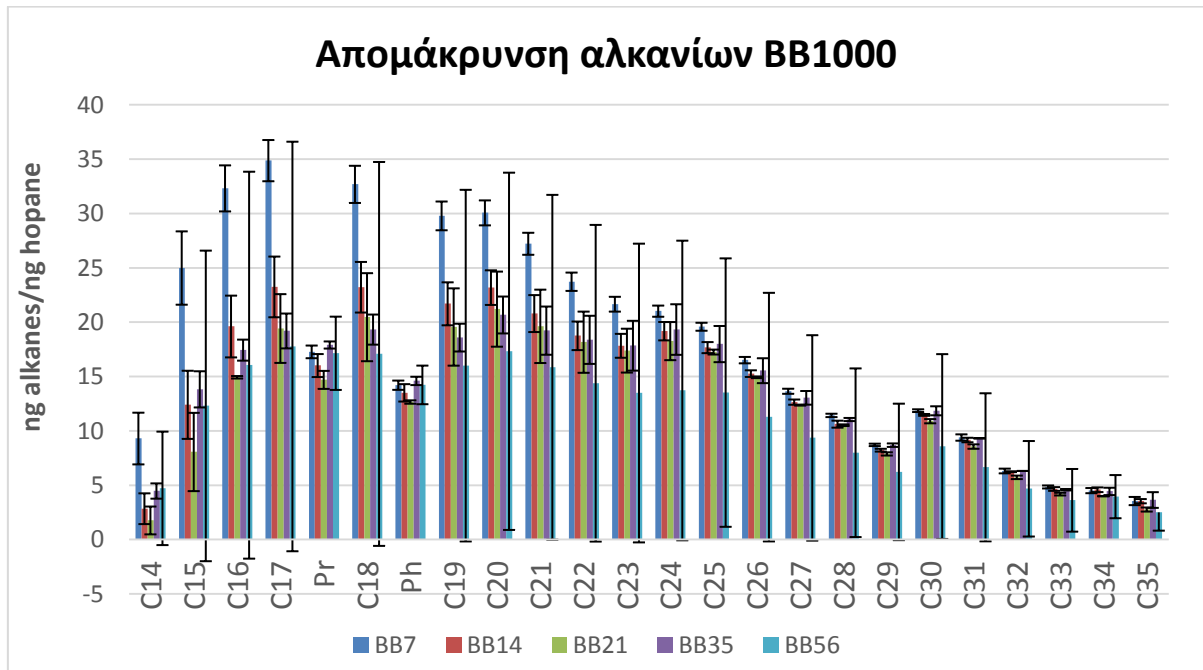
Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των αρωματικών για το δείγμα control. Όπως και στα αλκάνια έτσι κι εδώ δεν παρουσιάζεται κάποια αξιόλογη μεταβολή των συγκεντρώσεων.

4.1.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

Για την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Colony Forming Units (CFU) και Most Probable Number (MPN). Η πρώτη μέθοδος πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απαρίθμηση των συνολικά αναπτυσσόμενων μικροβιακών αποικιών και η δεύτερη για τον εντοπισμό των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να αποδομούν τους πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες. Παρόλα αυτά σε καμία από τις δύο μεθόδους δεν είχαμε κάποιο θετικό αποτέλεσμα για το συγκεκριμένο δείγμα (Control), καθώς δεν υπήρξε καμία ένδειξη ανάπτυξης μικροοργανισμών. Αυτός είναι και ο λόγος που δεν υπήρξε καμία μεταβολή στις συγκεντρώσεις τόσο των αλκανίων όσο και των αρωματικών στα παραπάνω διαγράμματα.

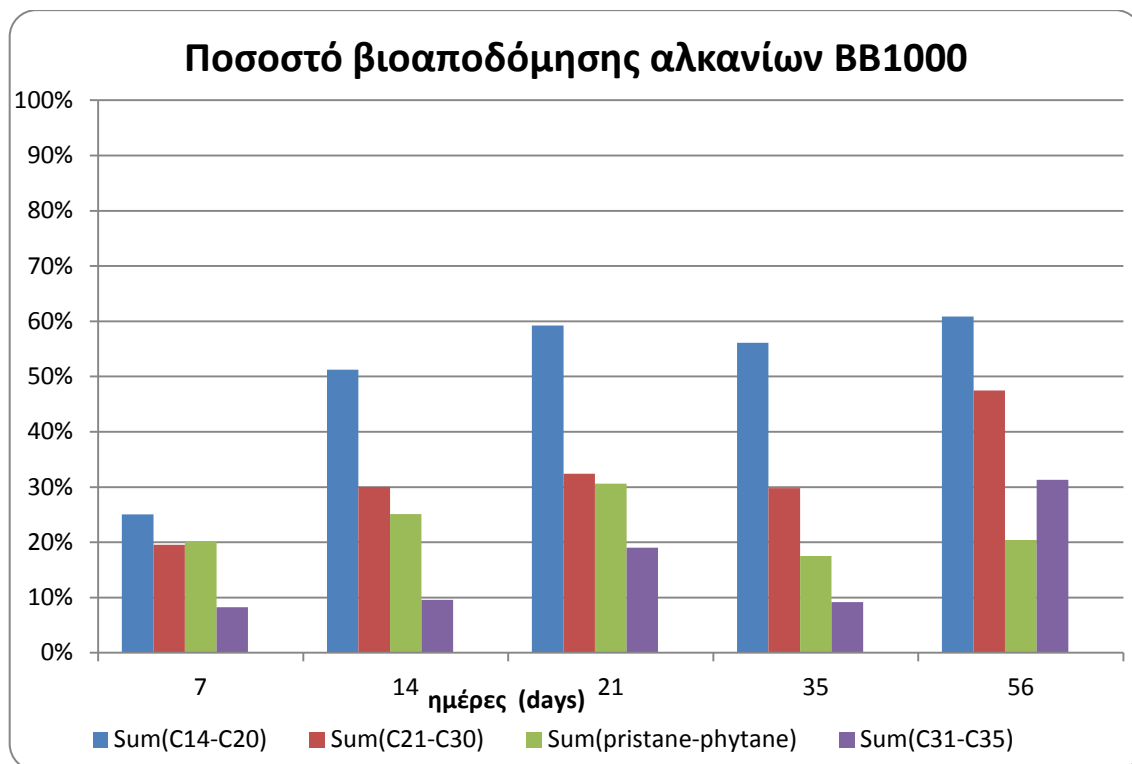
4.2 Δείγμα BB1000

4.2.1 GC/MS Ανάλυση

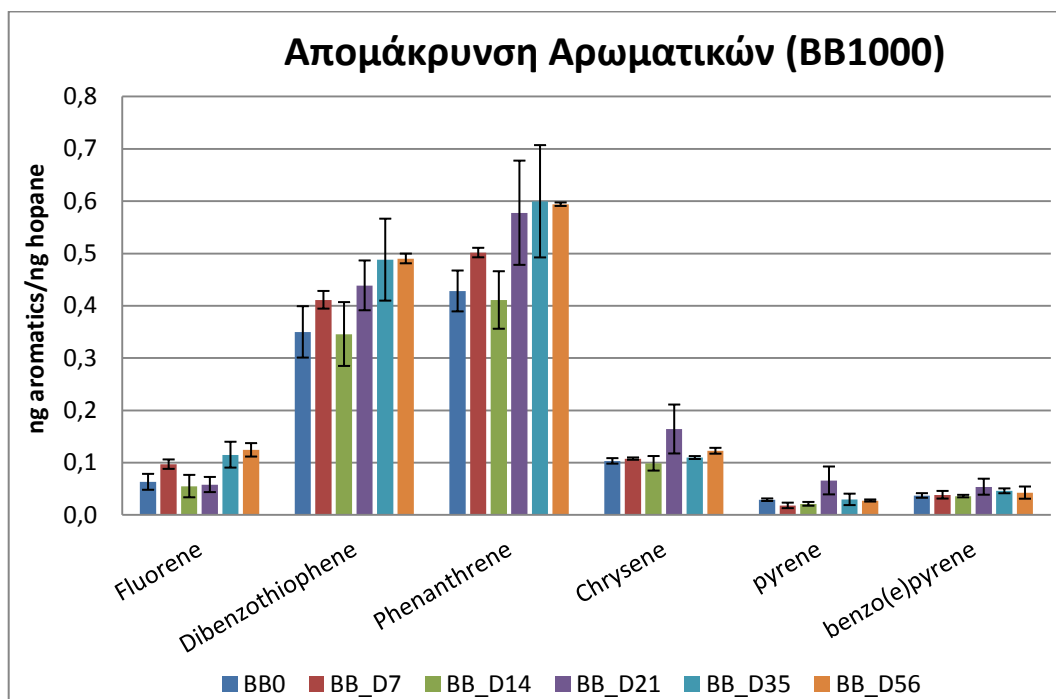


Διάγραμμα 4.1.1α Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος BB1000

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των αλκανίων του δείγματος BB1000. Όπως παρατηρούμε, στο συγκεκριμένο δείγμα υπάρχει μεγάλη μείωση των συγκεντρώσεων που αφορούν τα ελαφριά συστατικά (C14-C20), ενώ μικρότερα ποσοστά απομάκρυνσης παρατηρούνται στα μεσαία συστατικά (C20-C30). Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των βαρέων συστατικών (C30-C35), οι μεταβολές είναι αμελητέες.



