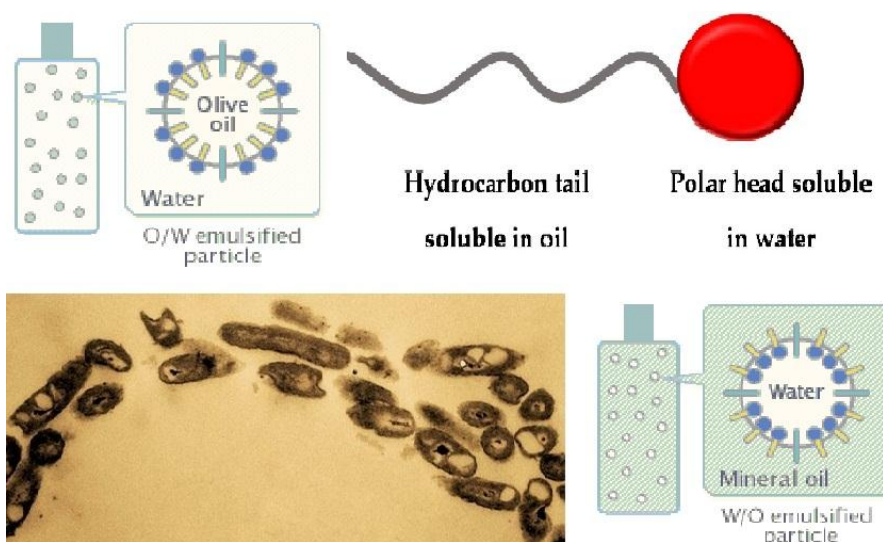




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΤΑΣΙΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΡΕΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΑΡΓΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ



Μανδαλενάκη Αθηνά

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ. Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής Π.Κ. (επιβλέπων)

Δρ. Νικόλαος Πασαδάκης, Καθηγητής Π.Κ.

Δρ. Ελευθερία Αντωνίου, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής

ΧΑΝΙΑ 2016

Ευχαριστίες

Με την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την επιλογή του θέματός μου, την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο και την άριστη συνεργασία. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Ελευθερία Αντωνίου για την ουσιαστική καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για τις συμβουλές της τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Να ευχαριστήσω επίσης των κ. Πασαδάκη για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή. Τέλος, να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για το πνεύμα συνεργασίας που διατηρούν εντός του εργαστηρίου και για την άψογη συνεργασία.

The most valuable thing we extract from the ocean is our existence

~Sylvia Earle, marine biologist

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε χρόνο, οι ποσότητες πετρελαίου ή διυλισμένων κλασμάτων αυτού που ρυπαίνουν τις θάλασσες από ανθρώπινες δραστηριότητες ανέρχονται μεταξύ των 190 και των 706 εκατομμυρίων γαλονιών. Τα υδατοδιαλυτά συστατικά του αργού πετρελαίου και των διυλισμένων προϊόντων του, περιέχουν μια ποικιλία ενώσεων που είναι τοξικές για ένα ευρύ φάσμα θαλασσίων οργανισμών. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων. Τα booms and skimmers αποτελούν συνήθως την πρώτη επιλογή. Παρόλα αυτά, δεν απομακρύνουν παρά μόνο ένα μέρος του πετρελαίου από την θάλασσα (περίπου 10-15%) όταν εφαρμόζονται σύντομα μετά την διαρροή. Έτσι, δημιουργείται η ανάγκη εφαρμογής και δευτερευόντων μηχανισμών απορρύπανσης. Η πιο φιλική μέθοδος προς το περιβάλλον για τον σκοπό αυτό είναι η βιοεξυγίανση (χρησιμοποιείται και ως πρωτεύουσα μέθοδος όταν είναι αδύνατη η εφαρμογή μηχανικών μέσων απορρύπανσης). Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως "η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης" (1). Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες που περιλαμβάνονται στη γήρανση και την τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον, ιδιαίτερα για τα μη πτητικά συστατικά του πετρελαίου. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα.

Σκοπό της έρευνας ήταν η παραγωγή τασιενεργών ουσιών βιολογική προέλευσης χωρίς προσμίξεις πετρελαίου. Ως πηγή άνθρακα στις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου. Το κλάσμα αυτό έχει την ιδιότητα να σχηματίζει μια στερεή 'σε μορφή πλαστελίνης' στρώση πάνω στην επιφάνεια του υγρού. Λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζει το συγκεκριμένο κλάσμα στο διαλυθεί στο νερό δημιουργήθηκε η ιδέα ότι οι βιοτασιενεργές ουσίες που θα απομονώνονταν από την υγρή φάση δεν θα είχαν προσμίξεις πετρελαίου.

Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί προερχόμενοι από ρυπασμένη θαλάσσια περιοχή με πετρελαιοειδή. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, είναι (1) μια μικροβιακή κοινότητα της οποίας το φυλλογενετικό δέντρο φαίνεται στην εικόνα 10, (2) ο απομονωμένος μικροοργανισμός *Alcanivorax borkumensis* SK2 και (3) ο απομονωμένος μικροοργανισμός *Paracoccus marcusii*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν την δυνατότητα παραγωγής τασιενεργών ουσιών βιολογικής προέλευσης και αποικοδομούν υδρογονάνθρακες.

Οι τασιενεργές ουσίες είναι οργανικά, αμφίφιλα μόρια και αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Το υδρόφιλο τμήμα κάνει τις τασιενεργές ουσίες διαλυτές στο νερό και μέσω του υδρόφοβου τμήματός τους, συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες και μειώνουν την επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων. Έτσι, με την προσθήκη τασιενεργών ουσιών σε ρυπασμένες με πετρελαιοειδή περιοχές, αυξάνεται η διαλυτότητα των υδρογονανθράκων και κατ' επέκταση η βιοδιαθεσιμότητά τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση της βιοαποικοδόμησης του ρύπου από τους μικροοργανισμούς.

Οι βιοτασιενεργές ουσίες που απομονώθηκαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελούνταν ως επί το πλείστον από Ραμνολιπίδια, που είναι μια κατηγορία Γλυκολιπιδίων. Σήμερα, τα Ραμνολιπίδια θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικές βιοτασιενεργές ενώσεις.

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7 με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών αζώτου και φωσφόρου και με πηγή άνθρακα βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου. Την μέγιστη συγκέντρωση Ραμνολιπιδίων την παράγει ο μικροοργανισμός *Alcanivorax borkumensis* SK2. Η συγκέντρωση αυτή είναι 52,5g/L και επιτυγχάνεται έπειτα από 22 ημέρες. Στα πλαίσια αυτής της έρευνας περιγράφονται διάφορες χρήσεις που θα μπορούσαν να έχουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί.

ABSTRACT

Every year, human activities release between 190 and 706 million gallons of crude oil or refined petroleum products in the sea. The components which dissolve in the water contain a variety of compounds which are toxic to a wide range of marine organisms. There are several methods for cleaning up an oil spill. Booms and skimmers are generally the first choice but can only remove a portion of the spill, which ranges from 10 to 15% when the method is applied shortly after the leak. Hence, it is necessary to implement secondary mechanisms to remove the remaining part of the spill. Bioremediation is the most 'green' method for this purpose (bioremediation can also be used as primary method when it is impossible to use mechanic methods). According to the United States EPA (Environmental Pollution Agency), bioremediation is a "treatment that uses naturally occurring organisms to break down hazardous substances into less toxic or non-toxic substances". Biodegradation of oil is one of the most important processes included in oil weathering and in the final cleanup of the environment, specifically when it comes to the non-volatile components of oil. It is proven that more than 200 species of bacteria and fungi have the ability to degrade hydrocarbons consisting of 10 to 40 carbon atoms.

The main purpose of this thesis was to produce biosurfactants of high quality. The carbon source used in the cultures was heavy fraction of crude oil. This fraction has the characteristic that it forms a kind of a solid layer on the surface of the liquid. Because of its difficulty to get dissolved in the water, the idea was created that surfactants isolated from the liquid would not have any oil impurities.

The bacteria used for this thesis were derived from a sea area polluted with oil. These microorganisms are 1) a microbial community whose phylogenetic tree is shown in Figure 10, 2) the isolated microorganism *Alcanivorax borkumensis* SK2 and 3) the isolated microorganism *Paracoccus marcusii*. All of these microorganisms have the ability to produce biosurfactants and to degrade hydrocarbons. Surfactants are usually organic compounds that are amphiphilic, meaning they contain both

hydrophobic groups (their tails) and hydrophilic groups (their heads). Surfactants will diffuse in water and adsorb at interfaces between oil and water reducing thus, the surface tension of the solution. Hence, adding surfactants in areas which are polluted with petroleum increases the solubility of hydrocarbons and like this, the bioavailability of them. By increasing the bioavailability of the oil, it is much easier for the microorganisms to biodegrade it.

The biosurfactants which have been isolated during the experiments of this thesis are characterized to be Rhamnolipids which is a category of Glycolipids. Nowadays, Rhamnolipids are considered to be the most effective types of biosurfactants.

The solution in which the microorganisms were cultured consisted of artificial seawater ONR7, nutrients such as nitrogen and phosphorus, and heavy crude oil fractions. From the microorganisms which were used, *Alcanivorax borkumensis* SK2 is the one that produces the highest concentration of Rhamnolipids. This concentration is 52,5g/L and its production takes place after 22 days. Furthermore, included in this thesis are the descriptions of some possible applications for every microorganism.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT.....	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Πετρέλαιο.....	11
1.2 Ρύπανση περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή.....	12
1.2.1 Χαρακτηριστικά παραδείγματα ατυχημάτων και μόλυνσης θαλασσών με πετρελαιοειδή.....	14
1.2.2 Επιπτώσεις ρύπανσης από πετρελαιοειδή στο περιβάλλον.....	16
1.3 Φυσική πορεία πετρελαίου στο περιβάλλον.....	18
1.3.1 Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου.....	18
1.3.2 Εξάπλωση πετρελαίου σε ακτές.....	22
1.4 Τεχνικές απορρύπανσης.....	23
1.5 Βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων.....	26
1.6 Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου.....	27
1.7 Τασιενεργές ουσίες.....	28
1.7.1 Συνθετικές τασιενεργές ουσίες.....	30
1.7.2 Τασιενεργές ουσίες βιολογικής προέλευσης (βιοτασιενεργές.....	31
ουσίες).....	31
1.7.1.1 Ραμνολιπίδια (RLs).....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35

2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	35
2.1.1 Επιλογή μικροοργανισμών	35
2.1.2 Καλλιέργεια μικροοργανισμών	37
2.1.3 Μέθοδος οπτικής απορρόφησης	40
2.1.4 Καλλιεργητική μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων	40
2.1.5 Απομόνωση μικροοργανισμών μέσω στέρεου υποστρώματος.....	41
2.2 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών	42
2.2.1 Επιλογή βαρέως κλάσματος αργού πετρελαίου ως πηγή άνθρακα	42
2.2.2 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια	43
2.2.3 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς την αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια	46
2.3 Απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών.....	47
2.3.1 Απομόνωση Ραμνολιπιδίων με εκχύλιση	48
2.4 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
3.1 Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων	51
3.2 Παραγωγή και απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια.....	54
3.3 Παραγωγή και απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς την αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια.....	58
3.4 Χαρακτηρισμός βιοτασιενεργών ουσιών με TLC	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΠΙΝΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων	23
Πίνακας 2: Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα	33
Πίνακας 3: Στοιχεία βαρέως κλάσματος πετρελαίου χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο (HOF)	43
Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός Ραμνολιπιδίων πειράματος παραγωγής και απομόνωσης βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση NP και ONR7 στην καλλιέργεια.....	62
Πίνακας 5: Χαρακτηρισμός Ραμνολιπιδίων πειράματος παραγωγής και απομόνωσης βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7 στην καλλιέργεια	62
Πίνακας 6: Απόσπασμα του Πίνακα 2 (Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα).....	63
Πίνακας 7: Πίνακας τιμών καμπυλών ανάπτυξης μικροοργανισμών	68
Πίνακας 8: Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs με αναπλήρωση NP και ONR7	69
Πίνακας 9: Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ανθρωπογενής πηγές ρύπανσης θαλασσών με πετρελαιοειδή	12
Σχήμα 2: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας E8.....	52
Σχήμα 3: Καμπύλη ανάπτυξης απομονωμένου μικροοργανισμού Υ	52
Σχήμα 4: Καμπύλη ανάπτυξης απομονωμένου μικροοργανισμού ESPA.....	53
Σχήμα 5: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από την μικροβιακή κοινότητα E8 με αναπλήρωση NP και ONR7	56
Σχήμα 6: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό Υ με αναπλήρωση NP και ONR7	56
Σχήμα 7: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό ESPA με αναπλήρωση NP και ONR7	57
Σχήμα 8: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό YELLOW με αναπλήρωση NP και ONR7	57
Σχήμα 9: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από την μικροβιακή κοινότητα E8 χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7	60
Σχήμα 10: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό Υ χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7	60
Σχήμα 11: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό ESPA χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ατύχημα πετρελαιοφόρου Exxon Valdez	15
Εικόνα 2: Πτηνό καλυμμένο με πετρέλαιο	18
Εικόνα 3: Ένα βρέφος και 5 θαλάσσιες ενυδρίδες νεκρές και επικαλυμμένες με πετρέλαιο	18
Εικόνα 4: Σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης μια πετρελαιοκηλίδας	19
Εικόνα 5: Πορεία πετρελαιοκηλίδας στο νερό	22
Εικόνα 6: Συλλογή πετρελαιοκηλίδας με πλωτό φράγμα	25
Εικόνα 7: Μικκύλιο τασιενεργών ουσιών στο νερό	29
Εικόνα 8: Αρχή λειτουργίας μέσων διασποράς σε περίπτωση πετρελαιοκηλίδας σε θαλάσσιο περιβάλλον	29
Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικοί τύποι monorhamnolipid και dirhamnolipid	34
Εικόνα 10: Φυλλογενετικό δέντρο της μικροβιακής κοινότητας E8	36
Εικόνα 11: Ο μικροοργανισμός Alcanivorax κατά την βιοαποικοδόμηση πετρελαίου	37
Εικόνα 12: Μορφή βαρέως κλάσματος αργού πετρελαίου στην καλλιέργεια	42
Εικόνα 13: Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)	50
Εικόνα 14: Σύγκριση τυποποιημένου Ραμνολιπιδίου καθαρότητας 95% και δείγματος E8 με TLC	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πετρέλαιο

Η λέξη πετρέλαιο προέρχεται από την ελληνική λέξη πέτρα και την λατινική λέξη oleum που σημαίνει «λάδι» και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό ορυκτολόγο Agricola, το 1556. Η πρώτη μνεία χρησιμοποίησης του γίνεται στη Βίβλο, στο σημείο όπου αναφέρεται ότι ο Νώε πραγματοποίησε επάλειψη της Κιβωτού, πριν από τον κατακλυσμό, με κάποιο υλικό ασφατικής σύστασης. Όσον αφορά στην νεότερη ιστορία, η πρώτη γεώτρηση ειδικά για την αναζήτηση πετρελαίου, έγινε από τον Έντγουιν Ντρέικ στην δυτική Πενσυλβανία τον Αύγουστο του 1859 και σε βάθος 21 μέτρων. Έτσι άνοιξε ο δρόμος για την βιομηχανία του πετρελαίου. Την ίδια περίπου περίοδο, πετρελαϊκά πεδία ανακαλύφθηκαν στην Ευρώπη και την Άπω Ανατολή. Με την αρχή του 20ου αιώνα, η Βιομηχανική Επανάσταση που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση του αυτοκινήτου, είχε προχωρήσει τόσο πολύ, ώστε το επεξεργασμένο πετρέλαιο για φωτιστική χρήση έπαυε να έχει την πρώτη σημασία και η πετρελαϊκή βιομηχανία έγινε η πρώτη πηγή ενέργειας στον κόσμο. Έτσι, ενώ το 1870 η παγκόσμια παραγωγή πετρελαίου ήταν μικρότερη από 1 εκατ. τόνους το χρόνο, στην πορεία έφτασε να ξεπερνά τους 3 δις εκατ. τόνους. Σήμερα το πετρέλαιο αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη στην βιομηχανία των πετροχημικών, αλλά την μεγαλύτερη εφαρμογή την βρίσκει στην παραγωγή ενέργειας, από την οποία εξαρτάται το παρόν και το μέλλον της παγκόσμιας οικονομίας (2).

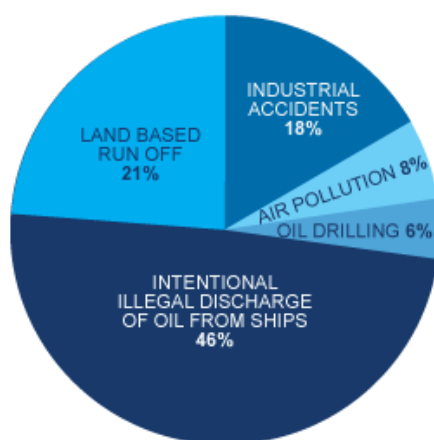
Το πετρέλαιο, που μερικές φορές στην καθημερινή γλώσσα αποκαλείται και μαύρος χρυσός, είναι παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα. Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο είναι υγρό πέτρωμα, μείγμα υδρογονανθράκων, δηλαδή ουσιών που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο, κατά ένα μεγάλο μέρος της σειράς των αλκανίων, που όμως περιέχει και αρκετούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, καθώς και άλλες οργανικές ενώσεις. Το αργό πετρέλαιο

βρίσκεται μέσα σε πορώδη πετρώματα στα ανώτερα στρώματα μερικών περιοχών του φλοιού της Γης. Σε μικρές συγκεντρώσεις περιλαμβάνονται μη υδρογονανθρακικές θειούχες ενώσεις (υδροθείο, μερκαπτάνες, σουλφίδια, δισουλφίδια, πολυσουλφίδια και θειοφαίνια) και αζωτούχες ενώσεις, που είναι γενικά ανεπιθύμητες κατά την επεξεργασία, ως διαβρωτικές για τον εξοπλισμό, δηλητηριώδεις για τους καταλύτες και συμβάλλουσες στην ατμοσφαιρική ρύπανση από τον σχηματισμό διοξειδίου και τριοξειδίου του θείου και οξειδίων του αζώτου αντίστοιχα, όταν αυτές καίγονται (3).