Διάγραμμα 4.1.1β Ποσοστιαία βιοαποδόμηση Αλκανίων δείγματος BB1000

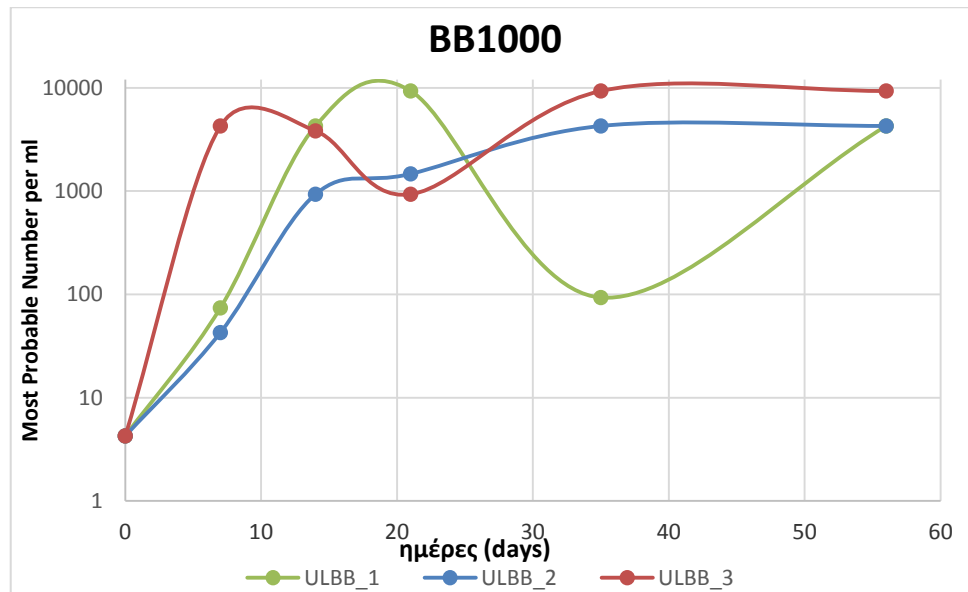


Διάγραμμα 4.1.1γ Συγκεντρώσεις Αρωματικών δείγματος BB1000

Από το παραπάνω διάγραμμα δεν προκύπτει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην απομάκρυνση των αρωματικών του δείγματος BB1000. Με εξαίρεση κάποιες μικρές αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων, το αρωματικό κλάσμα παραμένει αμετάβλητο καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμών.

4.2.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

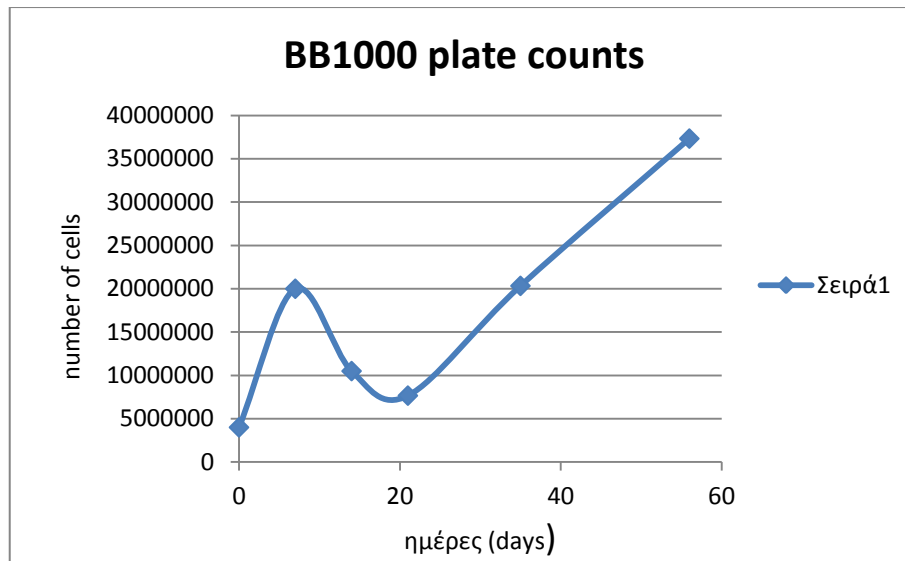
- Μέθοδος MPN (*Most Probable Number*)



Διάγραμμα 4.2.2α Μικροβιακή ανάπτυξη βιοαποικοδομητών δείγματος BB1000

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η μικροβιακή ανάπτυξη των βιοαποικοδομητών των τριών δειγμάτων BB1000 όπως προέκυψε από το πρόγραμμα της EPA.

- Μέθοδος CFU (Colony Forming Units)

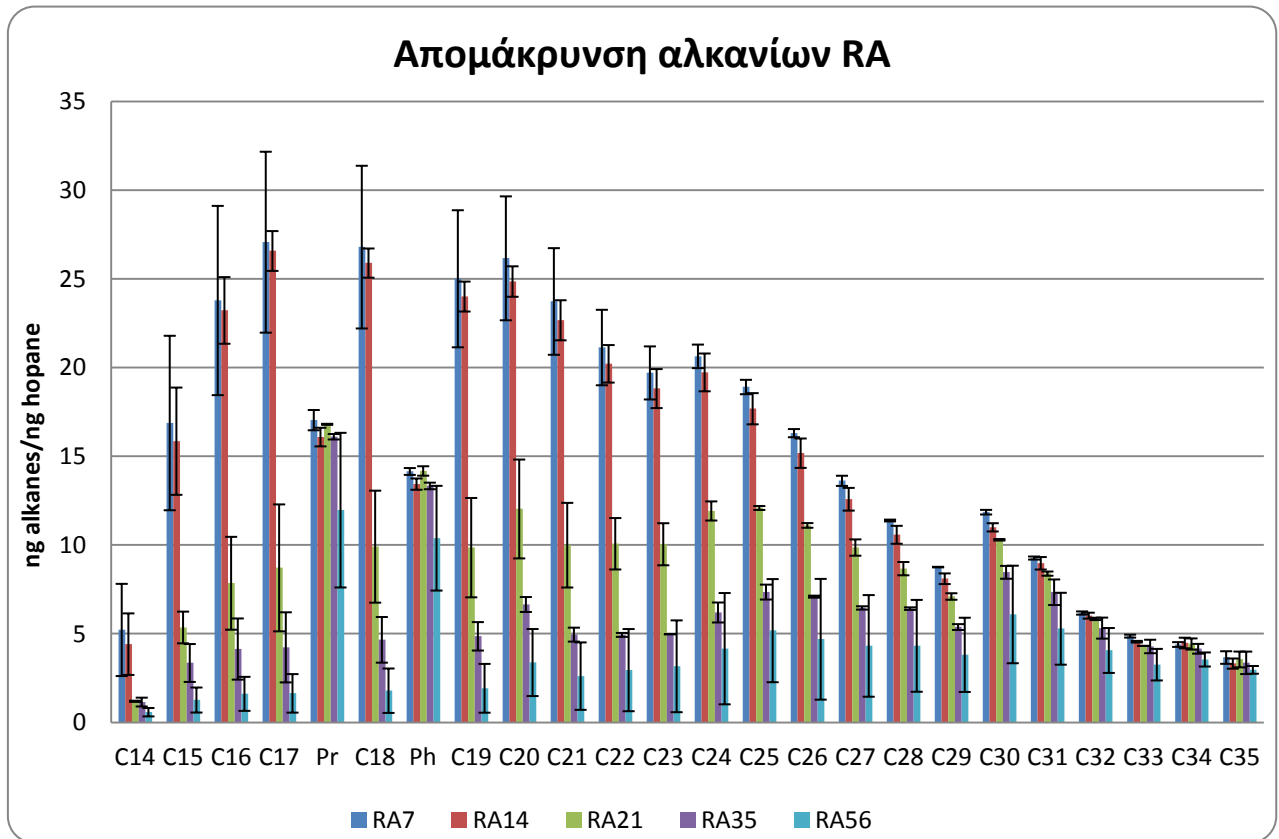


Διάγραμμα 4.2.2β Καταμέτρηση μικροβιακών αποικιών σε τριβλία για το δείγμα BB1000

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η συνολική μικροβιακή ανάπτυξη για το δείγμα BB1000, όπως προέκυψε από τη μέθοδο CFU. Κατά τη διάρκεια των 7 πρώτων ημερών του πειράματος, υπήρξε αύξηση του αριθμού των μικροβιακών αποικιών. Στη συνέχεια, έως και το χρονικό διάστημα των 21 ημερών ο μικροβιακός πληθυσμός μειώθηκε, ενώ από τις 21 ημέρες και μέχρι το πέρας του πειράματος υπήρξε έντονη μικροβιακή ανάπτυξη.

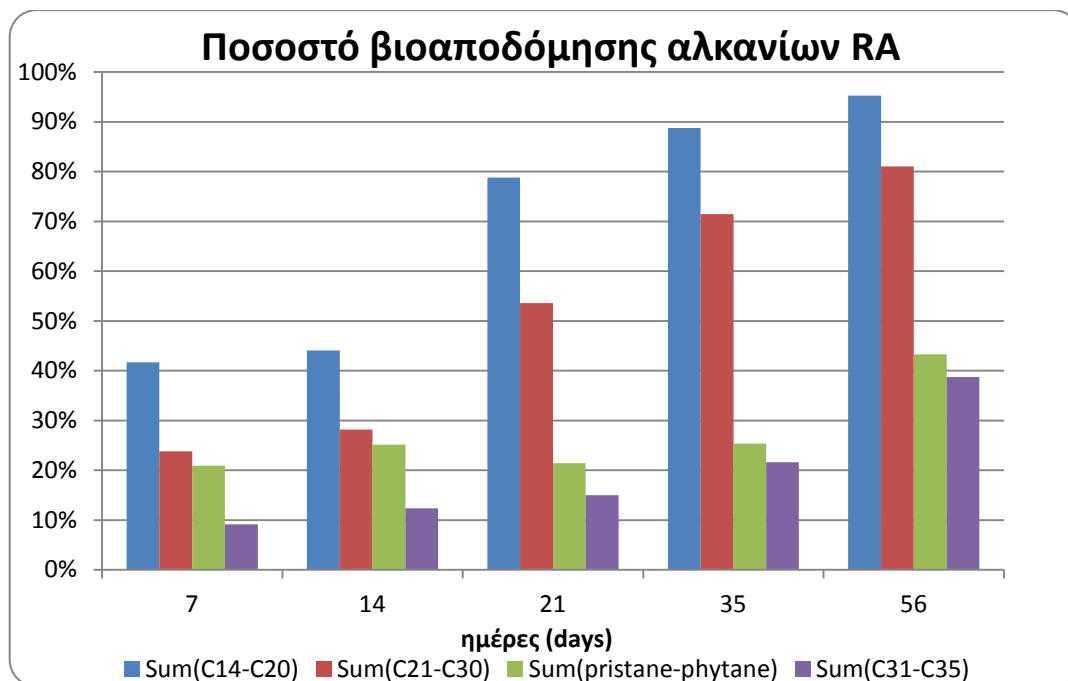
4.3 Δείγμα RA

4.3.1 GC/MS Ανάλυση

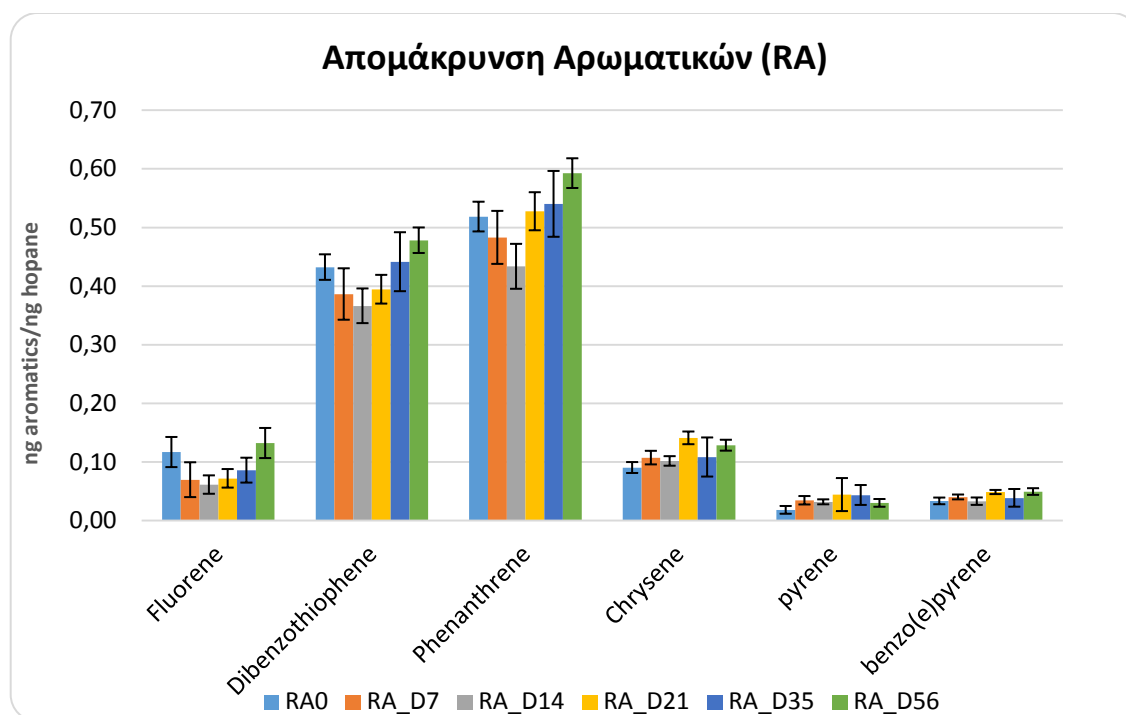


Διάγραμμα 4.3.1α Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος RA

Στο παραπάνω διάγραμμα του δείγματος RA, διαπιστώνεται μείωση της συγκέντρωσης των αλκανίων σε μεγαλύτερο βαθμό για τα ελαφριά (C14-C20) αλλά και τα μεσαία συστατικά (C21-C30), ενώ μικρότερη είναι η μείωση για τα βαριά συστατικά (C31-C35). Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά το ποσοστό αποδόμησης των αλκανίων, το οποίο ξεπερνά το 90% για τα ελαφριά και το 80% για τα μεσαία συστατικά.