1.2 Ρύπανση περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή

Σύμφωνα με την National Academy of Sciences η πλειοψηφία του πετρελαίου που καταλήγει στους ωκεανούς (περίπου το 52%), προέρχεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το υπόλοιπο 48% προέρχεται από φυσικές πηγές όπως ρωγμές σε διαβρώσιμα ιζηματογενή πετρώματα ή στον βυθό των ωκεανών (4).

Κάθε χρόνο, ανθρώπινες δραστηριότητες εναποθέτουν μεταξύ 190 και 706 εκατομμυρίων γαλονιών αργού πετρελαίου ή διυλισμένων προϊόντων αργού πετρελαίου στις θάλασσες (4). Στο Σχήμα 1 φαίνονται οι διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες που αποβάλλουν πετρέλαιο στην θάλασσα, καθώς και το ποσοστό συνεισφοράς κάθε δραστηριότητας.



Σχήμα 1: Ανθρωπογενής πηγές ρύπανσης θαλασσών με πετρελαιοειδή, 2003 (5)

Από το Σχήμα 1 φαίνεται επίσης ότι το 46% του πετρελαίου των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων εναποτίθεται παράνομα στους ωκεανούς από πλοία. Πιστεύεται ότι το 5 με 15% των μεγάλων πλοίων παγκοσμίως παραβιάζουν τους διεθνείς κανονισμούς πάνω σε αυτό το ζήτημα (4).

Για την πρόληψη της ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος από πλοία (λειτουργικά ή τυχαία αίτια) δημιουργήθηκε η σύμβαση MARPOL. Η σύμβαση αυτή, γράφτηκε το 1973 και αναθεωρήθηκε το 1978 από τον Διεθνή Ναυτιλιακό Οργανισμό (International Maritime Organization, IMO). Η σύμβαση αποτελείται από 6 παραρτήματα, το καθένα εκ των οποίων αναφέρεται σε διαφορετικό είδος θαλάσσιας ρύπανσης. Στο παράτημα I, αγγλιστί Annex I, περιγράφονται οι κανονισμοί για την πρόληψη της ρύπανσης από πετρέλαιο. Συνοπτικά μέσω αυτού του παραρτήματος:

- Καθορίζονται πρότυπα για την κατασκευή πετρελαιοφόρων.
- Υποχρεούνται όλα τα εμπορικά πλοία να διατηρούν ένα βιβλίο (oil record book) όπου με ακρίβεια και με τεκμηρίωση καταγράφονται όλες οι κινήσεις του πετρελαίου που εισέρχεται στο πλοίο.
- Τα χρησιμοποιημένα λάδια των πλοίων πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία (η οποία παρακολουθείται και καταγράφεται) για τον διαχωρισμό της ελαιώδους από την υδάτινη φάση. Για την απόρριψη της υδάτινης φάσης στην θάλασσα, αυτή δεν πρέπει να έχει συγκέντρωση λαδιού μεγαλύτερη από 15ppm. Επιπλέον θα πρέπει να ισχύουν και άλλες συνθήκες κατά την απόρριψη, οι οποίες σχετίζονται με το είδος του πλοίου και την εκάστοτε θάλασσα.

Παρότι η σύμβαση MARPOL έχει υπογραφεί από 163 χώρες, αριθμός που καλύπτει το 98% της παγκόσμιας εμπορικής χωρητικότητας των πλοίων, εξακολουθείτε η παραβίασή της με αποτέλεσμα την ρύπανση των θαλασσών και των ωκεανών (6).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πέρα των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον, υπάρχουν συχνά διαρροές πετρελαίου και διυλισμένων κλασμάτων αυτού και στην γη. Μερικά παραδείγματα είναι οι διαρροές από υπόγειες δεξαμενές πρατηρίων καυσίμου, οι διαρροές από ατυχήματα οχημάτων που μεταφέρουν καύσιμα κ.α..

1.2.1 Χαρακτηριστικά παραδείγματα ατυχημάτων και μόλυνσης

Θαλασσών με πετρελαιοειδή

Δεν πρέπει φυσικά να υποτιμηθεί στο σημείο αυτό η ζημιά που μπορεί να προκληθεί από ατυχήματα που συμβαίνουν στο θαλάσσιο περιβάλλον. Τα ατυχήματα των πετρελαιοφόρων είναι μια πηγή ρύπανσης, η συνεισφορά της οποίας μειώνεται διαρκώς με τα χρόνια, λόγω των κανονισμών που αφορούν το ίδιο το πλοίο (π.χ. διπλά τοιχώματα, ανθεκτικά υλικά), τους ελέγχους, την εκπαίδευση των ναυτικών και τα πρότυπα ασφαλείας. Τα περισσότερα από τα ατυχήματα δεν συνεπάγονται ρύπανση. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις ατυχημάτων που προκάλεσαν μεγάλες καταστροφές, διότι οι ποσότητες του πετρελαίου ήταν μεγάλες και οι μετεωρολογικές συνθήκες τέτοιες που το πετρέλαιο μεταφέρθηκε γρήγορα στις ακτές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου ατυχήματος είναι το ατύχημα του Exxon Valdez.

Ατύχημα Exxon Valdez

Γύρω στα μεσάνυχτα της 24ης Μαρτίου 1989, το υπό Αμερικάνικη σημαία πετρελαιοφόρο Exxon Valdez, το οποίο μετέφερε 180.000 τόνους αργού πετρελαίου από τον σταθμό φόρτωσης Valdez (Alaska) με προορισμό το Λος Άντζελες / Λονγκ Μπιτς, προσάραξε με ταχύτητα 12 κόμβων στον ύφαλο Bligh Reef στα βορειοανατολικά του πορθμού Πρινς Ουίλιαμ στην Αλάσκα. Η προσάραξη προκάλεσε βλάβη σε 11 από τις 18 δεξαμενές του πλοίου. Περίπου το 1/5 του φορτίου του (36.000 τόνοι πετρελαίου) χύθηκε στη θάλασσα. Πάνω από 7.000 km² πετρελαιοκηλίδων ρύπαναν περίπου 800 km ακτών (2.000 km, αν συμπεριληφθούν τα μικρά νησιά). Το ατύχημα αυτό ήταν το μεγαλύτερο που είχε συμβεί στις ΗΠΑ και η περιοχή στην οποία συνέβη ήταν παρθένα και περιελάμβανε μεγάλο αριθμό προστατευόμενων περιοχών, όπως εθνικά πάρκα και καταφύγια άγριας ζωής. Στο ατύχημα αυτό ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της βιοδιάσπασης, που είναι μια μέθοδος καθαρισμού που προτάθηκε από την Αμερικανική υπηρεσία EPA (Environmental Protection Agency). Συγκεκριμένα, τον Ιούλιο του 1989, στο βαριά ρυπασμένο Γκριν Άιλαντ ρίχτηκαν νιτρικά και φωσφορικά άλατα (λιπάσματα), με

σκοπό να υποβοηθήσουν τους πληθυσμούς των μικροβίων να διασπάσουν το πετρέλαιο. Η εφαρμογή αυτή έδειξε ότι η μέθοδος ήταν ελπιδοφόρα και έως το τέλος του καλοκαιριού είχε χρησιμοποιηθεί σε 176 km ακτών. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 48.600 kg νιτρικών λιπασμάτων από το 1989 έως το 1991. Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι η μέθοδος δεν ήταν πανάκεια στην αντιμετώπιση του πετρελαίου όπως αρχικά είχε θεωρηθεί, ενώ ήταν άγνωστες οι συνέπειες της εισαγωγής στο θαλάσσιο οικοσύστημα μεγάλων ποσοτήτων λιπασμάτων (ενδεχόμενη πρόκληση ευτροφισμού). Όσον αφορά στους οργανισμούς της θάλασσας, αναφέρεται ότι πέθαναν 250.000 θαλασσοπούλια, 2.800 ενυδρίδες, 900 φαλακροί αετοί, 22 όρκες και 300 φώκιες. Το ατύχημα επίσης έβλαψε άγνωστο, αλλά τεράστιο, αριθμό αυγών σολομού και ρέγκας (7).



Εικόνα 1: Ατύχημα πετρελαιοφόρου Exxon Valdez, η φωτογραφία τραβήχτηκε 1 Απριλίου του 1989 (8)

Μεγάλες οικολογικές καταστροφές έχουν προκληθεί και από ατυχήματα σε εξέδρες εξόρυξης πετρελαίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα του περιβαλλοντικού κινδύνου που εμπεριέχουν οι εξορύξεις κοιτασμάτων πετρελαίου αποτελούν τα τρία μεγαλύτερα ατυχήματα που συνέβησαν σε υπεράκτιες εξέδρες εξόρυξης. Το πρώτο χρονολογικά συνέβη το 1979 στην πλατφόρμα Ixtoc I στον Κόλπο του

Μεξικού (διαρροή περίπου 3,5 εκατ. βαρελιών πετρελαίου). Στη συνέχεια, το 1983, στις πετρελαϊκές εγκαταστάσεις Nowruz στον Περσικό Κόλπο έγινε διαρροή 1,9 εκατ. βαρελιών. Τέλος, το πιο πρόσφατο, συνέβη τον Απρίλιο του 2010 στην εξέδρα Deepwater Horizon της BP στον Κόλπο του Μεξικού. Η έκρηξη στην εξέδρα Deepwater Horizon προκάλεσε τη βύθισή της, το θάνατο έντεκα ανθρώπων και τη συνολική διαρροή σχεδόν 5 εκατ. βαρελιών πετρελαίου. Μετά την βύθιση της πλατφόρμας εκχυνόταν στην θάλασσα 60 χιλιάδες βαρέλια αργού πετρελαίου κάθε μέρα για τρεις μήνες (9). Έχει χαρακτηριστεί ως το χειρότερο ατύχημα θαλάσσιας ρύπανσης από διαρροή πετρελαίου στην παγκόσμια ιστορία. Προκάλεσε την οικολογική καταστροφή 32.000 km² υγροτόπων της Λουϊζιάνας, ενός απ τα πιο παραγωγικά οικοσυστήματα της Βόρειας Αμερικής και συνολικά ρυπάνθηκαν περίπου 5000 km ακτές (10). Επιπλέον είχε και καταστροφικό κοινωνικοοικονομικό αντίκτυπο, δημιουργώντας τεράστια ανεργία λόγω αναστολής της υποθαλάσσιας εξόρυξης και καταστροφής της αλιείας (11).

1.2.2 Επιπτώσεις ρύπανσης από πετρελαιοειδή στο περιβάλλον

Τα υδατοδιαλυτά συστατικά του αργού πετρελαίου και των διυλισμένων προϊόντων του, περιέχουν μια ποικιλία ενώσεων που είναι τοξικές για ένα ευρύ φάσμα θαλάσσιων οργανισμών. Τα αυγά, οι προνύμφες των ψαριών και τα νεαρά άτομα είναι γενικά πιο ευαίσθητα στη ρύπανση από πετρελαιοειδή. Το πετρέλαιο προκαλεί διαταραχές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των οργανισμών, καθώς και ανωμαλίες στην ανάπτυξη των ψαριών, οδηγώντας τελικά στον πρόωρο θάνατό τους. Ακόμη και 1 µg/l (1ppb) πετρελαίου στη θάλασσα μπορεί να βλάψει τους πιο ευαίσθητους οργανισμούς. Ίχνη πετρελαίου στο νερό επηρεάζουν τη σεξουαλική συμπεριφορά των θαλασσίων οργανισμών, τη δυνατότητα προσανατολισμού τους και τους ρυθμούς αφομοίωσης της τροφής. Κάποιες από τις συνέπειες αυτές ενισχύονται από τη χαμηλή αλατότητα και τις υψηλές θερμοκρασίες, ενώ υπάρχει συνεργιστική δράση ανάμεσα στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες και κάποια μέταλλα (12).

Μόλις 0,2 μg/l (0,2ppb) πετρελαίου στο θαλασσινό νερό μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή ορισμένων αλγών. Σε συγκεντρώσεις 2-10 μg/l το πετρέλαιο επηρεάζει την επιβίωση των νυμφών των ψαριών και ελαττώνει την παραγωγή αυγών και την πιθανότητα επιτυχούς ωοτοκίας. Σε συγκεντρώσεις 20-40 μg/l το πετρέλαιο μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη σύσταση του φυτοπλαγκτού, ευνοώντας πχ. τα μικρότερα είδη, ανατρέποντας κατ' αυτό τον τρόπο τις ισορροπίες ολόκληρης της τροφικής αλυσίδας. Συγκεντρώσεις της τάξης των 0,1 g/Kg στα ιζήματα μπορούν να επιφέρουν δυσμενείς επιπτώσεις στους βενθικούς οργανισμούς (12).

Τα θαλάσσια πτηνά, τα θηλαστικά και οι χελώνες επηρεάζονται άμεσα από τις πετρελαιοκηλίδες στην επιφάνεια της θάλασσας. Όταν τα φτερά των πτηνών καλυφθούν με πετρέλαιο, συγκολλούνται, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η πλεύση και το πέταγμά τους και να μειώνεται η θερμική μόνωση του σώματος τους από το ψυχρό νερό. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην ασφυξία και το θάνατο τους (13). Όσον αφορά στα θαλάσσια θηλαστικά, αυτά είναι ιδιαίτερα ευάλωτα διότι έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού, όπου πλέει το πετρέλαιο, για να αναπνεύσουν με αποτέλεσμα τα ρουθούνια τους και το δέρμα τους να εκτίθεται στις τοξικές ουσίες του πετρελαίου (14). Επιπλέον το δέρμα τους χάνει την ικανότητα θερμομόνωσης και τα θηλαστικά πεθαίνουν από υποθερμία (15). Για τις θαλάσσιες χελώνες από την άλλη, ο κίνδυνος έγκειται όταν αυτές προσβάλλονται από της χημικές ουσίες που περιέχει το πετρέλαιο. Πιο συγκεκριμένα, το πετρέλαιο είναι βλαπτικό για τις θαλάσσιες χελώνες σε όλα τα στάδια της ζωής τους καθώς αυξάνει την θνησιμότητα των αυγών, προκαλεί γενετικές ανωμαλίες και τον θάνατο όταν επικαλύψει νεογέννητες, υποενήλικες και ενήλικες χελώνες. Επιπλέον έχει αρνητικές επιπτώσεις στο δέρμα, στο αίμα, στον μεταβολισμό, στο ανοσοποιητικό τους σύστημα και στους αδένες που ρυθμίζουν την αλατότητα (salt gland) (16).

Στην Εικόνα 2 φαίνεται ένα πτηνό καλυμμένο με πετρέλαιο. Το συγκεκριμένο πουλί βρέθηκε στο Knights Island, περίπου 35 μίλια από την πετρελαιοκηλίδα, στις 30 Μαρτίου 1989 (Ατύχημα Exxon Valdez). Το πτηνό μεταφέρθηκε για καθαρισμό στο αρμόδιο κέντρο στο Valdez από τους φωτογράφους.

Τα θηλαστικά της Εικόνας 3 βρέθηκαν νεκρά στο Green Island beach στις 3 Απριλίου του 1989 (Ατύχημα Exxon Valdez).



Εικόνα 2: Πτηνό καλυμμένο με πετρέλαιο (8)



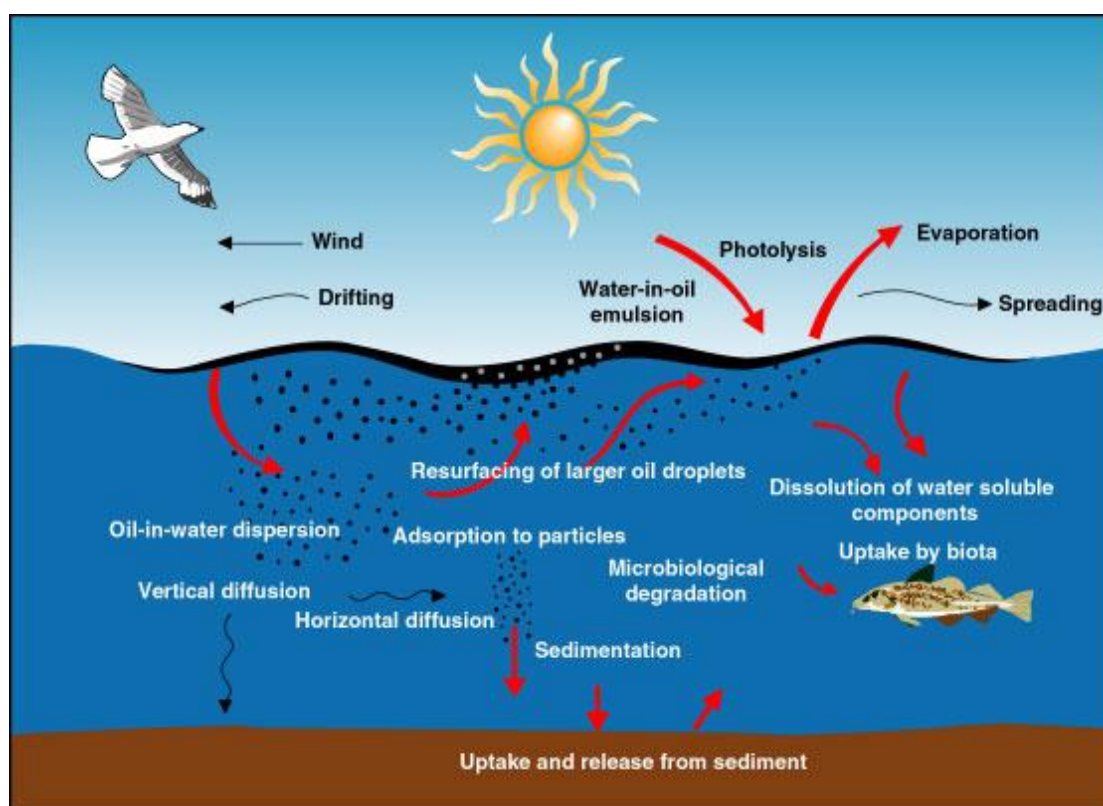
Εικόνα 3: Ένα βρέφος και 5 θαλάσσιες ενυδρίδες νεκρές και επικαλυμμένες με πετρέλαιο (8)

1.3 Φυσική πορεία πετρελαίου στο περιβάλλον

1.3.1 Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου

Ύστερα από την διαρροή του στην θάλασσα, το πετρέλαιο υπόκειται σε διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές, ανάλογα με τη φύση του και τις ωκεανολογικές

συνθήκες. Αυτές οι μεταβολές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την επιλογή των τεχνικών καταπολέμησης του πετρελαίου, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 4: Σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης μια πετρελαιοκηλίδας (17)

Οι φυσικοχημικές μεταβολές των πετρελαιοειδών φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 4 και έχουν ως εξής:

Εξάπλωση (spreading): Το πετρέλαιο έχει την τάση να διασκορπίζεται οριζόντια πάνω στην επιφάνεια της θάλασσας, κάτω από την δράση της βαρύτητας, του ιζώδους και της επιφανειακής τάσης. Τα περισσότερα είδη αργού πετρελαίου εξαπλώνονται σε στρώμα πάχους περίπου 0,3mm εντός 12 ωρών. Όταν δεν υπάρχουν άλλες επιδράσεις, η εξάπλωση συνεχίζεται μέχρις ότου σχηματιστεί ένα στρώμα πετρελαίου πάχους 0,5μm (18).