Διάγραμμα 4.3.1β Ποσοστιαία βιοαποδόμηση Αλκανίων δείγματος RA

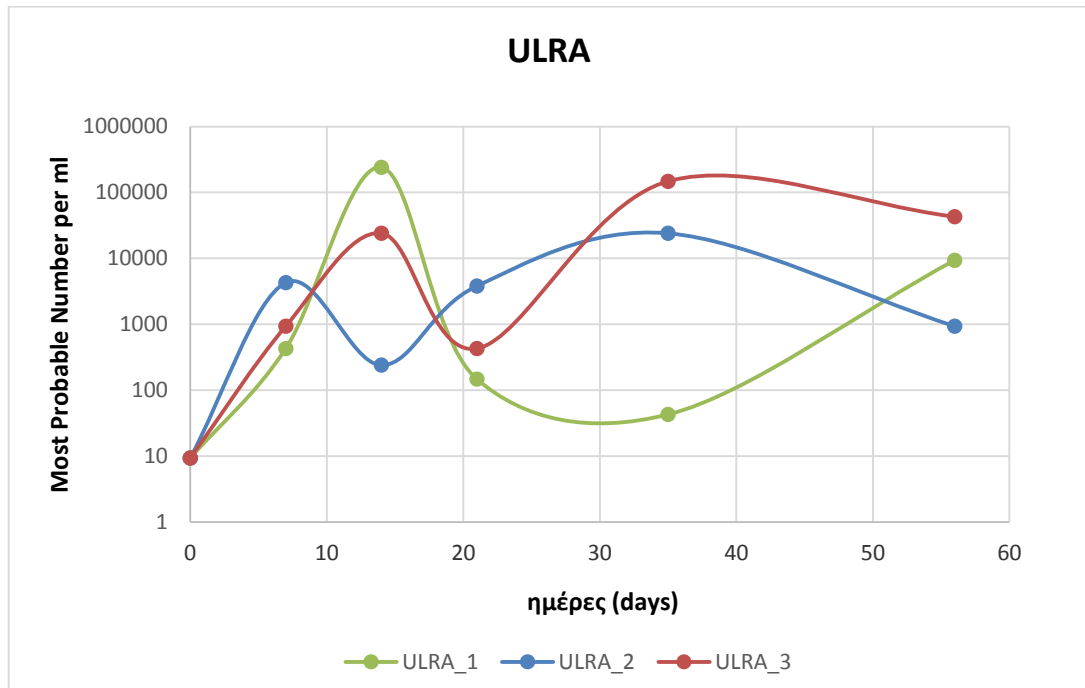


Διάγραμμα 4.3.1γ Συγκεντρώσεις αρωματικών δείγματος RA

Ελάχιστες διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις των αρωματικών του δείγματος RA, άρα ούτε σε αυτήν την περίπτωση δεν έχουμε αποδόμηση του αρωματικού κλάσματος από τους μικροοργανισμούς.

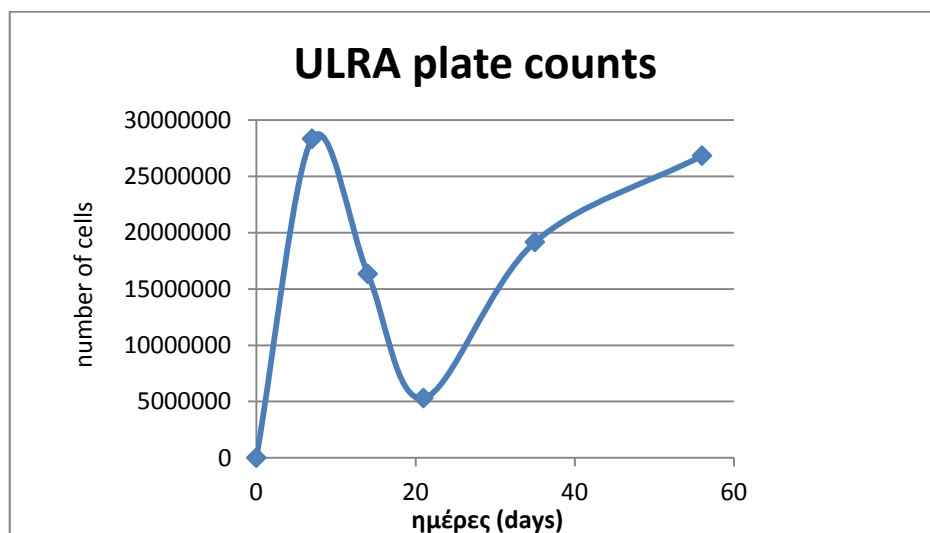
4.3.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

- Μέθοδος MPN



Διάγραμμα 4.3.2α Μικροβιακή ανάπτυξη βιοαποικοδομητών δείγματος RA

- Μέθοδος CFU

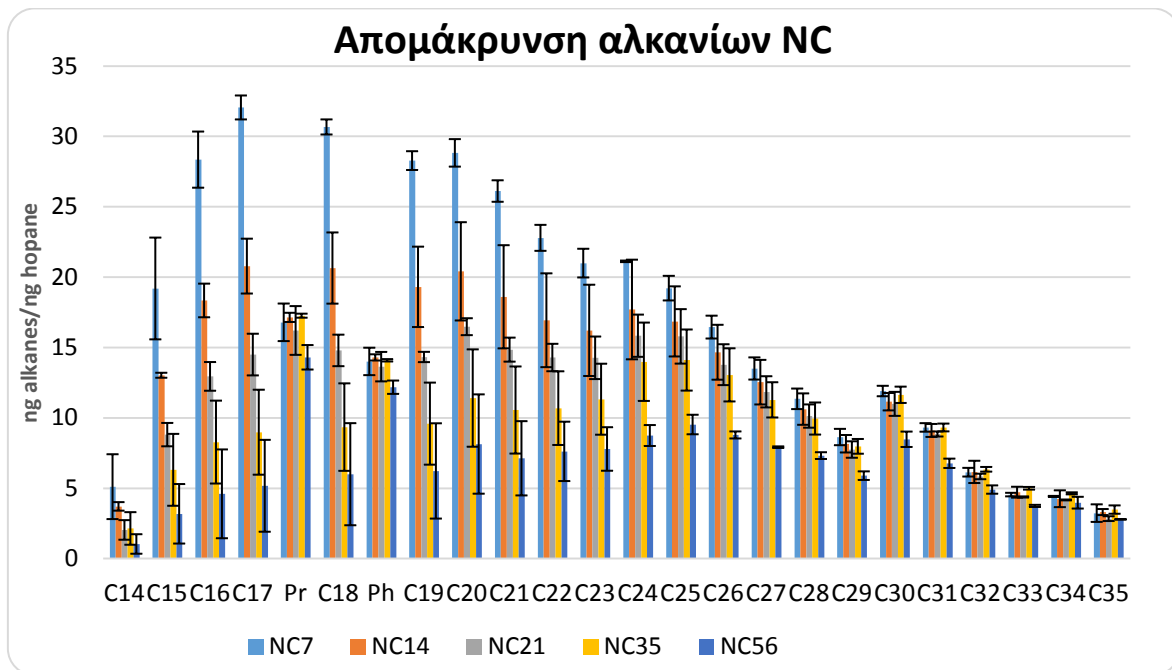


Διάγραμμα 4.3.2β Καταμέτρηση μικροβιακών αποικιών δείγματος RA

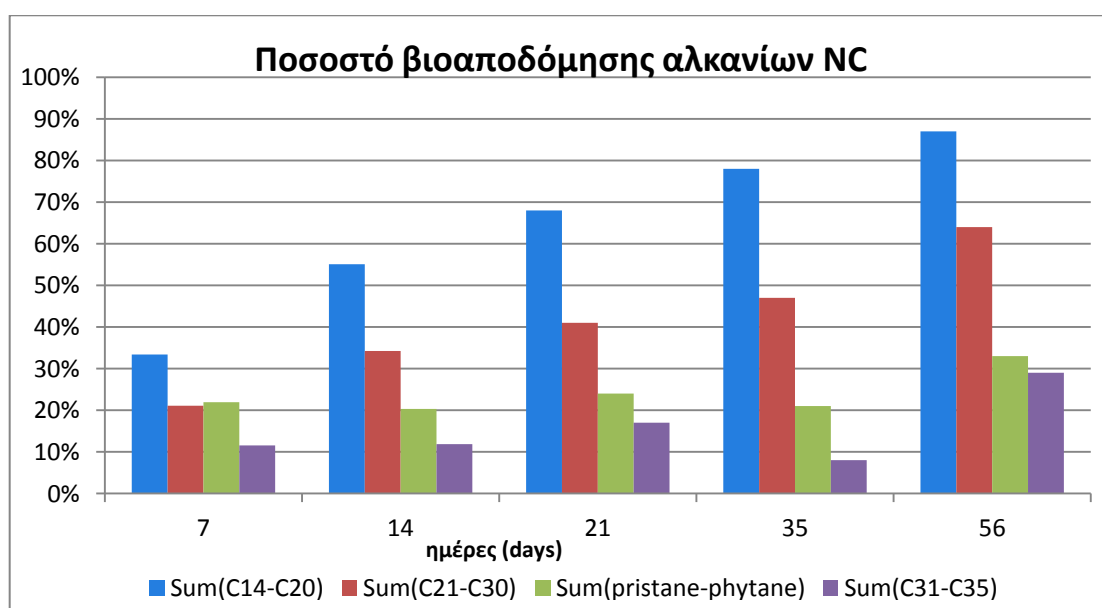
Από τα παραπάνω διαγράμματα που αφορούν τις μικροβιολογικές αναλύσεις του δείγματος RA, προκύπτει ότι στο συγκεκριμένο δείγμα η μικροβιακή ανάπτυξη ήταν εντονότερη σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα, επιβεβαιώνοντας τα υψηλά ποσοστά αποδόμησης των αλκανίων του δείγματος.

4.4 Δείγμα NC

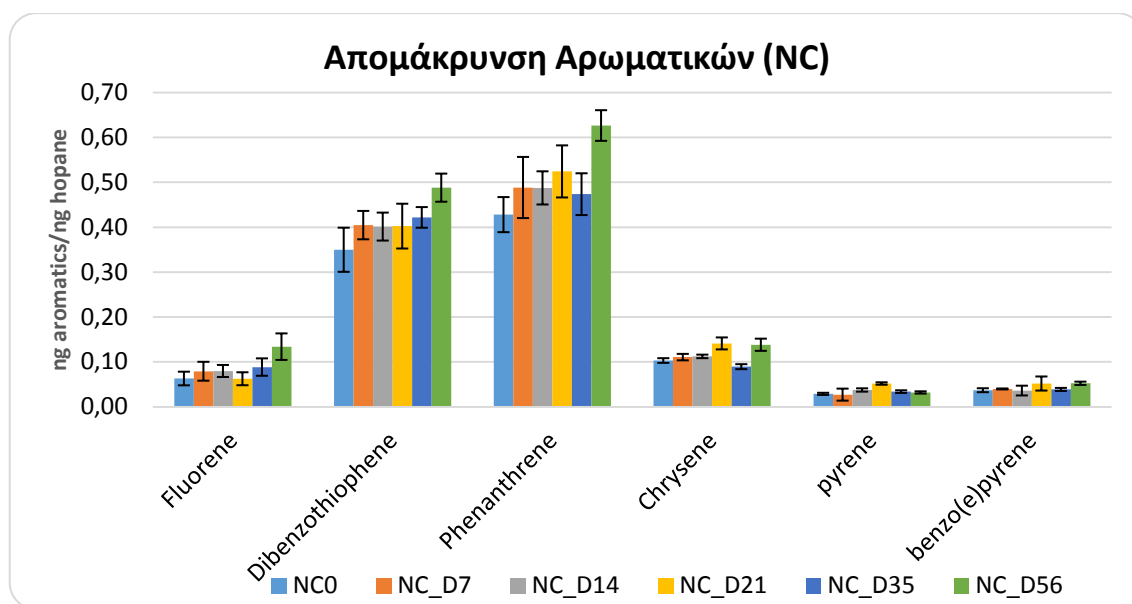
4.4.1 GC/MS Ανάλυση



Διάγραμμα 4.4.1α Συγκεντρώσεις Αλκανίων δείγματος NC



Διάγραμμα 4.4.1β Ποσοστιαία βιοαποδόμηση Αλκανίων δείγματος NC

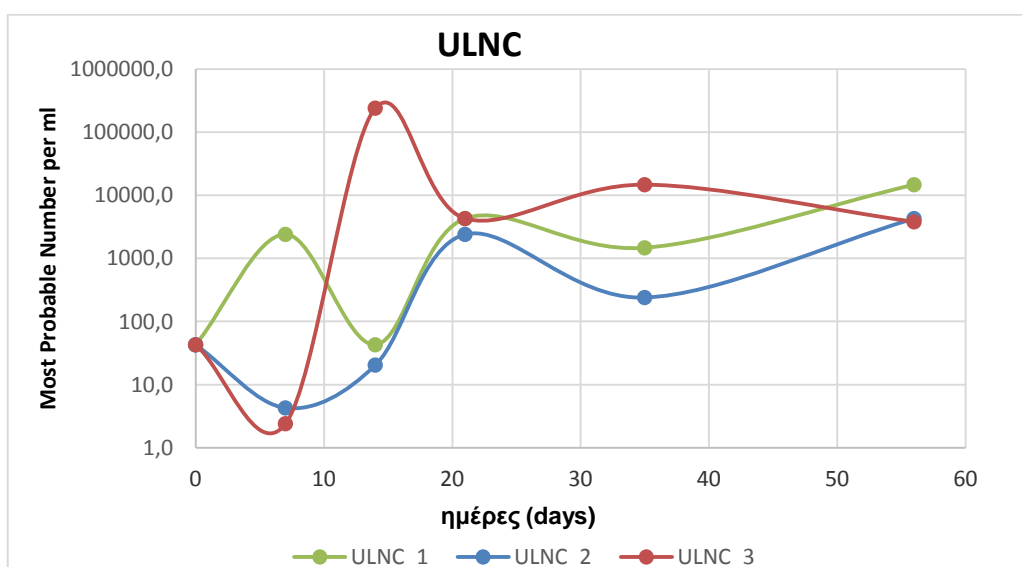


Διάγραμμα 4.4.1γ Συγκεντρώσεις αρωματικών δείγματος NC

Όπως και στα άλλα δύο δείγματα, έτσι κι εδώ παρατηρείται μείωση της συκέντρωσης των αλκανίων κυρίως για τα ελαφριά και τα μεσαία συστατικά πετρελαίου. Στα ελαφριά συστατικά το ποσοστό αποδόμησης φτάνει το 87%, ενώ στα μεσαία το 64%. Μικρότερο ποσοστό αποδόμησης αλκανίων έχουμε στα βαριά συστατικά υδρογονανθράκων (29%). Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των αρωματικών του δείγματος NC δεν είχαμε κάποια αξιόλογη μεταβολή.

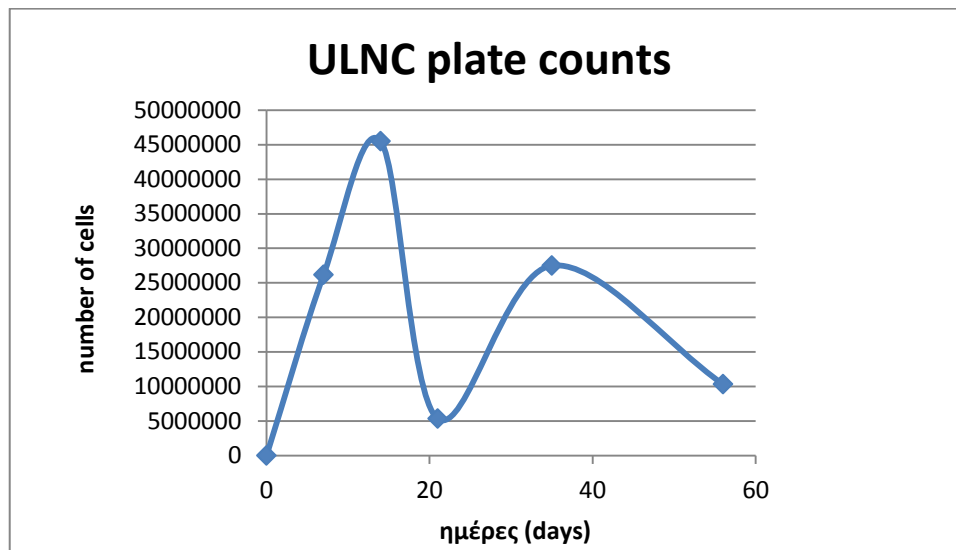
4.4.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

- Μέθοδος MPN



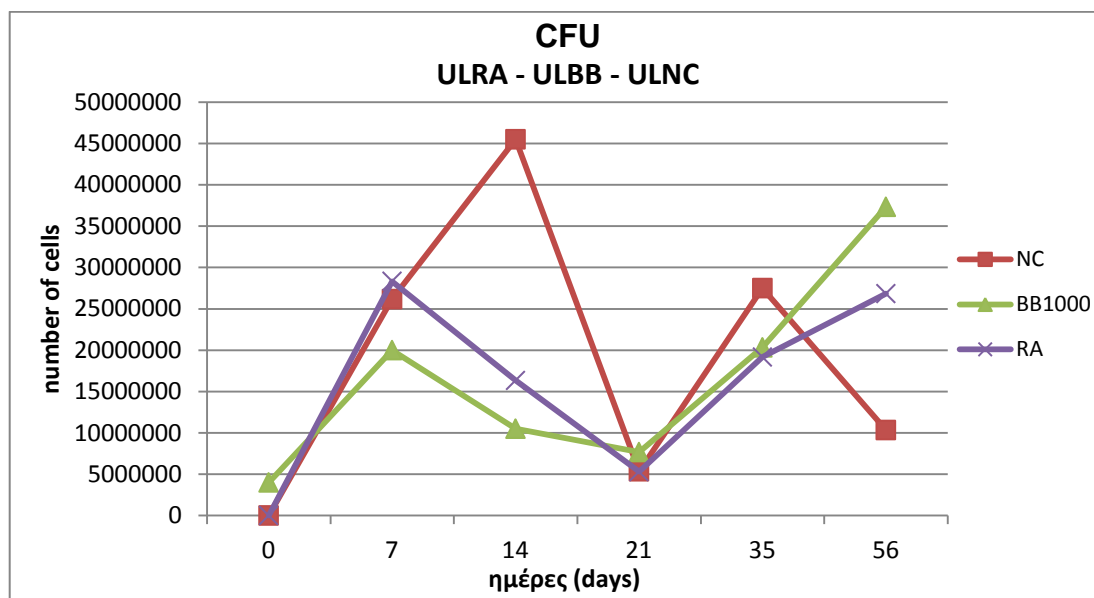
Διάγραμμα 4.4.2α Μικροβιακή ανάπτυξη βιοαποικοδομητών δείγματος NC