Εξάτμιση (evaporation): Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα σε λίγες ώρες από την διαρροή και τα πλέον πτητικά κλάσματα μιας πετρελαιοκηλίδας χάνονται στην ατμόσφαιρα με ρυθμό που αυξάνεται με την αύξηση της ταχύτητας του ανέμου, του κυματισμού της θάλασσας και της θερμοκρασίας. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται επίσης από τον τύπο του πετρελαίου. Το πετρέλαιο που παραμένει στην θάλασσα

έχει μεγαλύτερη πυκνότητα και ιξώδες από το αρχικό. Στις περισσότερες κηλίδες αργού πετρελαίου χάνεται μέχρι και το 40% του όγκου τους στις πρώτες 48 ώρες, ενώ το βαρύ πετρέλαιο που περιέχει λίγες πτητικές ενώσεις θα παρουσιάσει λίγη εξάτμιση ακόμη και μετά από αρκετές ημέρες. Τα ελαφρά προϊόντα διύλισης, όπως βενζίνη, κηροζίνη και πετρέλαιο ντίζελ εξατμίζονται σχεδόν τελείως σε διάστημα μερικών ωρών, δημιουργώντας κίνδυνο πυρκαγιάς σε κλειστές περιοχές, όπως λιμάνια (18).

Διάλυση (dissolution): Οι απώλειες από διάλυση είναι σχετικά μικρές, αφού οι περισσότεροι υδρογονάνθρακες από τους οποίους αποτελείται το πετρέλαιο έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό της θάλασσας. Στην πραγματικότητα, όσο αλμυρότερη είναι η θάλασσα, τόσο ασθενέστερη είναι η διάλυση (18).

Βιοαποικοδόμηση (biodegradation): Η βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου από μικροοργανισμούς που ζουν στην θάλασσα, συμβάλει στη μετατροπή του σε οξειδωμένα προϊόντα. Ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, τις θρεπτικές ουσίες, το διαλυμένο οξυγόνο και τον τύπο του πετρελαίου. Επειδή τα βακτήρια είναι ενεργά στη διαχωριστική επιφάνεια πετρελαίου/νερού, ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξάνεται όταν σχηματίζονται λεπτές μεμβράνες ή σταγονίδια διασκορπισμένου πετρελαίου με μεγάλη επιφάνεια (18), όταν δηλαδή αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου.

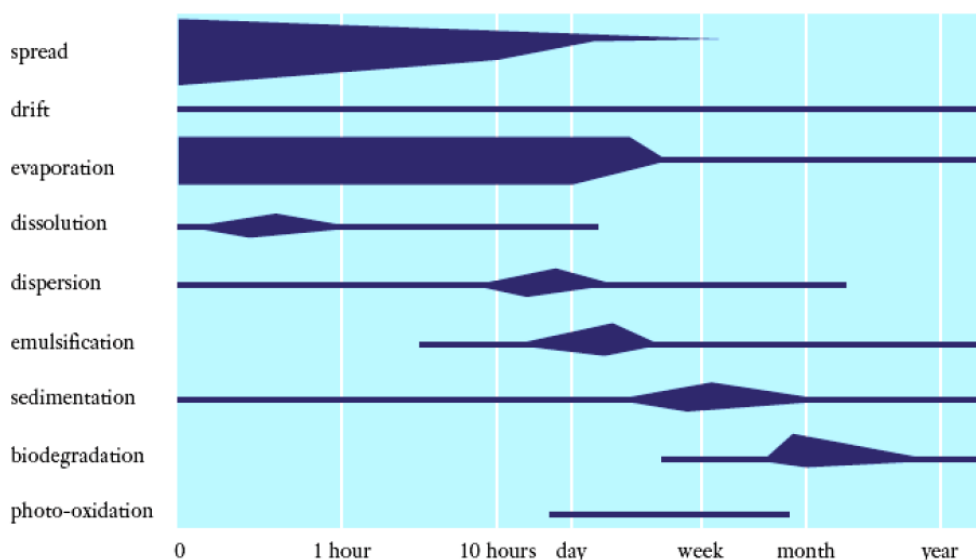
Φωτο-οξείδωση (oxidation): Η φωτο-οξείδωση μπορεί να έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες. Παρουσία οξυγόνου, το φυσικό φως του ηλίου έχει ικανή ενέργεια για να μετασχηματίσει πολλές σύνθετες πετρελαϊκές ενώσεις, όπως είναι οι αρωματικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους και οι πολικές ενώσεις, σε απλούστερες ενώσεις μέσω μιας σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Αυτή η διεργασία μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό, λόγω του σχηματισμού πολικών ενώσεων (υδροπεροξειδία, αλδεΐδες, κετόνες, φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα). Τα καταστρεπτικά αποτελέσματα μπορούν να συνδεθούν με αυτήν την αύξηση στη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό και το σχηματισμό τοξικών ενώσεων από τη φωτο-οξείδωση (19). Από την άλλη, η αύξηση της διαλυτότητας του πετρελαίου στον νερό (βιοδιαθεσιμότητα) μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του ρύπου.

Γαλακτωματοποίηση (emulsification): Υπάρχουν δύο ειδών γαλακτωματοποιήσεις.

1. **Πετρέλαιο σε νερό:** Αν η ροή στην επιφάνεια του νερού είναι τυρβώδης, το πετρέλαιο είναι δυνατόν να διασπαστεί σε σταγονίδια που αιωρούνται στο νερό. Τότε η κηλίδα δεν επηρεάζεται από τον άνεμο και μπορεί να ξανασηματιστεί σε κάποια απόσταση από την περιοχή που έγινε η αρχική διαρροή.
2. **Νερό σε πετρέλαιο ('chocolate mousse'):** Αυτός ο τύπος γαλακτώματος μπορεί να σχηματισθεί εντός ολίγων ωρών και περιέχει μέχρι 80-90% νερό. Συνεπώς η πυκνότητα και το ειδικό βάρος αυξάνουν καθώς επίσης και οι όγκοι που θα πρέπει να καταπολεμηθούν. Ο σχηματισμός των γαλακτωμάτων μεγαλώνει μέχρι και στο δεκαπλάσιο τον όγκο του ρύπου, επιβραδύνει τις υπόλοιπες διαδικασίες γήρανσης και μετασχηματίζει τον ρύπο σε μορφή που μοιάζει να είναι περισσότερο στερεή παρά υγρή (18). Τα επιφανειοδραστικά υλικά, ή αλλιώς τασιενεργά υλικά, που παράγονται μέσω των φωτοχημικών και βιολογικών διεργασιών περιλαμβάνονται επίσης στο σχηματισμό των γαλακτωμάτων (19).

Βύθιση και κατακάθιση (sedimentation and sinking): Η αύξηση της πυκνότητας του ρύπου, που προκύπτει από την εξάτμιση και την γαλακτωματοποίηση, μπορεί να βοηθήσει στη βύθιση της κηλίδας. Συχνά, η αιτία της βύθισης είναι η προσκόλληση ιζημάτων και άλλων οργανικών ουσιών ή και άμμου σε ρηχές θάλασσες με αμμώδη βυθό. Η βύθιση είναι επίσης δυνατή όταν παρατηρείται σημαντική πτώση της πυκνότητας των επιφανειακών νερών.

Στην Εικόνα 5 φαίνεται η πορεία μιας πετρελαιοκηλίδας στο νερό. Το μήκος της γραμμής δείχνει την διάρκεια του κάθε σταδίου και το πάχος της δείχνει την πιο κρίσιμη φάση κάθε σταδίου.



Εικόνα 5: Πορεία πετρελαιοκηλίδας στο νερό (19)

1.3.2 Εξάπλωση πετρελαίου σε ακτές

Η συμπεριφορά του πετρελαίου στο περιβάλλον των ακτών εξαρτάται κυρίως από τις ιδιότητες της εκάστοτε ακτής, το πορώδες του υποστρώματος και την ενέργεια των κυμάτων που δρουν στην ακτή. Η υψηλότερη έκθεση στο κυματισμό ενισχύει, τόσο τις φυσικές διεργασίες απομάκρυνσης του πετρελαίου όσο και τις διεργασίες γήρανσης του. Οι βαλλόμενες από κύματα βραχώδεις ακτές τείνουν να καθαριστούν από τις πετρελαιοκηλίδες μέσα σε ένα διάστημα μηνών. Ωστόσο, η παλιρροιακή κίνηση είναι επίσης ένας παράγοντας που προωθεί τη διείσδυση πετρελαίου στα ιζήματα. Ο ρυθμός και το βάθος της διείσδυσης πετρελαίου εξαρτώνται πρώτιστα από το πορώδες του υποστρώματος. Στις χονδρόκοκκες ακτές όπως είναι οι χαλικώδεις και αμμώδεις παραλίες, το πετρέλαιο διεισδύει βαθύτερα και παραμένει περισσότερο (όταν παγιδευτεί κάτω από το όριο δράσης των κυμάτων), έναντι των λεπτότερων κοκκωδών ιζημάτων όπως είναι η ιλύς και η άργιλος. Παρόλα αυτά, το πετρέλαιο αφαιρείται ευκολότερα με έκπλυση ύδατος από τα χονδρόκοκκα ιζήματα. Οι αλληλεπιδράσεις του πετρελαίου με την παλιρροιακή δράση, τα κύματα και το υπόστρωμα των ακτών, μπορούν επιπλέον να διαμορφώσουν τάπητες από ασφαλτένια (asphalt-like oil-sediment mats) που είναι ανθεκτικοί στην περαιτέρω βιολογική και φωτοχημική γήρανση. Σημαντικό ρόλο στο

φυσικό καθαρισμό των ακτών διαδραματίζουν επίσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πετρελαίου και των λεπτών ανόργανων σωματιδίων καθώς μειώνεται η προσκόλληση του πετρελαίου στα υποστρώματα των ακτών, μέσω του σχηματισμού λεπτών συσσωματωμάτων πετρελαίου–ανόργανων σωματιδίων, που διασκορπίζονται εύκολα από την παλιρροιακή δράση και τα ρεύματα. Αυτά τα συσσωματώματα ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα του πετρελαίου για βιοδιάσπαση και έτσι οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου επιταχύνονται με αυτήν την διαδικασία (19).

1.4 Τεχνικές απορρύπανσης

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές εξυγίανσης του περιβάλλοντος και διαφοροποιούνται ανάλογα με την εφαρμογή τους σε έδαφος, σε ιζήματα, σε υπόγεια ή επιφανειακά νερά. Οι μέθοδοι για την απορρύπανση πετρελαιοκηλίδων είναι μη-χημικές, χημικές, φυσικές, βιολογικές και θερμικές. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ποικίλει ανά περιστατικό και εξαρτάται από τον τύπο του πετρελαίου, τα χαρακτηριστικά της πληγείσας περιοχής και περιστασιακά από πολιτικές εκτιμήσεις. Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι συνήθεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων.

Πίνακας 1: Συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων

Κατηγορία μεθόδου	Τεχνολογία
Μη-χημικές μέθοδοι	<i>Booming and Skimming:</i> Χρήση πλωτών φραγμάτων για την συγκράτηση και τον έλεγχο της μετακίνησης του επιπλέοντος πετρελαίου (όπως φαίνεται στην Εικόνα 6) και χρήση ολεοσυλλεκτών για την ανάκτησή του. Η περιβαλλοντική επίδραση αυτής της μεθόδου είναι ελάχιστη εάν ελέγχεται η κυκλοφορία του εργατικού δυναμικού καθαρισμού (19).
	<i>Wiping with absorbent materials:</i> Χρήση υδροφοβικών υλικών για την απομάκρυνση του πετρελαίου επάνω από την ρυπασμένη επιφάνεια. Αν και η διάθεση των ρυπασμένων απορριμμάτων είναι ένα ζήτημα, η περιβαλλοντική επίπτωση αυτής της μεθόδου είναι επίσης περιορισμένη εάν η κυκλοφορία των πληρωμάτων καθαρισμού και η παραγωγή αποβλήτων ελέγχεται (19).

	<p><i>Μηχανική απομάκρυνση:</i> Συλλογή και απομάκρυνση των ρυπασμένων επιφανειών των ιζημάτων, χρησιμοποιώντας μηχανικό εξοπλισμό.</p> <p>Αυτή η μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν μικρά ποσά υλικών με πετρέλαιο. Δεν πρέπει να ληφθεί υπόψη στον καθαρισμό των ευαίσθητων βιότοπων ή όπου η διάβρωση είναι ζήτημα (19).</p>
	<p><i>Sediment relocation and tilling:</i> Μετακίνηση του ρυπασμένου με πετρέλαιο ιζήματος από το ένα τμήμα της παραλίας σε άλλο ή με επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling) και ανάμιξη του ρυπασμένου ιζήματος για να ενισχυθεί ο φυσικός καθαρισμός μέσω της διασποράς του πετρελαίου στην υδάτινη στήλη και την προώθηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πετρελαίου και των ανόργανων σωματιδίων.</p> <p>Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διείσδυση του πετρελαίου βαθιά στα ιζήματα των ακτών. Οι πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις από την απελευθέρωση του πετρελαίου και τα ρυπασμένα ιζήματα στα παρακείμενα υδάτινα στρώματα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη (19).</p>
Χημικές μέθοδοι	<p><i>Χημικές ενώσεις διασποράς:</i> Πρόκειται για παράγοντες διασποράς που περιέχουν τασιενεργές ουσίες. Χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια και να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη προτού το πετρέλαιο φθάσει και μολύνει την ακτή. Αυτή η πρακτική χρησιμοποιείται για να μειωθούν οι τοξικές επιδράσεις του πετρελαίου με τη διάλυση του σε κατώτατες συγκεντρώσεις και να επιταχυνθεί ο ρυθμός βιοδιάσπασης του με την αύξηση της αποτελεσματικής περιοχής επιφάνειάς του (19).</p> <p>Παρόλο που η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί σε πολλές χώρες, η χρήση της επιτρέπεται μόνο όταν το βάθος της ακτογραμμής ξεπερνά τα 15m (20).</p>
	<p><i>Demulsifiers:</i> Χρησιμοποιούνται για να διασπασουν τα πετρέλαιο σε νερό (oil-in-water) γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά (19).</p>
	<p><i>Solidifiers:</i> Οι χημικές ουσίες που ενισχύουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν το πετρέλαιο, ούτως ώστε να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση και για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης (19).</p>
	<p><i>Surface film chemicals:</i> Οι film-forming agents μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποτρέψουν το πετρέλαιο από το να προσκολληθεί στα υποστρώματα των ακτών και για να ενισχύσουν την αφαίρεση του πετρελαίου που εμμένει της επιφάνειας με διαδικασίες έκπλυσης με πίεση (19).</p>
Άλλα	<p>Για τον καθαρισμό της θάλασσας χρησιμοποιούνται και διάφορα άλλα χημικά προϊόντα, όπως είναι τα <i>μέσα καταβύθισης</i> (sinking agents), <i>πηκτικά μέσα - στερεοποιητές</i> (viscoelastic additives), <i>απογαλακτοποιητές</i> (emulsion breakers) και <i>βιολογικά μέσα</i> (bioremediation chemicals).</p>

Θερμικές μέθοδοι	<p>Πλύση: Έκπλυση του πετρελαίου που εμμένει κατά μήκος των ακτών στο νερό για συλλογή. Οι στρατηγικές έκπλυσης κυμαίνονται από χαμηλής πίεσεως έκπλυση με κρύο νερό σε έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό.</p> <p>Αυτή η μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται ειδικά με υψηλή πίεση ή καυτό νερό, πρέπει να αποφεύγεται σε υγρότοπους ή σε ευαίσθητους βιότοπους (19).</p>
Φυσική μέθοδος	<p>Η τακτική αυτή δεν χρησιμοποιείται συχνά και συνίσταται μόνο στην παρακολούθηση της κίνησης της κηλίδας. Συνήθως εφαρμόζεται στις περιπτώσεις εκείνες όπου πετρέλαιο, και συνηθέστερα ελαφριά κλάσματα, διαρρέουν στην ανοικτή θάλασσα, μακριά από ακτές και σε καταστάσεις θαλασσοταραχής (21).</p>
Επί τόπου καύση	<p>Το πετρέλαιο στην ακτή καίγεται συνήθως όταν βρίσκεται πάνω σε καύσιμο υπόστρωμα, σε βλάστηση, σε κούτσουρα και άλλα συντρίμια. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προκαλέσει σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή των φυτών και των ζώων (19).</p> <p>Επίσης γίνεται καύση κηλίδων πετρελαίου στην θάλασσα (21). Η μέθοδος αυτή έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει μεγάλες ποσότητες πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας.</p> <p>Πρακτικά προβλήματα της περιορίζουν της δυνατότητες της χρήσης της μεθόδου αυτής. Τέτοια προβλήματα είναι η ανάφλεξη, η διατήρηση της καύσης, οι μεγάλες ποσότητες καπνού στην ατμόσφαιρα, η δημιουργία και πιθανή βύθιση εξαιρετικά παχύρρευστων υπολειμμάτων και λόγοι ασφαλείας (21).</p>



Εικόνα 6: Συλλογή πετρελαιοκηλίδας με πλωτό φράγμα (22)

Παρόλο που οι συμβατικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων, όπως τα πλωτά φράγματα και οι ολεοσυλλέκτες (booms and skimmers) και η χρήση υδροφοβικών υλικών αποτελούν την πρώτη επιλογή, δεν απομακρύνουν παρά μόνο ένα μέρος του πετρελαίου από την θάλασσα (περίπου 10-15%) όταν εφαρμόζονται σύντομα μετά την διαρροή (20).