- Μέθοδος CFU

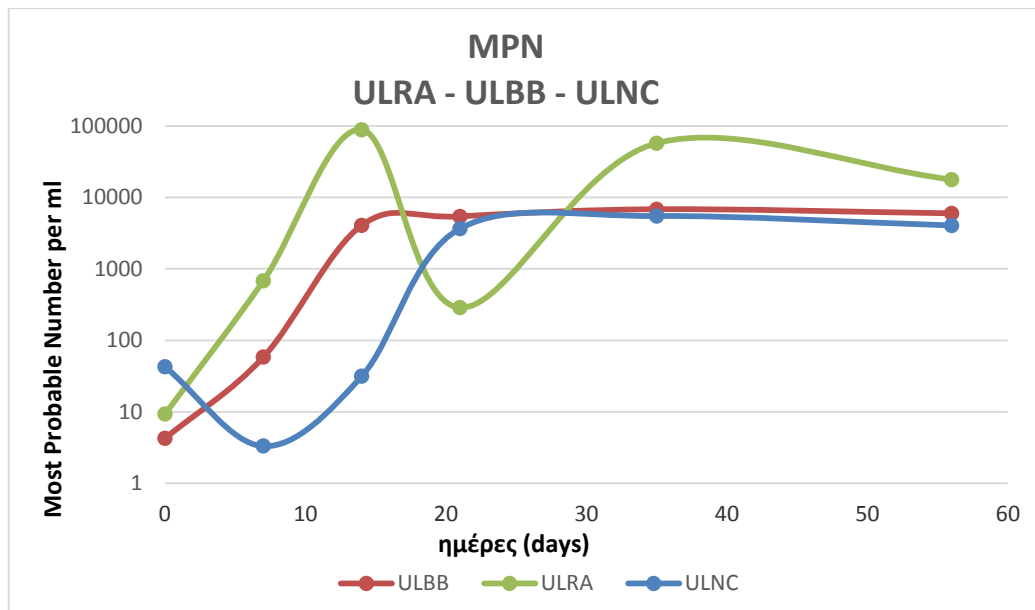


Διάγραμμα 4.4.2β Καταμέτρηση μικροβιακών αποικιών δείγματος NC

4.5 Συγκεντρωτικά μικροβιολογικά αποτελέσματα δειγμάτων



4.5α Συγκεντρωτικά αποτελέσματα CFU και για τα τρία δείγματα



4.5β Συγκεντρωτικά αποτελέσματα MPN και για τα τρία δείγματα

Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζονται τα μικροβιολογικά αποτελέσματα με τους μέσους όρους και των τριών δειγμάτων αναλυτικά όπως προέκυψαν από τις μεθόδους CFU και MPN. Στο 4.5α διάγραμμα που αφορά τη μέθοδο CFU, τα δείγματα BB1000 και RA παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ το δείγμα NC παρουσιάζει διαφορές με τα άλλα δύο δείγματα την 14^η και την 56^η ημέρα του πειράματος. Στο 4.5β διάγραμμα που αφορά τη μέθοδο MPN, τα δείγματα παρουσιάζουν μικρές διαφορές στις τιμές τους, με το δείγμα RA να έχει υψηλότερες τιμές σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

4.6 Συμπεράσματα

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η επίδραση της χρήσης λιπόφιλων φυσικών λιπασμάτων (ουρικό οξύ και λεκιθίνη) , όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους στην αποδόμηση υδρογονανθράκων ακατέργαστου πετρελαίου (crude oil) σε θαλάσσιο περιβάλλον, σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προέλευσης (Rahmholipids, BB1000, New Cherry). Το πείραμα διήρκησε 56 ημέρες και περιλάμβανε χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις. Οι χημικές έγιναν με σκοπό τον υπολογισμό της αποδόμησης των κορεσμένων και των αρωματικών κλασμάτων του πετρελαίου, ενώ οι μικροβιολογικές αφορούσαν την μικροβιακή ανάπτυξη των αποικοδομητών στα δείγματα.

Control: Στο δείγμα Control, το οποίο αποτελούνταν από θαλασσινό νερό και ακατέργαστο πετρέλαιο (crude oil), δεν υπήρξε αποδόμηση τόσο για τα κορεσμένα όσο και για τα αρωματικά κλάσματα του πετρελαίου. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις του δείγματος, δικαιολογούν το αποτέλεσμα αυτό, καθώς σε καμία από τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν (MPN και CFU) δεν υπήρξε ένδειξη ανάπτυξης μικροοργανισμών στα δείγματα.

ULBB1000: Σε αυτό το δείγμα υπήρξε αποδόμηση στα αλκάνια, κυρίως όσον αφορά τα ελαφριά και τα μεσαία συστατικά με ποσοστό 61% και 47% αντίστοιχα. Αντίθετα, στις συγκεντρώσεις των αρωματικών κλασμάτων δεν υπήρξε καμία σημαντική μεταβολή. Σχετικά με τις μικροβιολογικές αναλύσεις, υπήρξε συνεχής αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

ULRA: Στο δείγμα αυτό είχαμε πραγματοποιηθεί η μεγαλύτερη ποσοστιαία βιοαποδόμηση των κορεσμένων υδρογονανθράκων, φτάνοντας το 95% για τα ελαφριά, το 81% για τα μεσαία και το 39% για τα βαριά συστατικά. Ούτε σε αυτό το δείγμα δεν υπήρξε αποδόμηση στα αρωματικά. Το πολύ υψηλό ποσοστό αποδόμησης δικαιολογείται από την έντονη μικροβιακή ανάπτυξη που υπήρξε στο συγκεκριμένο δείγμα.

ULNC: Το συγκεκριμένο δείγμα ήταν το δεύτερο σε σειρά (μετά το ULRA) με τα υψηλότερα ποσοστά βιοαποδόμησης στα αλκάνια, φτάνοντας το 87% στα ελαφριά, το 64% στα μεσαία και το 29% στα βαριά συστατικά. Καμία ένδειξη βιοαποδόμησης αρωματικών δεν υπήρξε.