1.5 Βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων

Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως "η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης" (1). Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπάσιμο στη φύση. Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τη δυνατότητα να καθιερωθούν και να διατηρηθούν οι συνθήκες που ευνοούν τους ρυθμούς ενισχυμένης βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο ρυπασμένο περιβάλλον. Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων:

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

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοεξυγίανση, και η βιοδιέγερση ειδικότερα, μπορεί να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στις ρυπασμένες ακτές. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η βιοδιέγερση είναι αποτελεσματικότερη από την βιοενίσχυση επειδή η προσθήκη μικροοργανισμών που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες δεν θα ενισχύσει την διάσπαση πετρελαίου περισσότερο από την απλή προσθήκη θρεπτικών (19). Η βιοεξυγίανση, ωστόσο ως μέθοδος αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών, έχει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνολογιών. Αυτά είναι:

- Το χαμηλό κόστος εφαρμογής.
- Πιο φιλική προς το περιβάλλον διότι περιλαμβάνει την τελική αποικοδόμηση του πετρελαίου σε ανόργανα προϊόντα (CO_2 και H_2O).

- Το γεγονός ότι είναι λιγότερο παρεισφρητική για το περιβάλλον καθώς είναι βασισμένη σε φυσικές διεργασίες.
- Ως πράσινη τεχνολογία μπορεί ευκολότερα να γίνει αποδεκτή από το ευρύ κοινό.

1.6 Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου

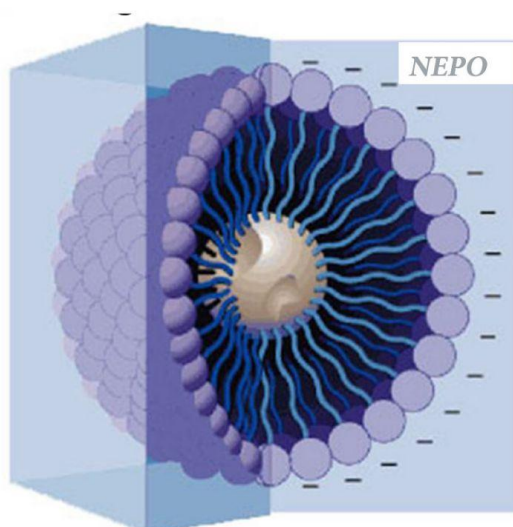
Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες που περιλαμβάνονται στη γήρανση και την τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον, ιδιαίτερα για τα μη πτητικά συστατικά του πετρελαίου. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα. Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κυρίαρχοι βιοαποδομητές υδρογονανθράκων με εύρος κατανομής που καλύπτει ακόμη και τα ακραία κρύα ανταρκτικά και αρκτικά περιβάλλοντα. Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλίσκουν υδρογονάνθρακες συσχετίζεται επίσης με την ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Εκείνα τα περιβάλλοντα με μια πρόσφατη ή χρόνια ρύπανση πετρελαίου θα έχουν υψηλότερο ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων σε σχέση με τις αρρύπαντες περιοχές. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με τη μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο αργό πετρέλαιο. Στη φύση, η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση (consortia). Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει προοδευτικές ή διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου. Έτσι παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση (19).

Σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση πετρελαίου είναι οι διεργασίες γήρανσης, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, η διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH (19).

1.7 Τασιενεργές ουσίες

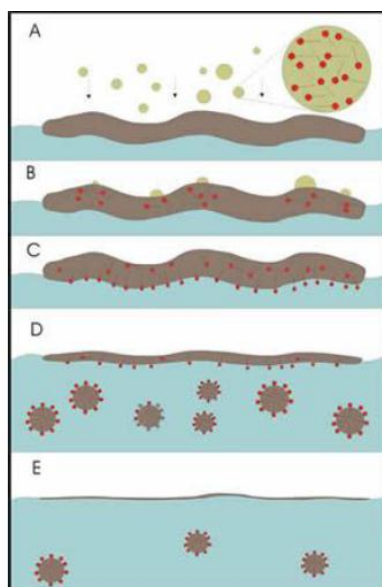
Οι τασιενεργές ουσίες (surfactants) είναι οργανικά, αμφίφιλα μόρια και αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Το υδρόφιλο τμήμα κάνει τις τασιενεργές ουσίες διαλυτές στο νερό και μέσω του υδρόφοβου τμήματός τους, συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες και μειώνουν την επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων (21). Η υδροφοβική ουρά αποτελείται είτε από μια αλυσίδα υδρογονανθράκων είτε από αρωματικούς υδρογονάνθρακες (23). Συνήθως η ταξινόμηση των τασιενεργών ουσιών γίνεται βάση της υδρόφιλης κεφαλής. Υπάρχουν ανιονικές, κατιονικές, διιονικές και μη ιονικές βιοτασιενεργές ουσίες (21). Τα υδρόφιλα τμήματα συνήθως αποτελούνται από μία καρβοξυλική ή θειική ομάδα (ανιονικές), μία ομάδα τεταρτοταγούς αμμωνίου (κατιονική), πολυοξαιθυλένιο, σακχαρόζη, ή ένα πολυπετίδιο (ουδέτερη). Σε μικρές συγκεντρώσεις, οι τασιενεργές ουσίες βρίσκονται ως μονομερή αιωρούμενες στην υδατίνη φάση. Όταν όμως η συγκέντρωση τους μεγαλώσει και φτάσει τη κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (critical micelle concentration, CMC) και η θερμοκρασία του συστήματος είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη θερμοκρασία μικκυλίου (θερμοκρασία Krafft), τότε τα μονομερή ενώνονται και σχηματίζουν μικκύλια 20 έως 200 μορίων (24). Παράδειγμα ενός μικκυλίου φαίνεται στην Εικόνα 7. Ο σχηματισμός των μικκυλίων ακολουθεί τους νόμους της θερμοδυναμικής. Σε υδατικό διαλύτη, η κινητήρια δύναμη για τον σχηματισμό μικκυλίων είναι η υδροφοβικότητα των τασιενεργών ουσιών (24). Οι τασιενεργές ουσίες είναι κυρίως προϊόντα του πετρελαίου, παράγονται σε μεγάλη κλίμακα και έχουν πολλές εφαρμογές. Προϊόντα που περιέχουν τασιενεργές ουσίες είναι τα σαπούνια, οι κρέμες, τα αφρόλουτρα, τα μελάνια, οι κόλλες, τα σαμπουάν, οι μπογιές, οι οδοντόκρεμες κ.α. (25). Οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες μπορούν να παραχθούν είτε συνθετικά, είτε βιολογικά.

ΜΙΚΚΥΛΙΟ



Εικόνα 7: Μικκύλιο τασιενεργών ουσιών στο νερό (26)

Στην Εικόνα 8 φαίνεται η λειτουργία των ουσιών διαφοράς όταν αυτές χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση πετρελαιοκηλίδων. Στην αρχή, τα μέσα διασποράς ψεκάζονται στην πετρελαιοκηλίδα. Έπειτα ο διαλύτης μεταφέρει τις τασιενεργές ουσίες στην ελαιώδη φάση όπου τα μόρια των τασιενεργών ουσιών μεταφέρονται στην διεπιφάνεια πετρελαίου-νερού. Τότε τα σταγονίδια του πετρελαίου απομακρύνονται από την πετρελαιοκηλίδα και διασπείρονται στην υδάτινη φάση (21).



Εικόνα 8: Αρχή λειτουργίας μέσων διασποράς σε περίπτωση πετρελαιοκηλίδας σε θαλάσσιο περιβάλλον (21)

1.7.1 Συνθετικές τασιενεργές ουσίες

Οι συνθετικές τασιενεργές ουσίες αναμινγούνται με μείγμα διαλυτών και χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση του περιβάλλοντος από πετρελαιοκηλίδες. Έχουν την ιδιότητα να μειώνουν την διεπιφανειακή τάση νερού-πετρελαίου, και επομένως, το πετρέλαιο, διασπείρεται στην υδάτινη φάση σε μορφή σταγονιδίων και παρασύρεται με την κίνηση της θάλασσας. Με αυτό τον τρόπο οι οργανισμοί που έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια της θάλασσας (θαλασσοπούλια, θηλαστικά κ.α.), δεν έρχονται σε επαφή με το πετρέλαιο και επιπλέον το πετρέλαιο δεν φτάνει στις ακτογραμμές σε μορφή κηλίδας. Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή έχει σημαντικά μειονεκτήματα. Με την διαλυτοποίηση του πετρελαίου στην υδάτινη φάση και την εισχώρηση των ουσιών διασποράς σε αυτήν, ακολουθεί η αυτόματη υποβάθμισή της. Οι ουσίες διασποράς έχουν πιθανότατα τοξικές επιπτώσεις στους οργανισμούς της θάλασσας και είναι μη βιοδιασπάσιμες. Επιπλέον μπορούν να βιοσυσσωρευτούν και η παραγωγή τους, οι διεργασίες και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα. Η χρήση τους επιτρέπεται υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις και αφού έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές δοκιμές και έχει εγκριθεί η χρήση τους. Από την άλλη, η διαλυτοποίηση του πετρελαίου στην υδάτινη φάση αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου και άρα την επιφάνεια επαφής του με τους μικροοργανισμούς. Με αυτόν τον τρόπο, αν οι ουσίες αυτές δεν είναι ιδιαίτερα τοξικές για το θαλάσσιο περιβάλλον, αναμένεται να αυξάνουν τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου. Άλλη προϋπόθεση για την αύξηση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου είναι να υπάρχουν κατάλληλα θρεπτικά, όπως είναι το άζωτο και το φώσφορο, διαλυμένα στο νερό και έτσι να επιτυγχάνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Λόγω των προβλημάτων που προκύπτουν από την χημική μέθοδο της προσθήκης ουσιών διασποράς, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις τασιενεργές ουσίες βιολογικής προέλευσης. Οι βιοτασιενεργές ουσίες έχουν ελάχιστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και την ικανότητα της διάσπασης ποικίλων οργανικών ρύπων (20).

1.7.2 Τασιενεργές ουσίες βιολογικής προέλευσης (βιοτασιενεργές

ουσίες)

Οι τασιενεργές ουσίες βιολογικής προέλευσης παράγονται από μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων. Τα βακτήρια αυτά ανήκουν ως επί το πλείστον στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Alcanivorax*. Οι βιολογικά παραγόμενες τασιενεργές ουσίες έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τις συνθετικές τασιενεργές ουσίες και οι περισσότερες από αυτές έχουν ανιονικό ή ουδέτερο χαρακτήρα. Ελάχιστες είναι κατιονικές και αποτελούνται κυρίως από αμινομάδες. Το υδρόφοβο τμήμα τους μπορεί να ανήκει σε λιπαρά οξέα με μεγάλη αλυσίδα, όπως στα υδρόξυ-λιπαρά οξέα, ή α-αλκυλ-β-υδροξυ-λιπαρά οξέα. Το υδρόφιλο τμήμα τους μπορεί να είναι καρβοξυλικό οξύ, αμινοξύ, πεπτίδιο, φωσφορική ομάδα ή αλκοόλη. Οι βιοτασιενεργές ουσίες κατατάσσονται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες: (1) γλυκολιπίδια, (2) φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα, (3) λιποπεπτίδια/λιποπρωτεΐνες, (4) πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις (polymeric surfactants) και (5) particulate surfactants (19). Οι βιολογικά επιφανειακά δραστικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από πολλά από τα πλεονεκτήματα των συνθετικά επιφανειακά δραστικών ουσιών, απουσία των μειονεκτημάτων τους (21). Καθώς οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται όλο και πιο αυστηροί και η συνειδητοποίηση για την ανάγκη της προστασίας του οικοσυστήματος αυξάνεται, το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων αντίστοιχα αυξάνεται (19). Οι βιολογικά παραγόμενες τασιενεργές ουσίες είναι μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις, που μπορούν να παραχθούν επικερδώς υπό *ex situ* συνθήκες. Η *in situ* παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών μπορεί να υποκινηθεί στη περιοχή της ρύπανσης και οι ουσίες αυτές μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν. Επιπρόσθετα έρευνες έχουν δείξει την δραστική ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να σταθεροποιούν νερό σε πετρέλαιο γαλακτώματα με τη χρήση λιγότερο από 1% επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (κατ' όγκο) (19).

Η επαφή των μικροοργανισμών με τους υδρογονάνθρακες γίνεται με έναν ή περισσότερους από τους τρεις μηχανισμούς που ακολουθούν:

1. Πρόσληψη των διαλυμένων υδρογονανθράκων στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να λειτουργεί σε υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας (21).
2. Άμεση επαφή με τα σταγονίδια ή τις επιφάνειες της αδιάλυτης φάσης (19).
3. Αλληλεπίδραση με υδρογονάνθρακες οι οποίοι έχουν υποστεί «διάλυση» ύστερα από την εφαρμογή τασιενεργών ουσιών (19).

Οι τασιενεργές ουσίες βιολογικής προέλευσης παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς αυτούς. Δηλαδή, πρώτα προσαρτώνται στην επιφάνεια του κυττάρου για να ενισχύσουν την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο πετρέλαιο και έπειτα εκκρίνονται στο μέσο για να ενισχύσουν την «ψευδοδιαλυτοποίηση» (19).

Η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των υδρογονανθράκων με την προσθήκη τασιενεργών ουσιών ακολουθεί την εξής διαδικασία:

1. Μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υδατικής και μη-υδατικής φάσης.
2. Αύξηση της διαλυτότητας των υδρογονανθράκων. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως διαλυτοποίηση και προκαλείται από την παρουσία μικκυλίων. Η διαλυτοποίηση εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση της τασιενεργής ουσίας, την υδροφοβικότητα, τις αλληλεπιδράσεις θαλασσινού νερού-δραστικής ουσίας και τον χρόνο παραμονής του ρύπου στη θάλασσα.
3. Ορισμένες από αυτές διευκολύνουν στην προσκόλληση ή την αποκόλληση των μικροοργανισμών από την επιφάνεια του ρύπου, επηρεάζοντας την υδροφοβικότητα της επιφάνειας των κυττάρων ή των ρυπογόνων ενώσεων (21).

Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη τασιενεργών ουσιών διευκολύνει τη βιοαποικοδόμηση ρυπογόνων ουσιών, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η προσθήκη έχει αρνητικές συνέπειες. Αυτό οφείλεται στην προσρόφηση των τασιενεργών ουσιών, στο ότι οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά υποστρώματα από τους μικροοργανισμούς, στην αυξημένη τοξικότητα των ρύπων λόγω της υψηλής βιοδιαθεσιμότητας τους και τέλος στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των ρύπων καθώς αυτοί δεσμεύονται σε μικκύλια (21).

Στον Πίνακα 2 Πίνακας 2 φαίνονται τα είδη και οι ποσότητες βιοτασιενεργών ουσιών που παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς με διάφορες πηγές άνθρακα.

Πίνακας 2: Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα (27)

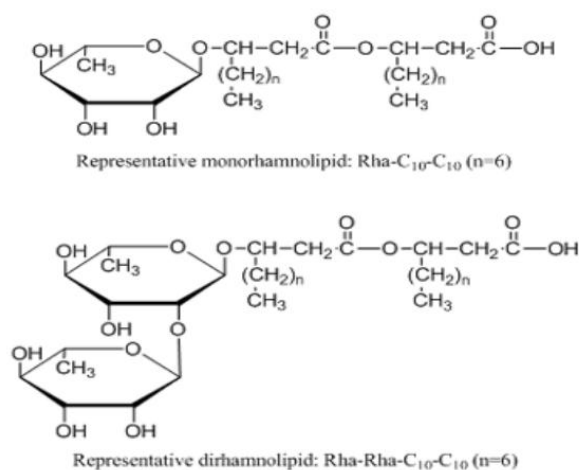
Βιοτασιενεργή ουσία	Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Παραγωγή BSs (g/L)
Surfactin	Bacillus subtilis ATCC 21332	Γλυκόζη	6,45
Surfactin + Fengycin	B. circulans	Γλυκόζη	6,98
Lipopedtide	B. subtilis C9	Γλυκόζη	7,0
Sophorolipid	Candida bombicola ATCC 22214	Λακτόζη + έλαιο κράμβης	422
Sophorolipid	C. bombicola ATCC 22214	Γλυκόζη + λίπη	120
Rhamnolipid	P. aeruginosa DSM 7107	Σογιέλαιο	112
Rhamnolipid	P. aeruginosa UI 29791	Καλαμποκέλαιο	46
Trehaloselipid	Rhodococcus erythropolis DSM 43215	Mihagol L	32
Trehaloselipid	Rhodococcus wratislaviensis BN38	Hexadecane	3,1
Mannosylerythritol lipid + Cellobiose lipid	Ustilago maydis	Γλυκόζη	23

1.7.1.1 Ραμνολιπίδια (RLs)

Τα Ραμνολιπίδια ανήκουν στην κατηγορία των Γλυκολιπιδίων. Σήμερα, τα Ραμνολιπίδια θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικές βιοτασιενεργές ενώσεις. Η συνήθης χημική τους δομή είναι τα monorhamnolipids, αποτελούμενα από ένα μόριο ραμνόζης και δύο μόρια β-υδροξυδεκανοϊκού οξέος και τα dirhamnolipids, στα οποία δύο μόρια ραμνόζης συνδέονται με δύο μόρια β-υδροξυδεκανοϊκού οξέος. Ραμνολιπίδια που περιέχουν μόνο μία αλυσίδα β-υδροξυδεκανοϊκού οξέος συνδεόμενα με ένα ή δύο μόρια ραμνόζης έχουν επίσης αναφερθεί.

Τα Ραμνολιπίδια μπορούν να μειώσουν την επιφανειακή τάση του νερού από 72mN/m σε 30 mN/m και τη διεπιφανειακή τάση του νερού-ελαίου σε τιμές < 1 mN/m. Πρόκειται για ασθενή οξέα, λόγω της χαρακτηριστικής ομάδας καρβοξυλικού οξέος και είναι γνωστό ότι υφίστανται συσσωμάτωση σε διαλύματα. Τα Ραμνολιπίδια παρουσιάζουν όλες τις βασικές ιδιότητες των βιοτασιενεργών

ουσιών. Δηλαδή, τις ιδιότητες της απορρύπανσης, του αφρισμού, της γαλακτωματοποίησης, της απογαλακτωματοποίησης, της διαλυτοποίησης, της διαβροχής, της πύκνωσης, της απομόνωσης μετάλλων, του σχηματισμού κυστιδίων και της διασποράς φάσεων. Έτσι το φάσμα των εφαρμογών τους στο περιβάλλον, στα τρόφιμα, στη γεωργία, στα καλλυντικά και σε φαρμακευτικές χρήσεις, είναι δυνητικά τόσο εκτεταμένες όσο οι ιδιότητές τους (28). Η παραγωγή των Ραμνολιπιδίων εξαρτάται από τις πηγές άνθρακα και άλλων θρεπτικών υλικών καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH, τη θερμοκρασία και το οξυγόνο (21).



Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικοί τύποι monorhamnolipid και dirhamnolipid (28)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για την παραγωγή των βιοτασιενεργών (BSs) ουσιών χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί που είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από περιοχή ρυπασμένη με πετρελαιοειδή.

2.1.1 Επιλογή μικροοργανισμών

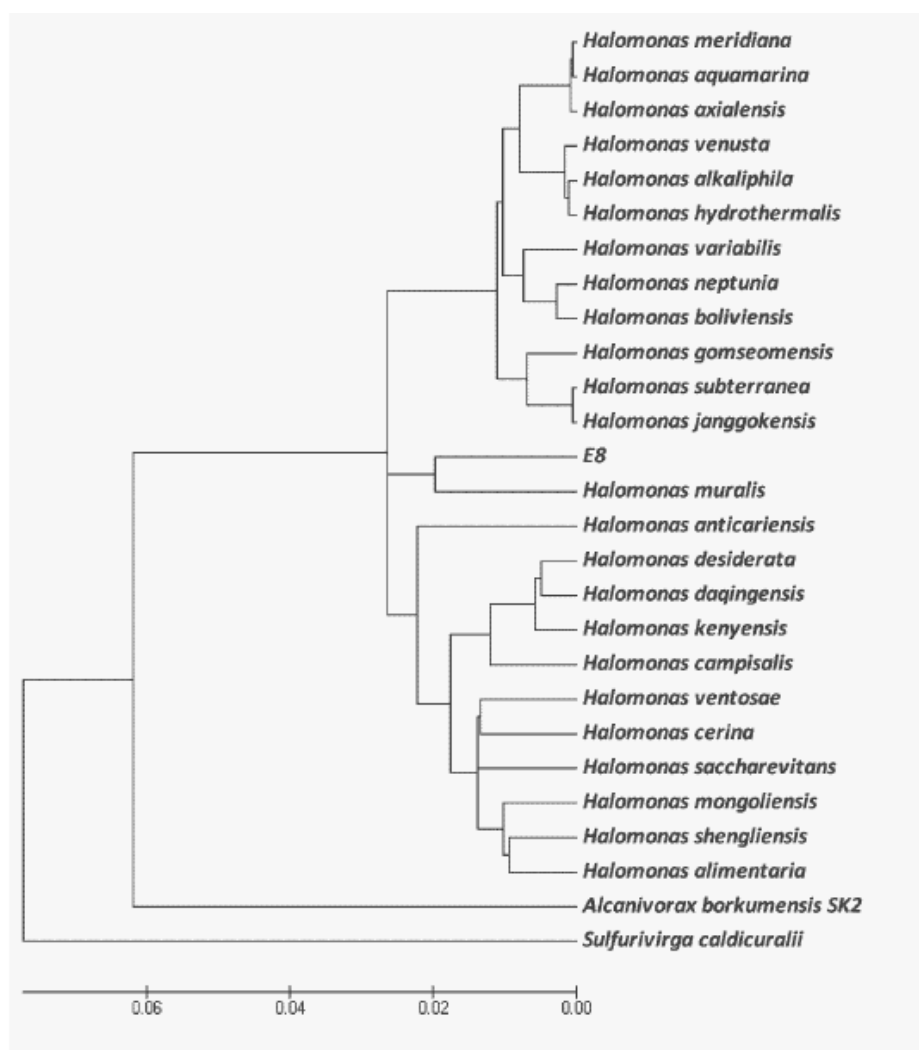
Η υδροφοβικότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της κάθε κοινότητας, καθώς βάσει αυτού του μεγέθους μπορεί να γίνει μία έμμεση εκτίμηση παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών. Η κοινότητα με τον κωδικό E8, από παλαιότερη μελέτη, έχει δείξει πολύ μεγάλο ποσοστό υδροφοβικότητας, το οποίο φτάνει το 67% (21). Έτσι επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μικροβιακή κοινότητα. Το φυλλογενετικό δέντρο της μικροβιακής κοινότητας E8 δίνεται στην Εικόνα 10.

Από το φυλλογενετικό αυτό δέντρο, διαπιστώθηκε ότι ο απομονωμένος μικροοργανισμός με τον κωδικό Υ παρουσιάζει ομοιότητα με τον μικροοργανισμό *Alcanivorax borkumensis* SK2. Το βακτήριο αυτό συγκαταλέγεται στο γένος *Alcanivorax* και είναι ένα κατά gram αρνητικό βακτήριο. Τα βακτήρια αυτού του γένους αποτελούν τους πιο γνωστούς αποικοδομητές αλκανίων και ταυτόχρονα, παράγουν σε μεγάλη κλίμακα βιοτασιενεργές ουσίες και σχηματίζουν βιοφίλμ. Έτσι θεωρήθηκε εύλογο να χρησιμοποιηθεί αυτός ο μικροοργανισμός για το συγκεκριμένο πείραμα. Στην Εικόνα 11 φαίνεται ο μηχανισμός αποικοδόμησης του πετρελαίου από το γένος *Alcanivorax*.

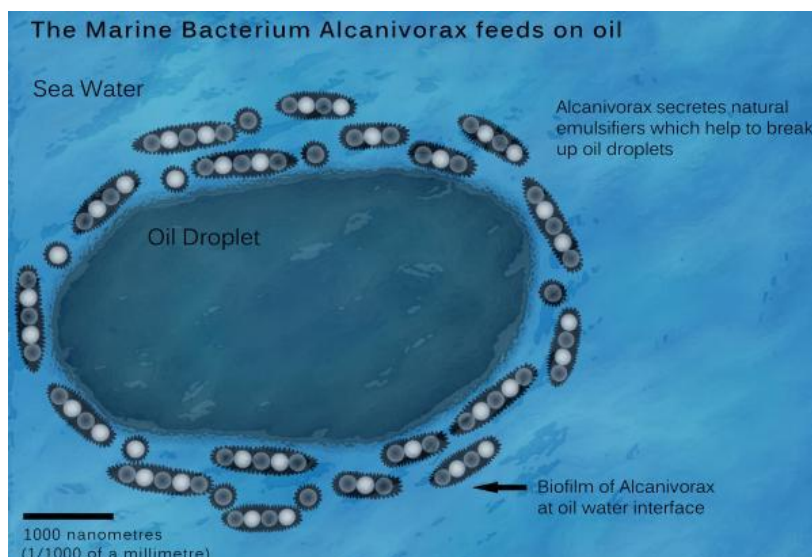
Ο απομονωμένος μικροοργανισμός με τον κωδικό ESPA προήλθε από ρυπασμένο με πετρελαιοειδή ίζημα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ταυτοποιήθηκε με τον μικροοργανισμό *Paracoccus marcusii* του γένους *Paracoccus* και της οικογενείας

Rhodobacteraceae. Πρόκειται για ένα κατά gram αρνητικό βακτήριο. Σε προγενέστερη μελέτη είχε διαπιστωθεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός προσκολλάται στην ελαιώδη φάση περισσότερο από ότι στην υδάτινη. Έτσι θα μπορούσε με περαιτέρω μελέτη ίσως να διαπιστωθεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός αποτελεί την βέλτιστη λύση για την βιοαποκατάσταση ρυπασμένων θαλάσσιων περιοχών, μιας και η βιομάζα του θα ήταν προσκολλημένη στην ελαιώδη φάση και δεν θα υπόκειται σε αραίωση λόγω των θαλάσσιων ρευμάτων (29). Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε να γίνει περισσότερη έρευνα πάνω σε αυτόν τον μικροοργανισμό σε σχέση με την παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών.

Οι μικροοργανισμοί που αναφέρθηκαν ήταν αποθηκευμένοι στην κατάψυξη από το 2013 σε διάλυμα γλυκερόλης 30% και διάλυμα ONR7.



Εικόνα 10: Φυλογενετικό δέντρο της μικροβιακής κοινότητας E8 (21)



Εικόνα 11: Ο μικροοργανισμός *Alcanivorax* κατά την βιοαποικοδόμηση πετρελαίου (30)

2.1.2 Καλλιέργεια μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί έπειτα από απόψυξη, καλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες ούτως ώστε να αυξηθεί ο πληθυσμός τους και να καταγραφεί η καμπύλη ανάπτυξής τους.

Οι μικροβιακή κοινότητα E8 και ο απομονωμένος από αυτήν μικροοργανισμός Y καλλιεργήθηκαν σε τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7 όπου προστέθηκαν φωσφόρο και άζωτο ως θρεπτικά και αργό πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα (σε αναλογία C:N:P=100:10:1). Η αναλογία της πηγής άνθρακα και του όγκου της υγρής καλλιέργειας ήταν 0,5%w/v.

Ο απομονωμένος μικροοργανισμός ESPA καλλιεργήθηκε σε διάλυμα ZOBELL MARINE 2216.

Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών έγιναν σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως των 400ml. Η ετοιμασία των καλλιεργειών έγινε με την χρήση αποκλειστικά και μόνο αποστειρωμένων σκευών και κάτω από αποστειρωμένο απαγωγέα με φλόγα. Έπειτα οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 20°C και αναδευόταν συνεχόμενα στις 120rpm.

Αναλογίες διαλυμάτων για τα δείγματα E8 και Y:

190ml διαλύματος ONR7,
10ml διαλύματος NP,
1,25ml Αργό πετρέλαιο (πυκνότητας 0,8g/ml) και
2ml μικροοργανισμών έπειτα από απόψυξη.

Αναλογίες διαλυμάτων για το δείγμα ESPA:

200ml διαλύματος ZOBELL MARINE 2216 και
0,5ml μικροοργανισμών έπειτα από απόψυξη.

Για την δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών μετρήθηκαν σε καθημερινή βάση η οπτική απορρόφηση (OD) και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών κάθε καλλιέργειας (CFUs/ml) μέσω της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων.

Παρασκευή διαλύματος ONR7:

Για την παρασκευή του τεχνητού θαλασσινού νερού ONR7 παρασκευάστηκαν αρχικά τρία πυκνά διαλύματα (5x). Όλα τα διαλύματα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε θερμοκρασία 120°C και σε πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

Διάλυμα 1 (σε 1L H₂O)

NaCl	113,95g
Na ₂ SO ₄	19,9g
KCl	3,6g
NaBr	415mg
NaHCO ₃	155mg
H ₃ BO ₃	135mg
NaF	13mg
NH ₄ Cl	0,35g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	445mg
TAPSO	6,5g

Διάλυμα 2 (σε 500ml H₂O)

MgCl ₂ x 6H ₂ O	55,9g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	7,3g
SrCl ₂ x 6H ₂ O	120mg

Διάλυμα 3 (σε 100ml H₂O)

FeC ₂ x 4H ₂ O	10mg
--------------------------------------	------

Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος ONR7 ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Ανάμειξη 200ml από το διάλυμα 1 με 133ml απιονισμένου νερού και ρύθμιση του pH στο 7,6 με χρήση διαλύματος NaOH (2M).
2. Προσθήκη 100ml από το διάλυμα 2.
3. Προσθήκη 20ml από το διάλυμα 3.
4. Προσθήκη 446ml απιονισμένου νερού.

Το τελικό διάλυμα ONR7 αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

Παρασκευή διαλύματος NP:

Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος επιλέχθηκε η συγκέντρωση του αζώτου να είναι 10g/L και η συγκέντρωση του φωσφόρου να είναι 1g/L.

Χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό τα άλατα KNO₃ και K₂HPO₄ μοριακού βάρους 101,10g/mol και 174,18g/mol αντίστοιχα. Το ποσοστό που περιλαμβάνει το άζωτο και ο φώσφορος στις ενώσεις αυτές είναι 14,15% και 53,94% αντίστοιχα. Επομένως για να προκύψουν 10g N και 1g P χρειάστηκαν 71,44g KNO₃ και 3,23g K₂HPO₄ τα οποία διαλύθηκαν σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού. Το διάλυμα NP αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

Παρασκευή διαλύματος ZOBELL MARINE 2216:

Σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού διαλύθηκαν 40,25g ZOBELL MARINE BROTH 2216. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

Στοιχεία αργού πετρελαίου (CO):

Όσον αφορά στο αργό πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα, αυτό προήλθε από το Καζακστάν. Πριν την χρήση του ως θρεπτικό για τους μικροοργανισμούς, το πετρέλαιο αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

2.1.3 Μέθοδος οπτικής απορρόφησης

Το φως αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα που όταν αλληλεπιδρούν με την ύλη απορροφούνται, σκεδάζονται, ανακλώνται ή διαδίδονται μέσα σε αυτή. Μετρώντας την απορρόφηση μιας δέσμης φωτός, συγκεκριμένου μήκους κύματος, από ένα δείγμα και κατασκευάζοντας την καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης, μπορούμε να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα για τη συγκέντρωση μιας ουσίας που περιέχεται στο δείγμα (31). Έτσι μετρώντας την απορρόφηση μιας δέσμης φωτός 600nm για ένα δείγμα μικροοργανισμών, μπορεί έμμεσα να προσδιοριστεί η κυτταρική ανάπτυξη τους. Η οπτική απορρόφηση (OD) είναι ένα αδιάστατο μέγεθος και συχνά συμβολίζεται με ABS. Η μέθοδος αυτή, είναι λιγότερο ακριβής λόγω του ότι λαμβάνει υπόψη νεκρά κύτταρα, και στις καλλιέργειες με το αργό πετρέλαιο, λαμβάνει υπόψη και την οπτική απορρόφηση του διαλυμένου πετρελαίου.

2.1.4 Καλλιεργητική μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Η καλλιεργητική μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν στην καλλιέργεια, όταν επιστρωθούν σε κατάλληλο στέρεο θρεπτικό μέσο, σχηματίζουν ορατές και ξεχωριστές αποικίες (21). Μονάδα μέτρησης των αποικιών είναι το CFU (colony forming units). Λόγω της συνήθους υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στα δείγματα, για την εφαρμογή της μεθόδου θα πρέπει να γίνουν κατάλληλες αραιώσεις. Οι αραιώσεις έγιναν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (buffer NaCl). Σε περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στον όγκο του δείγματος που πρόκειται να επιστρωθεί στο στέρεο υπόστρωμα, οι αποικίες που θα σχηματιστούν θα επικαλύπτονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατο το μέτρημά τους. Σκοπός είναι οι αριθμός των αποικιών σε κάθε τρυβλίο Πετρί να είναι από 30 έως 300. Για λόγους μεγαλύτερης ακρίβειας, γίνεται επίστρωση τριών συνεχόμενων αραιώσεων και από δύο φορές η κάθε αραιώση. Οι αραιώσεις αυτές, διαφέρουν συνήθως κατά μία τάξη μεγέθους η μία από την άλλη. Έτσι για παράδειγμα, θα αναμενόταν στο πιο πυκνό διάλυμα να μετρηθούν 220 αποικίες, στο αμέσως πιο

αραιό 22 και στο αραιότερο 2 με 3. Τα τρυβλία Πετρί που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια σε στέρεο υπόστρωμα, είχαν ως θρεπτικό ZOBELL MARINE AGAR και παρέμεναν για επώαση 96 ώρες στους 20°C.

Παρασκευή στέρεου υποστρώματος ZOBELL MARINE AGAR:

Για την παρασκευή του θρεπτικού αυτού υποστρώματος, σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 40,25g ZOBELL MARINE BROTH 2216 και 15g Agar. Το διάλυμα αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά και έπειτα, όντας ακόμα ζεστό και ρευστό, τοποθετήθηκε μέσα σε τρυβλία όπου κρυσταλλώνοντας στερεοποιήθηκε.