Τελικά, βιοαποδόμηση αλκανίων υπήρξε και στα τρία δείγματα, με τα υψηλότερα ποσοστά να παρουσιάζονται στα ελαφριά και στα μεσαία συστατικά. Στα αρωματικά κλάσματα δεν υπήρξε καμία μεταβολή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Συμεωνίδης Γεώργιος 2009, μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία στην Ναυτιλία με θέμα: “Πετρελαϊκή ρύπανση από ατυχήματα δεξαμενοπλοίων υπόθεση EXXON VALDEZ”.
<http://dione.lib.unipi.gr/xmlui/bitstream/handle/unipi/3380/Simeonidis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
2. NOAA – Office Of Response and Restoration.”How do spills happen?” 2003,
<http://response.restoration.noaa.gov/training-and-education/education-students-and-teachers/how-do-spills-happen.html>
3. Κορρός Κωνσταντίνος 2008, διπλωματική εργασία με θέμα: “Μοντέλο τύχης/γήρανσης κηλίδων πετρελαίου”.
https://dspace.lib.ntua.gr/dspace2/bitstream/handle/123456789/3354/korrosk_spill_s.pdf?sequence=3
4. ITOF – International Tanker Owners Pollution Federation, 2013
<http://www.itopf.com>
5. Καλογεράκης Ν., 2010 Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος (Τεχνική Βιοεξυγίανσης Περιβάλλοντος) Bioremediation, Σημειώσεις Μέρος Ι, Χανιά Πολυτεχνείο Κρήτης Μη.Περ.
6. Greenpeace, <http://www.greenpeace.org/greece/el/multimedia/-/-/>
7. Νικολοπούλου Μ., 2013 Διδακτορική Διατριβή με θέμα: “Βιοαποδόμηση πετρελαιοειδών σε θαλάσσιο περιβάλλον-Χαρακτηρισμός σχηματισμού βιοσιτιβάδας σε σταγονίδια υδρογονανθράκων.”
<http://dias.library.tuc.gr/view/16847>
8. Τσισκάκη Ευφροσύνη 2011, διπλωματική με θέμα: “Βιοαποδόμηση Πετρελαϊκών Υδρογονανθράκων σε Θαλάσσιο Περιβάλλον”. <http://dias.library.tuc.gr/view/12740>
9. Πανταζάκη Α. - Σίμου Ο. Επιστημονικό άρθρο με θέμα: “Βιοαποικοδομήσιμα Βιοαπορρυπαντικά”.
<http://www.eex.gr/library/ximika-xronika/567-teyxos-1-tomos-73>
10. Χ. Κοντοβάς 2011, Διδακτορική Διατριβή με θέμα: “Ποσοτικό πλαίσιο διαχείρισης ναυτικού ρίσκου για την ανθρώπινη ασφάλεια και την προστασία του περιβάλλοντος”.
<http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/26314#page/1/mode/2up>
11. Nikolopoulou M., Pasadakis N. and Kalogerakis N., 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. Elsevier Marine pollution bulletin, 72, 165-173.
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13001896
12. Xueqing Zhu, Albert D. Venosa, Makram T. Suidan, and Kenneth Lee, 2001 “Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands”
www.epa.gov/sites/production/files/2013-07/documents/guidelines_for_the_bioremediation_of_marine_shorelines_and_freshwater_wetlands.pdf.
13. Nikolopoulou M., Eichenbusch P., Pasadakis N., Venieri D. and Kalogerakis N., 2013, “Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills” www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413000745
14. Nikolopoulou M, Kalogerakis N , 2011 Petroleum Spill Control with Biological Means, Elsevier B. V.
15. Τσιοταλακίδης Α. 2015, διπλωματική εργασία με θέμα: “ Βιοαποδόμηση IFO 180 με θαλάσσιους αποδομητές υδρογονανθράκων απομονωμένους από περιβάλλον με χρόνια ρύπανση”. <http://dias.library.tuc.gr/view/28431>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Δεδομένα υγρής - υγρής εκχύλισης (LLE)

Liquid-Liquid extraction						
Sample	Date	Sur.std	DCM	Wvial	Wvial +S	Ws
		μl	ml	gr	gr	
CONTROL						
C0	28 Απρ 2015	50	25	4,6753	4,73	0,0547
C7#1	30 Απρ 2015	50	25	4,6356	4,6914	0,0558
C7#2	30 Απρ 2015	50	25	4,6777	4,7588	0,0811
C14#1	06 Μαΐ 2015	50	25	4,6372	4,7001	0,0629
C14#2	07 Μαΐ 2015	50	25	4,6666	4,7246	0,058
C21#1	14 Μαΐ 2015	50	35	4,6540	4,7078	0,0538
C21#2	14 Μαΐ 2015	50	35	4,6796	4,7464	0,0668
C35#1	21 Μαΐ 2015	50	25	4,6826	4,7398	0,0572
C35#2	21 Μαΐ 2015	50	25	4,6583	4,7271	0,0688
C56#1	29 Μαΐ 2015	50	25	4,7009	4,7568	0,0559
C56#2	29 Μαΐ 2015	50	25	4,6622	4,7283	0,0661
UL+New Cherry						
ULNC0	29 Απρ 2015	50	25	4,6523	4,6750	0,0227
ULNC7#1	05 Μαΐ 2015	50	25	4,6734	4,7355	0,0621
ULNC7#2	05 Μαΐ 2015	50	25	4,6731	4,7682	0,0951
ULNC7#3	06 Μαΐ 2015	50	50	4,6479	4,7402	0,0923
ULNC14#1	08 Μαΐ 2015	50	25	4,6475	4,7009	0,0534
ULNC14#2	08 Μαΐ 2015	50	50	4,6629	4,7378	0,0749
ULNC14#3	08 Μαΐ 2015	50	25	4,6723	4,726	0,0537
ULNC21#1	15 Μαΐ 2015	50	50	4,6505	4,73	0,0795
ULNC21#2	15 Μαΐ 2015	50	25	4,6708	4,7375	0,0667
ULNC21#3	15 Μαΐ 2015	50	25	4,6854	4,7509	0,0655
ULNC35#1	25 Μαΐ 2015	50	50	4,6482	4,7162	0,068
ULNC35#2	25 Μαΐ 2015	50	50	4,6304	4,6867	0,0563
ULNC35#3	26 Μαΐ 2015	50	50	4,647	4,7084	0,0614
ULNC56#1	29 Μαΐ 2015	50	85	4,7137	4,7507	0,037
ULNC56#2	02 Ιουν 2015	50	50	4,6595	4,7195	0,06
ULNC56#3	03 Ιουν 2015	50	50	4,637	4,6917	0,0547
UL+BB1000						
ULBB0	29 Απρ 2015	50	25	4,6631	4,7412	0,0781
ULBB7#1	04 Μαΐ 2015	50	25	4,6608	4,7261	0,0653
ULBB7#2	04 Μαΐ 2015	50	25	4,7185	4,801	0,0825
ULBB7#3	04 Μαΐ 2015	50	25	4,6715	4,7376	0,0661
ULBB14#1	07 Μαΐ 2015	50	50	4,6563	4,7119	0,0556
ULBB14#2	07 Μαΐ 2015	50	25	4,6806	4,7646	0,084
ULBB14#3	07 Μαΐ 2015	50	25	4,6804	4,7532	0,0728
ULBB21#1	15 Μαΐ 2015	50	25	4,6463	4,7299	0,0836
ULBB21#2	19 Μαΐ 2015	50	35	4,6513	4,6998	0,0485
ULBB21#3	19 Μαΐ 2015	50	35	4,67	4,7308	0,0608
ULBB35#1	28 Μαΐ 2015	50	25	4,6864	4,7524	0,066
ULBB35#2	28 Μαΐ 2015	50	50	4,6616	4,7377	0,0761
ULBB35#3	29 Μαΐ 2015	50	50	4,6963	4,771	0,0747
ULBB56#1	02 Ιουν 2015	50	50	4,6572	4,7406	0,0834
ULBB56#2	02 Ιουν 2015	50	50	4,6821	4,7576	0,0755
ULBB56#3	02 Ιουν 2015	50	50	4,6818	4,7362	0,0544
UL+rhamnolipids Actygea						
ULRA0	28 Απρ 2015	50	50	4,6324	4,7977	0,1653
ULRA7#1	04 Μαΐ 2015	50	25	4,6524	4,7283	0,0759
ULRA7#2	05 Μαΐ 2015	50	25	4,6812	4,7592	0,078
ULRA7#3	05 Μαΐ 2015	50	25	4,644	4,739	0,095
ULRA14#1	08 Μαΐ 2015	50	25	4,6721	4,7377	0,0656
ULRA14#2	14 Μαΐ 2015	50	25	4,6558	4,7252	0,0694
ULRA14#3	14 Μαΐ 2015	50	50	4,6696	4,7393	0,0697
ULRA21#1	19 Μαΐ 2015	50	35	4,6824	4,7632	0,0808
ULRA21#2	21 Μαΐ 2015	50	50	4,6824	4,7576	0,0752
ULRA21#3	21 Μαΐ 2015	50	50	4,6405	4,7266	0,0861
ULRA35#1	26 Μαΐ 2015	50	50	4,6945	4,7565	0,062
ULRA35#2	26 Μαΐ 2015	50	50	4,6965	4,7485	0,052
ULRA35#3	26 Μαΐ 2015	50	50	4,6882	4,7495	0,0613
ULRA56#1	03 Ιουν 2015	50	50	4,6747	4,728	0,0533
ULRA56#2	04 Ιουν 2015	50	45	4,6581	4,7064	0,0483
ULRA56#3	04 Ιουν 2015	50	45	4,6934	4,7451	0,0517

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Δεδομένα στερεής εκχύλισης (SPE)