Παρασκευή διαλύματος Buffer NaCl:

Σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού διαλύθηκαν 8,5gr NaCl. Μετά την παρασκευή το διάλυμα αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

2.1.5 Απομόνωση μικροοργανισμών μέσω στέρεου υποστρώματος

Όσον αφορά στους απομονωμένους μικροοργανισμούς Υ και ESPA, διαπιστώθηκε ότι είχαν επιμολυνθεί με άλλους μικροοργανισμούς και έτσι ακολούθησε η απομόνωσή τους. Η επιμόλυνση ενός δείγματος απομονωμένου μικροοργανισμού φαίνεται όταν εμφανιστούν διαφορετικών ειδών αποικίες σε ένα τρυβλίο Πέτρι όπου έχει καλλιεργηθεί το δείγμα. Για την απομόνωση του μικροοργανισμού αυτού, με την χρήση ενός κρίκου, παίρνεται μία καθαρή αποικία του. Η αποικία αυτή διαλύεται σε μία σταγόνα θρεπτικού μέσου ONR7 και έπειτα με την βοήθεια του κρίκου επιστρώνεται λίγο από το διάλυμα της σταγόνας σε τρυβλίο Πέτρι με στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα MARINE BROTH AGAR. Το τρυβλίο Πέτρι αυτό αφήνεται για επώαση στους 20°C για περίπου 96 ώρες.

2.2 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών

2.2.1 Επιλογή βαρέως κλάσματος αργού πετρελαίου ως πηγή

άνθρακα

Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου (Heavy Oil Fraction, HOF) ως πηγή άνθρακα για τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών καθώς το HOF σχηματίζει μια στερεή 'σε μορφή πλαστελίνης', στρώση επάνω στην επιφάνεια της υγρής φάσης όπως φαίνεται στην Εικόνα 12. Από αυτή την ιδιότητα του κλάσματος αυτού, δημιουργήθηκε η ιδέα, ότι οι μικροοργανισμοί θα μπορούσαν ίσως να παράγουν περισσότερες βιοτασιενεργές ουσίες λόγω της ανάγκης τους να διαλυτοποιήσουν το πετρέλαιο. Επιπλέον, αν τελικά τους ήταν αδύνατο να διαλύσουν το HOF, οι τασιενεργές ουσίες θα βρισκόντουσαν στην υδάτινη φάση χωρίς την προσθήκη πετρελαίου και έτσι η απομόνωση τους θα ήταν αρκετά ευκολότερη. Δηλαδή θα γινόταν παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών υψηλής καθαρότητας. Αυτή ήταν η κύρια ιδέα για την διεκπεραίωση των πειραμάτων.



Εικόνα 12: Μορφή βαρέως κλάσματος αργού πετρελαίου στην καλλιέργεια

Τα χαρακτηριστικά του βαρέως κλάσματος πετρελαίου χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Στοιχεία βαρέως κλάσματος πετρελαίου χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο (HOF)

General Data	
Substance:	Chemical Name: Residues (petroleum), topping plant, low-sulfur
	CAS Number: 68607-30-7
	EC Number: 265-045-2
	Other Name(s):
Producer:	Company: HELLENIC PETROLEUM S.A.
	Site: <u>Aspropyrgos</u> Industrial Installations
Sample:	Name of sample: SRAR U-2000 (Sarir), (Sample B)
	Quality Certificate SN:
	LIMS ID No:
	Place of sampling: SRAR stream in U-2000
	Batch / Tank / Unit: Unit U-2000
	Date of production: 26/04/2010

2.2.2 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση

θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια

Σε αυτό το πείραμα καλλιεργήθηκαν η μικροβιακή κοινότητα E8 και οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί Υ και ESPA. Οι καλλιέργειες έγιναν σε θρεπτικό μέσω ONR7 με την προσθήκη αζώτου και φωσφόρου και με πηγή άνθρακα βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου (HOF). Ανά αόριστα τακτά χρονικά διαστήματα (1-7 ημερών) αφαιρούνταν από την υγρή φάση κάθε καλλιέργειας 25ml με σκοπό την μέτρηση της ποσότητας των βιοτασιενεργών ουσιών. Τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούσαν σε κάθε δειγματοληψία ήταν εσκεμμένα αόριστα. Σκοπός ήταν να βρεθεί το κατάλληλο χρονικό διάστημα για την αφαίρεση υλικού, στο οποίο θα είχαν επανέλθει στην καλλιέργεια η συνθήκες που επικρατούσαν κατά προηγούμενη δειγματοληψία. Μετά από κάθε δειγματοληψία γινόταν αναπλήρωση του όγκου που απομακρύνθηκε με ONR7 και την αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου ώστε η αναλογία τους προς τον άνθρακα να ήταν ίση της αρχικής (δηλαδή C:N:P = 100:10:1). Παράλληλα με την διαδικασία συλλογής του δείγματος γινόταν και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης για την εκτίμηση της βιομάζας και σε κάποιες περιπτώσεις εφαρμόστηκε και η καλλιεργητική μέθοδος

των διαδοχικών αραιώσεων για να διαπιστωθούν τυχόν αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες.

Ο σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να βρεθεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται από την καλλιέργεια έτσι ώστε να αναπληρωθούν οι βιοτασιενεργές ουσίες που αφαιρέθηκαν. Αυτό, έγινε με απώτερο σκοπό να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της παροχής που θα μπορούσε να έχει ένας βιοαντιδραστήρας παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών συνεχούς ροής.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια της μικροβιακής κοινότητας E8:

200ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

15ml από την αρχική καλλιέργεια E8 με OD=0,9655 ABS

Έπειτα από καλλιέργεια δείγματος σε στέρεο υπόστρωμα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών ανά ml.

$$\frac{49 \text{ CFU}}{0,1\text{ml}_{(\text{αραίωσης } 10^{-6})}} * 10^6 = 49 * 10^7 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$$

Στα 15 ml θα είναι $735 * 10^7$ CFUs.

Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε 210ml διαλύματος προέκυψε περίπου συγκέντρωση ίση με $3,5 * 10^7$ CFUs/ml.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια του απομονωμένου μικροοργανισμού Υ:

190ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

10 ml από την προηγούμενη καλλιέργεια του μικροοργανισμού Υ με OD=0,8157 ABS

Έπειτα από καλλιέργεια δείγματος σε στέρεο υπόστρωμα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών ανά ml.

$$\frac{224 \text{ CFU}}{0,1\text{ml}_{(\text{αραίωσης } 10^{-3})}} * 10^3 = 2,24 * 10^6 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$$

Στα 10 ml θα είναι $2,24 \cdot 10^7$ CFU.

Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε 200ml διαλύματος προέκυψε περίπου συγκέντρωση ίση με $1,12 \cdot 10^5$ CFU/ml.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια του απομονωμένου μικροοργανισμού

ESPA:

200ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

10 ml από την προηγούμενη καλλιέργεια του μικροοργανισμού ESPA με OD=2,3451

ABS

Για τον μικροοργανισμό ESPA σε δεύτερη καλλιέργεια, αντί για HOF προστέθηκε CO.

Οι αναλογίες των διαλυμάτων ήταν όμοιες και στις δύο καλλιέργειες.

Έπειτα από καλλιέργεια δείγματος σε στέρεο υπόστρωμα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών ανά ml.

$$\frac{170CFU}{0,1ml_{(αραίωσης 10^{-5})}} * 10^5 = 1,7 * 10^8 \frac{CFU}{ml}$$

Στα 10 ml θα είναι $1,7 \cdot 10^9$ CFU.

Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε 200ml διαλύματος προέκυψε συγκέντρωση περίπου ίση με $8,5 \cdot 10^7$ CFU/ml.

Για την ζύγιση του βαρέως κλάσματος πετρελαίου, αυτό πρώτα θερμάνθηκε στους 200°C.

Ο όγκος που πάρθηκε σε κάθε περίπτωση από προηγούμενη καλλιέργεια μικροοργανισμών φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 7000 στροφές. Η πελέτα (pellet) που σχηματίστηκε πλύθηκε σε θρεπτικό μέσω ONR7 και φυγοκεντρήθηκε ξανά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 2 φορές. Στην τελική καλλιέργεια προστέθηκε κάθε φορά μόνο η πελέτα των μικροοργανισμών.

Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών έγιναν σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως των 400ml. Η ετοιμασία των καλλιεργειών έγινε με την χρήση αποκλειστικά και μόνο αποστειρωμένων σκευών και κάτω από αποστειρωμένο απαγωγέα με φλόγα.

Έπειτα, οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 20°C και αναδευόταν συνεχόμενα στις 120rpm.

2.2.3 Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς την αναπλήρωση

Θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια

Σε αυτό το πείραμα δημιουργήθηκαν ξανά καλλιέργειες των E8, Y και ESPA σε θρεπτικό μέσω ONR7 με την προσθήκη θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου και με πηγή άνθρακα HOF. Σε αυτή την περίπτωση αφαιρούταν, ανά ίσα χρονικά διαστήματα, 20ml ποσότητας από την υγρή φάση της κάθε καλλιέργειας για την μέτρηση της ποσότητας των βιοτασιενεργών ουσιών. Δεν ακολουθούσε αναπλήρωση του όγκου αυτού. Η ανάπτυξη της βιομάζας παρακολουθήθηκε με τακτική μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των καλλιεργειών.

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να διαπιστωθεί για κάθε καλλιέργεια σε ποιά χρονική στιγμή, ή σε ποιά τιμή της οπτικής απορρόφησης, παρατηρείται η μέγιστη ποσότητα βιοτασιενεργών ουσιών στην υδάτινη φάση. Για λόγους ακριβείας, κάθε καλλιέργεια έγινε τρεις φορές.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια της μικροβιακής κοινότητας E8:

190ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

10ml από προηγούμενη καλλιέργεια της μικροβιακής κοινότητας E8 με OD=0,7568 ABS.

Βάσει της οπτικής απορρόφησης εκτιμάται συγκέντρωση μικροοργανισμών να είναι ίση με $2 \cdot 10^8$ CFUs/ml. Στα 10ml θα είναι $2 \cdot 10^9$ CFUs/ml. Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε καλλιέργεια των 200ml προκύπτει αρχική συγκέντρωση ίση με $1 \cdot 10^7$ CFUs/ml.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια του απομονωμένου μικροοργανισμού Υ:

190ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

7ml από προηγούμενη καλλιέργεια της μικροβιακής κοινότητας Υ με OD=0,2600

ABS.

Βάσει της οπτικής απορρόφησης εκτιμάται συγκέντρωση μικροοργανισμών να είναι ίση με $4 \cdot 10^6$ CFUs/ml. Στα 7ml θα είναι $2,8 \cdot 10^7$ CFUs/ml. Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε καλλιέργεια των 200ml προκύπτει αρχική συγκέντρωση ίση με $1,4 \cdot 10^5$ CFUs/ml.

Αναλογίες διαλυμάτων για την καλλιέργεια του απομονωμένου μικροοργανισμού

ESPA:

190ml διαλύματος ONR7,

10ml διαλύματος NP,

1gr HOF χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο και

0,6ml από προηγούμενη καλλιέργεια της μικροβιακής κοινότητας ESPA με

OD=0,9873 ABS.

Βάσει της οπτικής απορρόφησης εκτιμάται συγκέντρωση μικροοργανισμών να είναι ίση με $2 \cdot 10^8$ CFUs/ml. Στα 0,6ml θα είναι $1,2 \cdot 10^8$ CFUs/ml. Αραιώνοντας τους μικροοργανισμούς αυτούς σε καλλιέργεια των 200ml προκύπτει αρχική συγκέντρωση ίση με $6 \cdot 10^5$ CFUs/ml.

2.3 Απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών

Για την απομόνωση των βιοτασιενεργών ουσιών από το κάθε δείγμα έπρεπε να διαχωριστούν αρχικά τα κύτταρα από την υγρή φάση και έπειτα οι βιοτασιενεργές ουσίες. Το βαρύ κλάσμα πετρελαίου δεν διαλυτοποιείται στην υγρή φάση αλλά επιπλέει στην επιφάνεια (σαν μια ζελατίνα). (Υπάρχει διαλυτοποίηση του HOF μετά από αρκετές μέρες αλλά σκοπός είναι η απομόνωση των βιοτασιενεργών ουσιών να γίνει νωρίτερα).

Όσον αφορά στην παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τους μικροοργανισμούς που επιλέχθηκαν, παλαιότερη έρευνα έχει δείξει ότι η μέγιστη παραγωγή αποτελείται από Γλυκολιπίδια και για την ακρίβεια, από Ραμνολιπίδια (21). Η απομόνωση των Ραμνολιπιδίων έγινε με την μέθοδο της εκχύλισης (solvent extraction).

2.3.1 Απομόνωση Ραμνολιπιδίων με εκχύλιση

Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Απομάκρυνση κυττάρων με φυγοκέντριση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά.
2. Μείωση του pH στο 3 με διάλυμα HCl 2M και μεταφορά του δείγματος σε διαχωριστική χοάνη των 100ml.
3. Τριπλή εκχύλιση του δείγματος με ίσου όγκου ποσότητας οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate). Σε αυτό το στάδιο απαιτείται καλή ανάμιξη του διαλύτη με το δείγμα και έπειτα αναμονή για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων.
4. Μεταφορά της ανώτερης στιβάδας (στιβάδας οξικού αιθυλεστέρα) σε κωνική φιάλη με θειικό μαγνήσιο (0,5g ανά 100ml οξικού αιθυλεστέρα) για την απορρόφηση, από το αλάτι, τυχόν υγρασίας.
5. Φιλτράρισμα της ανώτερης στιβάδας από φίλτρο Whatman nr 125.
6. Εκχύλιση της κατώτερης στιβάδας άλλες δύο φορές. (32)

Μέσω της εκχύλισης, τα Ραμνολιπίδια περνούν στον διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας). Έπειτα ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Για την μέτρηση της μάζας των Ραμνολιπιδίων ζυγίζεται άδειο μπουκαλάκι των 4ml και έπειτα μεταφέρονται σε αυτό, με την χρήση οξικού αιθυλεστέρα, τα Ραμνολιπίδια. Στην συνέχεια εξατμίζεται ο νέος διαλύτης και ζυγίζεται ξανά το μπουκαλάκι. Η διαφορά μάζας των δύο ζυγισμάτων είναι η μάζα των Ραμνολιπιδίων. Τέλος, ακολουθεί αναγωγή αυτής της μάζας σε 1L δείγματος.

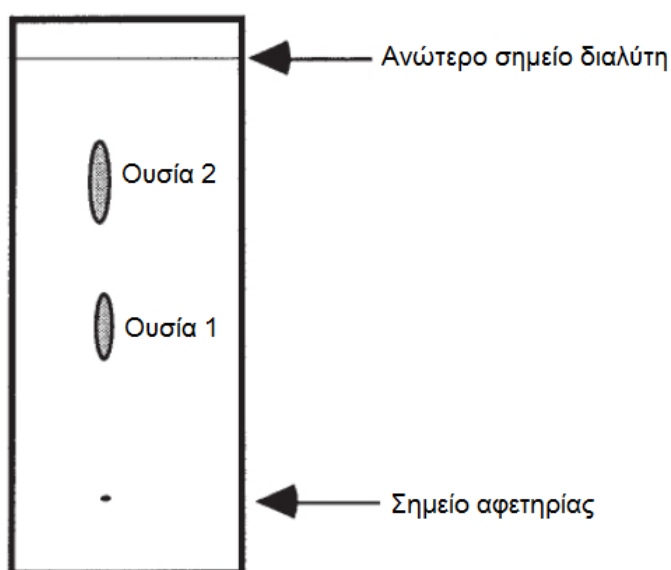
2.4 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι μία χρήσιμη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ουσιών. Πρόκειται ουσιαστικά για τον διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ δύο φάσεων, της κινητής υγρής φάσης και της στατικής στερεής φάσης μεγάλης επιφάνειας (high surface area). Η στατική φάση, συνήθως, αποτελείται από γέλη πυριτίου (silica gel, SiO_2) ή λιγότερο συχνά από οξείδιο αργιλίου και είναι τοποθετημένη σε γυαλί ή μέταλλο. Η κινητή φάση αποτελείται από κάποιο πτητικό οργανικό διάλυμα (33).

Για τον χαρακτηρισμό των Ραμνολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Διαλυτοποίηση μικρής ποσότητας δείγματος σε χλωροφόρμιο και τοποθέτηση μιας σταγόνας 10μl κοντά στο κάτω άκρο πλάκας (περίπου 2cm από το κάτω άκρο) επιστρωμένης με γέλη πυριτίου. Το σημείο τοποθέτησης θεωρείται ως το σημείο αφετηρίας.
2. Για την εξακρίβωση του είδους του Ραμνολιπιδίου, θα πρέπει να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της λεπτής χρωματογραφίας στήλης με αποτελέσματα από τυποποιημένα Ραμνολιπίδια.
3. Όταν στεγνώσει η σταγόνα πάνω στο υλικό, η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό δοχείο με σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:οξικό αιθυλεστέρα (6,5:1,5:0,2, v/v/v). Οι διαλύτες θα πρέπει να έχουν παραμείνει τουλάχιστον 10min στο δοχείο προκειμένου ο υπερκείμενος αέρας μέσα στο δοχείο να είναι κορεσμένος από αυτούς. Επιπλέον, η στάθμη των διαλυτών μέσα στο δοχείο θα πρέπει να είναι μικρότερου ύψους από το ύψος τοποθέτησης του δείγματος πάνω στην πλάκα (από το σημείο αφετηρίας).
4. Η πλάκα αφήνεται μέσα στο δοχείο έως οι διαλύτες την εμποτίσουν μέχρι σχεδόν το πάνω άκρο της. Η εμποτίση λαμβάνει χώρα χάρη στα τριχοειδή φαινόμενα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της πλάκας. Η ταχύτητα αυτή είναι ανάλογη της πολικότητας της κάθε ουσίας. Μετά την αφαίρεση της πλάκας από το δοχείο ακολουθεί το στέγνωμά της κάτω από ρεύμα αέρος.