Sample	Date	Woil (mg)	Wvial F1 (gr)	Wvial F1+S (gr)	Wvial F2 (gr)	Wvial F2+S (gr)	Walkanes (gr)	Waromatics (gr)	Walkanes %	Waromatics %
CONTROL										
C0	09/06/2015	10,3	2,3979	2,4046	2,3822	2,3836	0,0067	0,0014	65,05%	13,59%
C7#1	09/06/2015	6,2	2,3926	2,3969	2,3865	2,3874	0,0043	0,0009	69,35%	14,52%
C7#2	09/06/2015	6,2	2,3933	2,3975	2,3884	2,3893	0,0042	0,0009	67,74%	14,52%
C14#1	10/06/2015	6,3	2,4003	2,4044	2,3841	2,385	0,0041	0,0009	65,08%	14,29%
C14#2	10/06/2015	6,9	2,3907	2,3949	2,3888	2,3898	0,0042	0,001	60,87%	14,49%
C21#1	11/06/2015	8,1	2,3984	2,4037	2,3888	2,3903	0,0053	0,0015	65,43%	18,52%
C21#2	11/06/2015	6,4	2,3827	2,3866	2,3969	2,3977	0,0039	0,0008	60,94%	12,50%
C35#1	11/06/2015	6,8	2,3815	2,3854	2,3895	2,3906	0,0039	0,0011	57,35%	16,18%
C35#2	11/06/2015	6,2	2,4086	2,4125	2,3907	2,3916	0,0039	0,0009	62,90%	14,52%
C56#1	19/06/2015	5,7	2,0197	2,0235	1,999	1,9998	0,0038	0,0008	66,67%	14,04%
C56#2	19/06/2015	7,8	2,0083	2,0136	1,9886	1,9897	0,0053	0,0011	67,95%	14,10%
UL+New Cherry										
ULNC0	09/06/2015	7,8	2,3986	2,4017	2,3903	2,3909	0,0031	0,0006	39,74%	7,69%
ULNC7#1	09/06/2015	7,1	2,3881	2,3912	2,4087	2,4093	0,0031	0,0006	43,66%	8,45%
ULNC7#2	10/06/2015	7,3	2,3947	2,3977	2,4085	2,4095	0,003	0,001	41,10%	13,70%
ULNC7#3	10/06/2015	9,1	2,392	2,3959	2,3929	2,394	0,0039	0,0011	42,86%	12,09%
ULNC14#1	10/06/2015	7,3	2,3949	2,3984	2,3912	2,3923	0,0035	0,0011	47,95%	15,07%
ULNC14#2	10/06/2015	7,7	2,3845	2,3888	2,3861	2,3873	0,0043	0,0012	55,84%	15,58%
ULNC14#3	10/06/2015	9	2,3819	2,3868	2,3728	2,3739	0,0049	0,0011	54,44%	12,22%
ULNC21#1	11/06/2015	6,4	2,4093	2,4123	2,3935	2,3942	0,003	0,0007	46,88%	10,94%
ULNC21#2	11/06/2015	7,5	2,4087	2,4125	2,3939	2,3952	0,0038	0,0013	50,67%	17,33%
ULNC21#3	11/06/2015	8,1	2,3982	2,4022	2,3998	2,4012	0,004	0,0014	49,38%	17,28%
ULNC35#1	17/06/2015	7	1,9997	2,0035	2,0098	2,0107	0,0038	0,0009	54,29%	12,86%
ULNC35#2	17/06/2015	7,1	2,0262	2,0306	2,0091	2,0105	0,0044	0,0014	61,97%	19,72%
ULNC35#3	17/06/2015	6,8	1,9957	1,999	2,3752	2,3763	0,0033	0,0011	48,53%	16,18%
ULNC56#1	19/06/2015	5,9	2,0015	2,0048	2,0051	2,0066	0,0033	0,0015	55,93%	25,42%
ULNC56#2	19/06/2015	7,8	2,0124	2,0167	2,0142	2,0154	0,0043	0,0012	55,13%	15,38%
ULNC56#3	19/06/2015	6,6	2,0115	2,0159	2,0033	2,0046	0,0044	0,0013	66,67%	19,70%
UL+BB1000										
ULBB0	09/06/2015	6,8	2,3912	2,3937	2,3892	2,3898	0,0025	0,0006	36,76%	8,82%
ULBB7#1	09/06/2015	7,1	2,3826	2,3857	2,3988	2,3995	0,0031	0,0007	43,66%	9,86%
ULBB7#2	09/06/2015	9,9	2,3885	2,3929	2,3749	2,376	0,0044	0,0011	44,44%	11,11%
ULBB7#3	09/06/2015	8,1	2,3941	2,3976	2,401	2,4017	0,0035	0,0007	43,21%	8,64%
ULBB14#1	10/06/2015	8,8	2,3912	2,3956	2,3985	2,3996	0,0044	0,0011	50,00%	12,50%
ULBB14#2	10/06/2015	6,9	2,3892	2,3921	2,3882	2,3889	0,0029	0,0007	42,03%	10,14%
ULBB14#3	11/06/2015	6	2,3995	2,4017	2,4014	2,4023	0,0022	0,0009	36,67%	15,00%
ULBB21#1	11/06/2015	7,3	2,389	2,3912	2,4149	2,4161	0,0022	0,0012	30,14%	16,44%
ULBB21#2	11/06/2015	7	2,3694	2,3718	2,3789	2,3805	0,0024	0,0016	34,29%	22,86%
ULBB21#3	17/6/2015	6,4	1,9977	2,0009	2,0205	2,0213	0,0032	0,0008	50,00%	12,50%
ULBB35#1	17/6/2015	6,3	2,3954	2,3991	2,009	2,01	0,0037	0,001	58,73%	15,87%
ULBB35#2	17/6/2015	7,3	2,0239	2,0272	2,0079	2,0089	0,0033	0,001	45,21%	13,70%
ULBB35#3	17/6/2015	7	2,0103	2,0144	2,0035	2,0042	0,0041	0,0007	58,57%	10,00%
ULBB56#1	19/06/2015	5,9	2,0324	2,0356	2,0152	2,0162	0,0032	0,001	54,24%	16,95%
ULBB56#2	19/06/2015	9,2	1,9898	1,9949	2,0082	2,009	0,0051	0,0008	55,43%	8,70%
ULBB56#3	19/06/2015	6,7	2,0189	2,0232	1,9914	1,9923	0,0043	0,0009	64,18%	13,43%
UL+rhamnolipids Actygea										
ULRA0	09/06/2015	8,5	2,3984	2,4024	2,3971	2,3978	0,004	0,0007	47,06%	8,24%
ULRA7#1	17/6/2015	6,7	2,0355	2,0379	2,0145	2,0153	0,0024	0,0008	35,82%	11,94%
ULRA7#2	09/06/2015	9,1	2,3921	2,3962	2,3812	2,3822	0,0041	0,001	45,05%	10,99%
ULRA7#3	09/06/2015	7,1	2,4078	2,4107	2,3819	2,3826	0,0029	0,0007	40,85%	9,86%
ULRA14#1	10/06/2015	6	2,3841	2,3852	2,3843	2,3869	0,0011	0,0026	18,33%	43,33%
ULRA14#2	10/06/2015	8,9	2,3794	2,3835	2,4033	2,4041	0,0041	0,0008	46,07%	8,99%
ULRA14#3	10/06/2015	7,5	2,3795	2,3833	2,3994	2,4002	0,0038	0,0008	50,67%	10,67%
ULRA21#1	17/6/2015	6,9	2,0089	2,0121	2,0258	2,0268	0,0032	0,001	46,38%	14,49%
ULRA21#2	11/06/2015	6,4	2,3959	2,3985	2,3928	2,3938	0,0026	0,001	40,62%	15,63%
ULRA21#3	11/06/2015	8,3	2,3838	2,3875	2,3991	2,3999	0,0037	0,0008	44,58%	9,64%
ULRA35#1	17/6/2015	6,2	2,0216	2,0249	1,9808	1,982	0,0033	0,0012	53,23%	19,35%
ULRA35#2	17/6/2015	6,7	2,0011	2,0048	1,9882	1,9895	0,0037	0,0013	55,22%	19,40%
ULRA35#3	17/6/2015	6,2	2,3762	2,3791	2,3922	2,3931	0,0029	0,0009	46,77%	14,52%
ULRA56#1	19/06/2015	6,2	2,0024	2,0065	2,024	2,025	0,0041	0,001	66,13%	16,13%
ULRA56#2	19/06/2015	7,1	2,01	2,0127	1,9993	2,0005	0,0027	0,0012	38,03%	16,90%
ULRA56#3	19/06/2015	7,9	1,9867	1,9915	2,0071	2,0085	0,0048	0,0014	60,76%	17,72%