5. Δημιουργία αντιδραστήριου anthrone reagent με την μίξη 63ml θειικού οξέως, 25ml απιονισμένου νερού και 0,125g anthrone. Πρόκειται για μία έντονα εξώθερμη αντίδραση άρα θα πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες ψύχους. Το αντιδραστήριο αυτό είναι απαραίτητο για την εμφάνιση των κηλίδων πάνω στην πλάκα.
6. Ψεκασμός της πλάκας με anthrone reagent και τοποθέτησή της πάνω σε αναμμένο μάτι θερμοκρασίας 110°C για περίπου 20min.
7. Η πλησιέστερη στο σημείο αφετηρίας κηλίδα που θα εμφανιστεί, αντιπροσωπεύει τα Διραμνολιπίδια (Dirhamnolipids) ενώ η κηλίδα σε μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο αφετηρίας αντιπροσωπεύει τα Μονοραμνολιπίδια (Monorhamnolipid).
8. Στο τυποποιημένο δείγμα των Ραμνολιπιδίων μετράμε τις αποστάσεις από το σημείο εκκίνησης του δείγματος έως την εμφανιζόμενη κηλίδα και από το σημείο εκκίνησης του δείγματος έως το σημείο που έφτασε το μίγμα των διαλυτών. Αυτή η διαδικασία γίνεται και για τα Διραμνολιπίδια και για τα Μονοραμνολιπίδια και υπολογίζεται για κάθε δείγμα ο συντελεστής RF βάσει αυτών των αποστάσεων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα πειραματικά δείγματα και οι πειραματικοί συντελεστές RF συγκρίνονται με τους συντελεστές των τυποποιημένων δειγμάτων ώστε να προκύψουν τα ανάλογα συμπεράσματα (32).



Εικόνα 13: Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

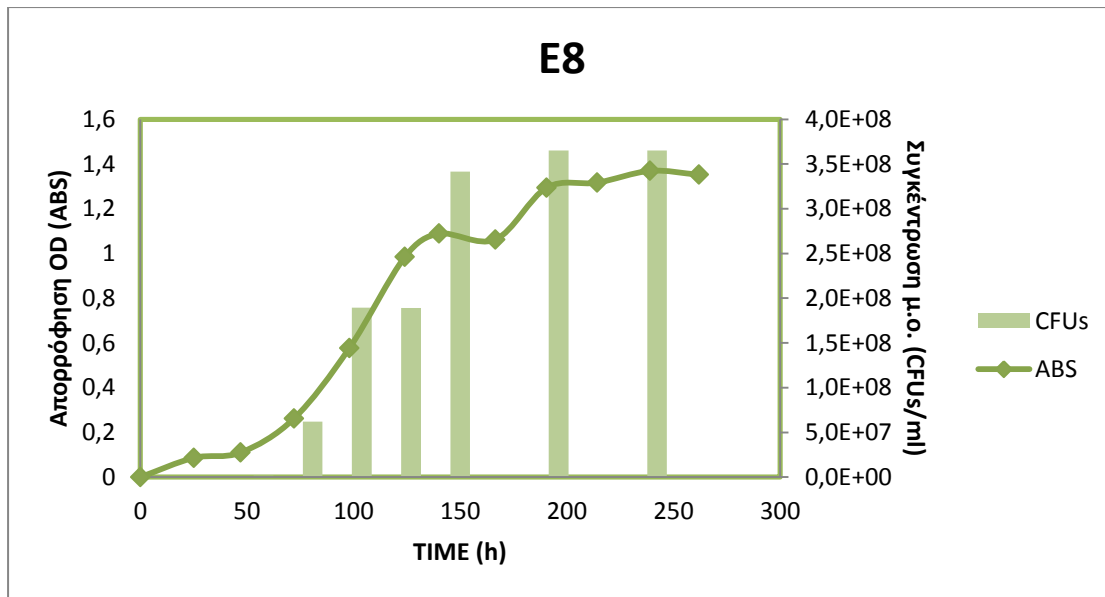
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων

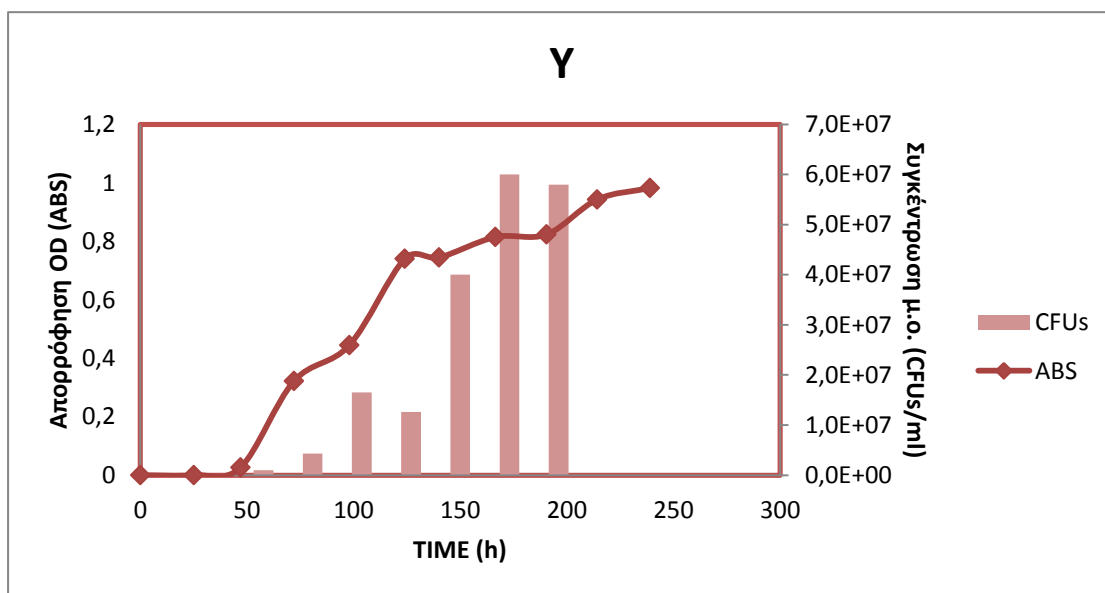
Για τους μικροοργανισμούς που επιλέχθηκαν, έγιναν οι καμπύλες ανάπτυξης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2. Στα Σχήματα Σχήμα 2, Σχήμα 3 και Σχήμα 4 παρουσιάζονται οι καμπύλες αυτές. Όπως παρατηρείται, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου της οπτικής απορρόφησης και της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων.

Κατά την διεκπεραίωση της διεργασίας αυτής, διαπιστώθηκε ότι η μικροβιακή κοινότητα E8 και ο μικροοργανισμός Υ έχουν την δυνατότητα να διαλύσουν το αργό πετρέλαιο μέσα στην υδατική φάση.

Από τα Σχήματα Σχήμα 2 και Σχήμα 3, που αναφέρονται στους μικροοργανισμούς E8 και Υ αντίστοιχα, συμπεραίνεται, ότι η σταθεροποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, συμβαίνει έπειτα από περίπου 140 και 170 ώρες αντίστοιχα. Στα σημεία της σταθεροποίησης, η απορρόφηση, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, σταθεροποιείται για λίγο και έπειτα συνεχίζει να αυξάνεται. Η αύξηση αυτή, οφείλεται στην διάλυση του αργού πετρελαίου και στα νεκρά κύτταρα τα οποία συμβάλλουν στην απορρόφηση του φωτός.

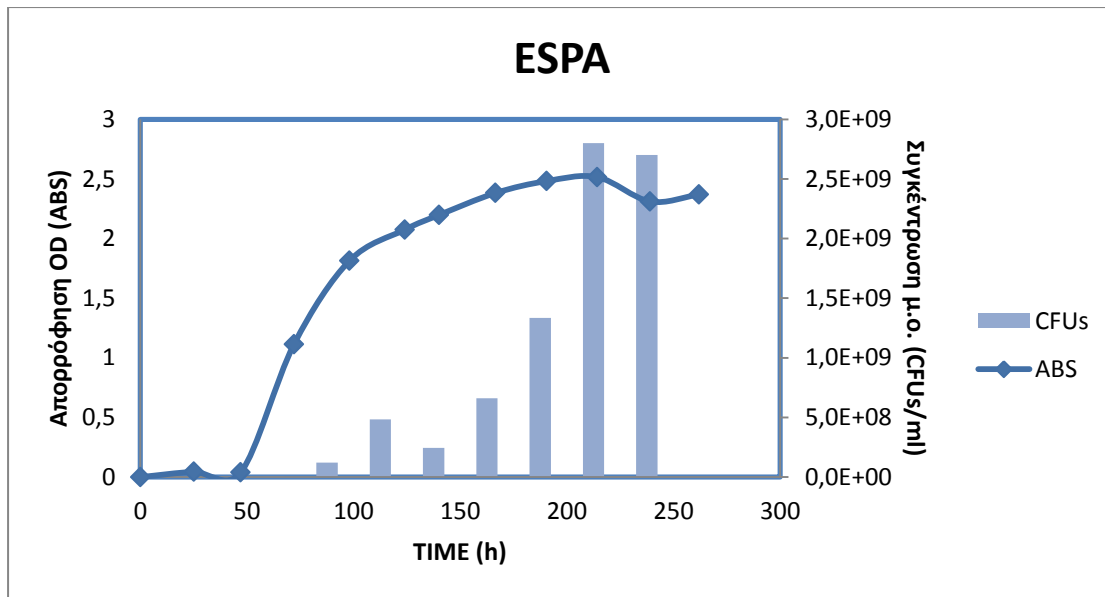


Σχήμα 2: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας E8



Σχήμα 3: Καμπύλη ανάπτυξης απομονωμένου μικροοργανισμού Y

Στο Σχήμα 4, που αναφέρεται στον μικροοργανισμό ESPA, παρατηρείται σταθεροποίηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού έπειτα από περίπου 210 ώρες. Η μέθοδος της οπτικής απορρόφησης και της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων φαίνεται να συμφωνούν απολύτως σε αυτή την περίπτωση.



Σχήμα 4: Καμπύλη ανάπτυξης απομονωμένου μικροοργανισμού ESPA

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, και ιδίως με το πέρας του χρόνου, παρουσιάστηκαν κάποιες μεταλλάξεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς των τριών καλλιεργειών. Αυτό, οφείλεται κυρίως στις μεταλλάξεις του DNA των μικροοργανισμών που λαμβάνουν χώρα για την καλύτερη προσαρμογή τους στο περιβάλλον που βρίσκονται. Με την καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ήταν εύκολο να διαπιστωθούν οι όποιες μεταλλάξεις του πληθυσμού, λόγω των αλλαγών που παρατηρούνταν στην εμφάνιση των αποικιών. Στην καλλιέργεια του απομονωμένου μικροοργανισμού ESPA βρέθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις μια αποικία στρογγυλή, κίτρινη, και στο μέγεθος των αποικιών που παρουσιάζει ο ESPA. Στην συνέχεια ο μικροοργανισμός αυτός απομονώθηκε με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.5 και καλλιεργήθηκε ώστε να παρατηρηθεί η συμπεριφορά του στα επόμενα πειράματα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός δεν έχει ταυτοποιηθεί και αναφέρεται στην εργασία αυτή με το όνομα YELLOW.

3.2 Παραγωγή και απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια

Από την διεργασία που ακολουθήθηκε για την αποτύπωση της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών, διαπιστώθηκε, ότι η μικροβιακή κοινότητα E8 και ο μικροοργανισμός Y, μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλον μολυσμένο με αργό πετρέλαιο. Σε αυτό το πείραμα η πηγή άνθρακα ήταν βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου. Όσον αφορά στους μικροοργανισμούς ESPA και YELLOW, αυτοί, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσω ONR7 με NP και HOF αλλά και σε ONR7 με NP και CO για να αποτυπωθεί η συμπεριφορά τους και με τις δύο αυτές πηγές άνθρακα.

Οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ESPA και YELLOW μπορούν με ευκολία να διαλύσουν το CO μέσα στο νερό. Έπειτα από δοκιμή απομόνωσης βιοτασιενεργών ουσιών από αυτές τις καλλιέργειες, διαπιστώθηκε ότι στο τελικό προϊόν υπάρχει αρκετά μεγάλη ποσότητα διαλυμένου πετρελαίου οπότε η μελέτη των καλλιεργειών αυτών δεν συνεχίστηκε.

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η ποσοτικοποίηση των βιοτασιενεργών ουσιών από τις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα HOF. Η απομόνωση των BSs έγινε μέσω εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα (παράγραφος 2.3.1), ο χαρακτηρισμός μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (παράγραφος 2.4) και η ποσοτικοποίηση με την χρήση ζυγού.

Στις καλλιέργειες E8 και Y δεν έλαβε χώρα διάλυση του HOF και έτσι το τελικό προϊόν ήταν καθαρό από πετρέλαιο. Όσον αφορά στις καλλιέργειες ESPA και YELLOW, σε αυτές παρατηρήθηκε η διάλυση ακόμα και του HOF έπειτα από το πέρασ αρκετών ημερών. Έτσι το τελικό προϊόν αυτών των δύο καλλιεργειών, στις πρώτες μέρες ήταν καθαρό ενώ στην πορεία, όταν δηλαδή άρχισε να διαλυτοποιείται το HOF στην υδάτινη φάση, το τελικό προϊόν είχε μεγάλες ποσότητες πετρελαίου.

Όπως προκύπτει από τα Σχήματα 5 και 6, η μικροβιακή κοινότητα E8 και ο απομονωμένος μικροοργανισμός Y, είναι κατάλληλα βακτήρια για την παραγωγή

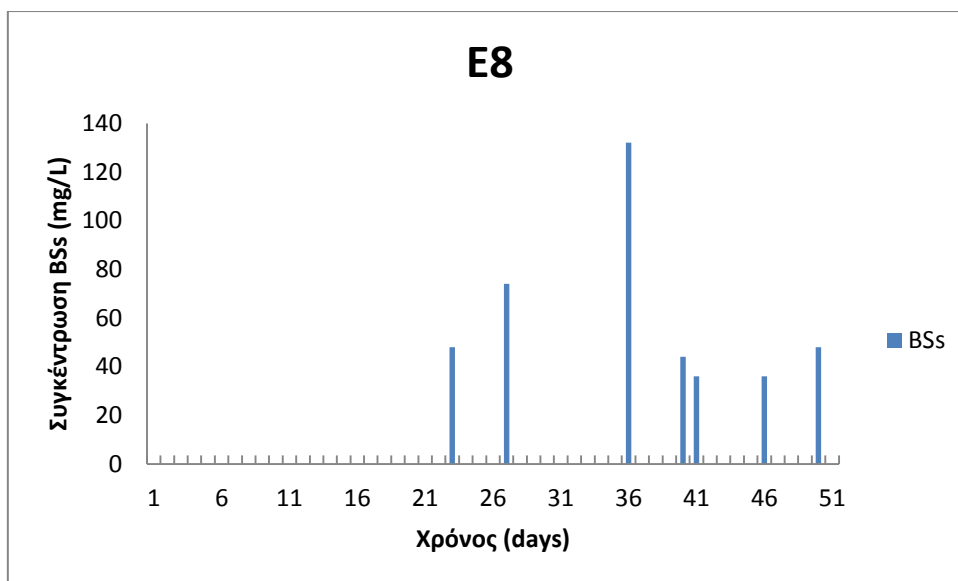
BSs σε βιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας επειδή παράγουν BSs υψηλής καθαρότητας. Το ποσό της καλλιέργειας που αφαιρούνταν κάθε φορά για την απομόνωση των BSs και αναπληρωνόταν με ONR7 και NP, αντιστοιχούσε στο 12,5% της ολικής καλλιέργειας. Σε αυτό το σημείο μπορεί να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της παροχής που θα μπορούσε να έχει ένας τέτοιος βιοαντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας.

Όσον αφορά στην μικροβιακή κοινότητα E8, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5, η αναπλήρωση των BSs έπεται από αφαίρεση του 12,5% της καλλιέργειας, λάμβανε χώρα με το πέρας 5 ημερών. Έτσι η παροχή ενός βιοαντιδραστήρα θα μπορούσε να είναι περίπου 2,5% του όγκου της ολικής καλλιέργειας ανά ημέρα.

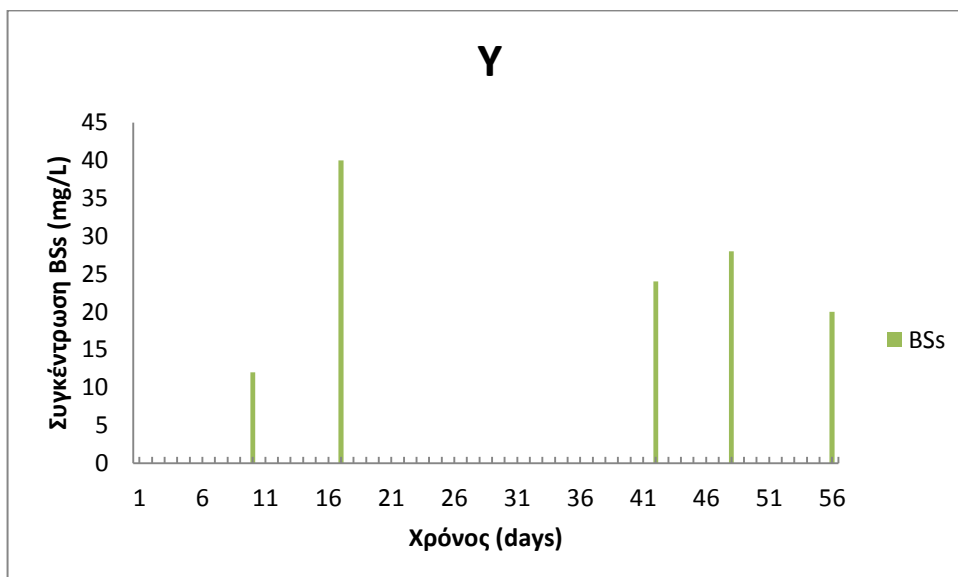
Όσον αφορά στον απομονωμένο μικροοργανισμό Υ, από το Σχήμα 6 διαπιστώνεται ότι η αναπλήρωση των BSs του 12,5% της καλλιέργειας γίνεται σε διάστημα περίπου 6 ημερών. Επομένως η παροχή ενός βιοαντιδραστήρα θα μπορούσε να είναι περίπου 2,1% του όγκου της ολικής καλλιέργειας ανά ημέρα.

Οι τιμές που προέκυψαν για την παροχή των βιοαντιδραστήρων συνεχούς λειτουργίας, αναμένεται στην πραγματικότητα να είναι μεγαλύτερες για τους ακόλουθους λόγους:

- Στο πείραμα, η απομάκρυνση του 12,5% της καλλιέργειας γινόταν ακαριαία και έτσι οι μικροοργανισμοί θα έπρεπε να συνηθίσουν στο καινούριο περιβάλλον, να αυξήσουν τον πληθυσμό τους και να αναπληρώσουν το ποσό των BSs που απομακρύνθηκε.
- Μέσα στον όγκο που απομακρύνεται, δηλαδή στο 12,5% της καλλιέργειας, βρίσκεται περίπου και το 12,5% των μικροοργανισμών της καλλιέργειας. Ο αριθμός των μικροοργανισμών θα πρέπει να αναπληρωθεί έπειτα από την προσθήκη ONR7 και NP και αυτό απαιτεί κάποιο την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος.
- Η διεργασία της συνεχούς απομάκρυνσης μικρής ποσότητας καλλιέργειας και η απευθείας αναπλήρωση της με ONR7 και NP, θα φέρνει την καλλιέργεια σε σταθερές συνθήκες και το περιβάλλον θα είναι πιο εύφορο για την δημιουργία BSs από τους μικροοργανισμούς. Δηλαδή θα μηδενίζεται ο χρόνος προσαρμογής που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί και άρα θα επιταχυνθεί η διεργασία παραγωγής BSs.



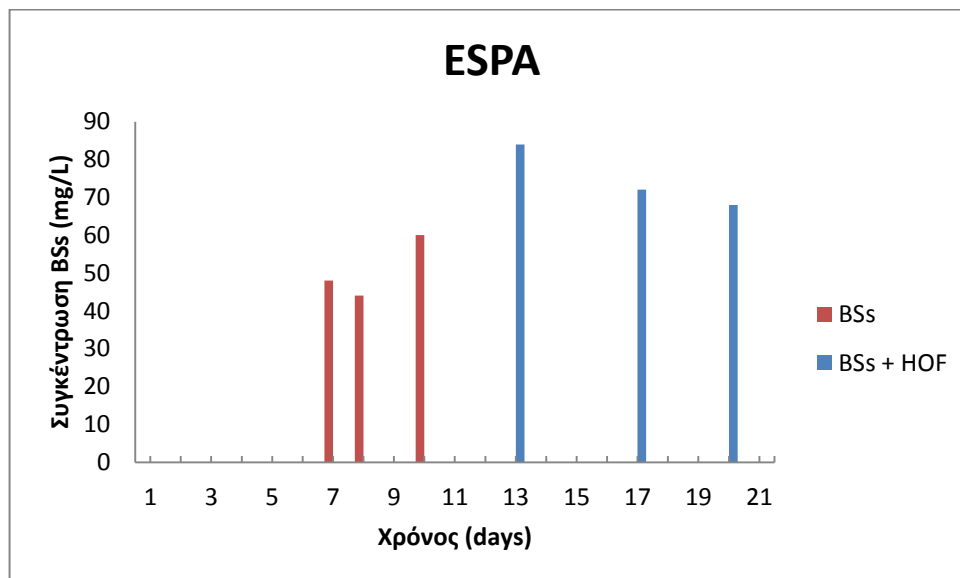
Σχήμα 5: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από την μικροβιακή κοινότητα E8 με αναπλήρωση NP και ONR7



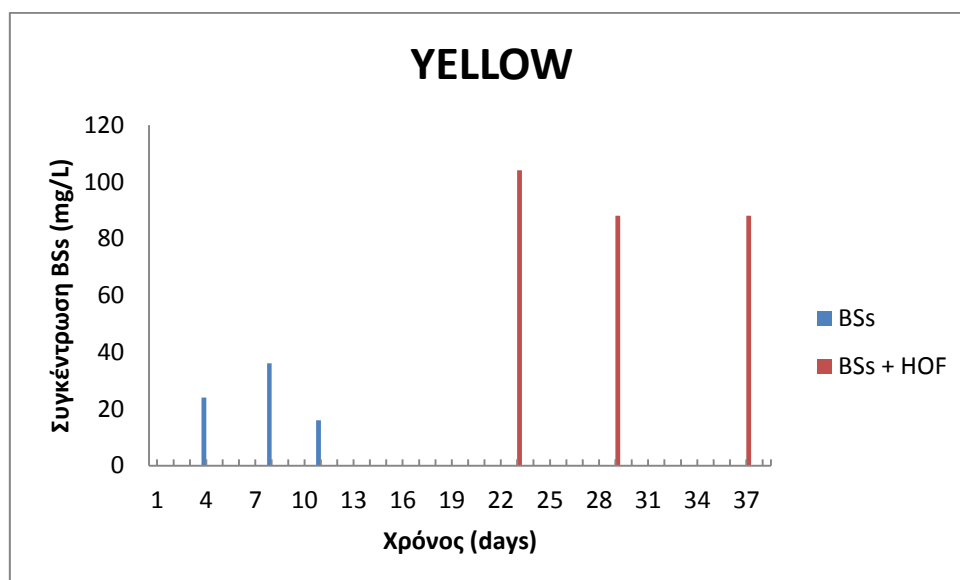
Σχήμα 6: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό Y με αναπλήρωση NP και ONR7

Όσον αφορά στις καλλιέργειες ESPA και YELLOW, όπως φαίνεται και από τα Σχήματα 7 και 8 αντίστοιχα, έπειτα από περίπου 10 με 12 μέρες, παρατηρείται ότι το HOF αρχίζει να διαλύεται στην υγρή φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι BSs ουσίες που λαμβάνονται από την εκχύλιση να είναι εμπλουτισμένες με πετρέλαιο. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, αναζητούνται μικροοργανισμοί για την παραγωγή υψηλής καθαρότητας BSs. Οι μικροοργανισμοί ESPA και YELLOW θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό το σκοπό σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου,

όπου η απομόνωση των BSs θα λαμβάνει χώρα περίπου στις 10 ημέρες. Εναλλακτικά, οι μικροοργανισμοί αυτοί, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε μολυσμένες περιοχές με βαρέα κλάσματα πετρελαίου.



Σχήμα 7: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό ESPA με αναπλήρωση NP και ONR7



Σχήμα 8: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό YELLOW με αναπλήρωση NP και ONR7

Κατά την διάρκεια αυτού του πειράματος γινόταν μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, κάθε φορά που αφαιρούνταν μέρος από την καλλιέργεια για την

εκτίμηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών. Επιπλέον, έγινε και μέτρηση της συγκέντρωσης αυτής μέσω της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών σε όλες τις καλλιέργειες ήταν της τάξης του 10^7 με 10^8 CFUs/ml. Μέσω της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, παρακολουθήθηκε επίσης η μετάλλαξη των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια του πειράματος. Ακολουθούν παρακάτω οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν.

- Το ESPA στην καλλιέργεια με το HOF δεν μεταλλάσσεται ιδιαίτερα. Τυχόν διαφορετικές αποικίες μπορεί να οφείλονται και σε εξωτερικές επιμολύνσεις.
- Το ESPA στην καλλιέργεια με το CO μεταλλάσσεται αρκετά με το πέρας του χρόνου.
- Το Υ στην καλλιέργεια με το HOF έχει κάποιες επιμολύνσεις αλλά εξακολουθεί να είναι το επικρατέστερο βακτήριο μέσα στην καλλιέργεια.
- Όσον αφορά στην κοινότητα E8, είναι δύσκολο να εντοπιστούν τυχόν αλλαγές καθώς πρόκειται για μία κοινότητα μικροοργανισμών που εξαρχής παρουσιάζει πολλών ειδών διαφορετικές αποικίες.

3.3 Παραγωγή και απομόνωση βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς την

αναπλήρωση θρεπτικών και ONR7 στην καλλιέργεια

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να βρεθεί η χρονική στιγμή στην οποία παρουσιάζεται μέγιστη συγκέντρωση BSs στις καλλιέργειες. Να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο πείραμα δεν μελετήθηκε ο μικροοργανισμός YELLOW , καθώς στόχος ήταν μονάχα να διαπιστωθεί αν παράγει BSs και αν διαλύει το CO και το HOF.

Μοναδική πηγή άνθρακα σε αυτό το πείραμα ήταν το βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου (HOF).

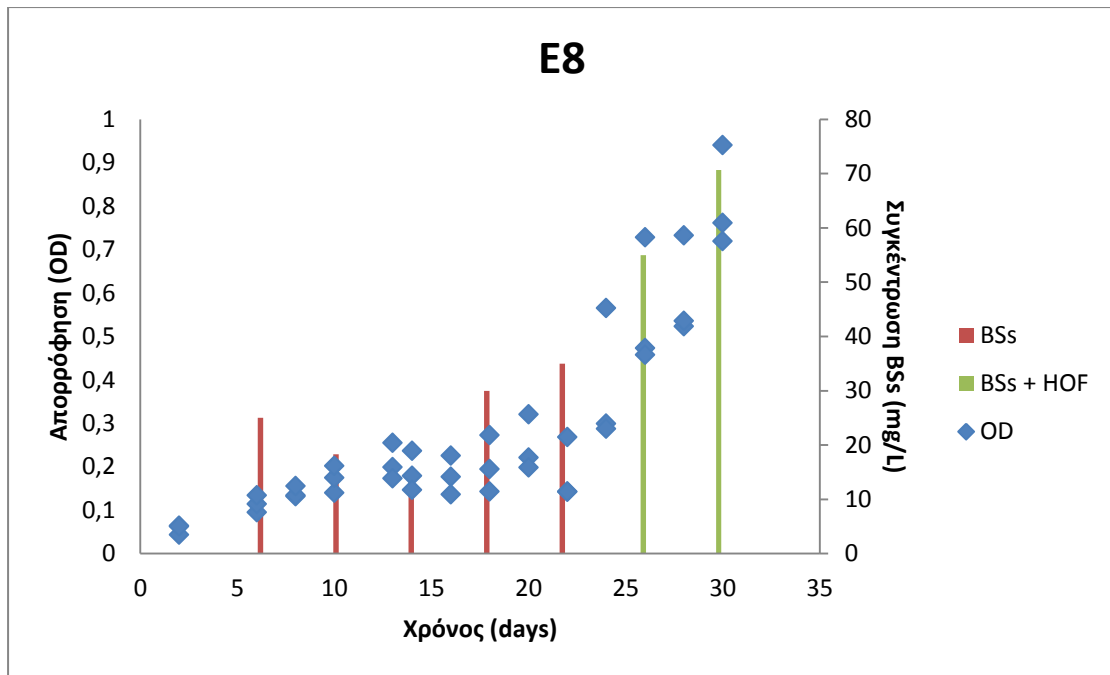
Η απομόνωση των BSs, όπως και στο προηγούμενο πείραμα, έγινε μέσω εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα (παράγραφος 2.3.1), ο χαρακτηρισμός μέσω της

χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (παράγραφος 2.4) και η ποσοτικοποίηση με την χρήση ζυγού.

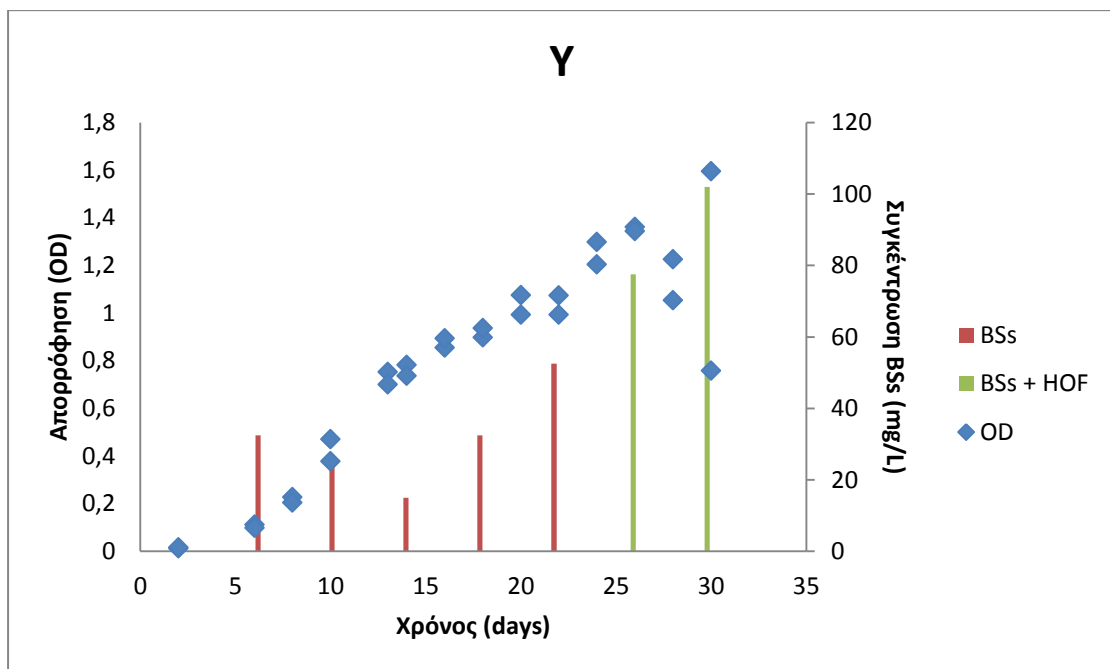
Κάθε καλλιέργεια έγινε 3 φορές, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα. Στα Σχήματα 9, 10 και 11 παρουσιάζονται οι τιμές τις οπτικής απορρόφησης ως έχουν (από όλες τις καλλιέργειες) και ο μέσος όρος παραγωγής BSs για κάθε μικροοργανισμό. Στο πείραμα με τον μικροοργανισμό Υ έχουν ληφθεί υπόψη μόνο οι δύο καλλιέργειες καθώς η τρίτη απείχε πολύ στα αποτελέσματά της από τις άλλες δύο.

Στα Σχήματα 9, 10 και 11 δίνονται με διαφορετικό χρώμα οι ποσότητες BSs που είναι καθαρές από πετρέλαιο, και με άλλο οι ποσότητες στις οποίες περιλαμβάνεται ένα μέρος πετρέλαιου. Όσον αφορά στην μικροβιακή κοινότητα E8 και στον απομονωμένο μικροοργανισμό Υ, το HOF, αρχίζει να διαλύεται στην υδατική φάση έπειτα από περίπου 23 ημέρες. Αντιθέτως, στην καλλιέργεια με τον μικροοργανισμό ESPA η διάλυση του HOF λαμβάνει χώρα πολύ νωρίτερα, περίπου έπειτα από το πέρας 15 ημερών.

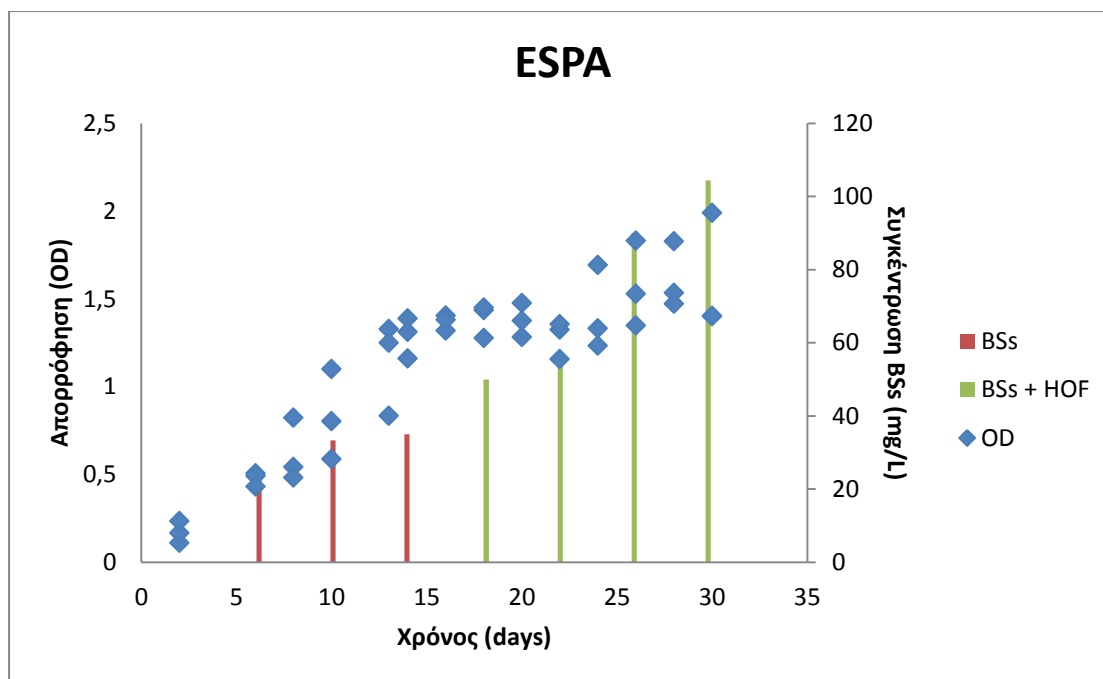
Η μέγιστη ποσότητα καθαρών BSs από την καλλιέργεια E8 και Υ λαμβάνεται έπειτα από 22 μέρες. Για την καλλιέργεια ESPA η μέγιστη τιμή καθαρού προϊόντος παρουσιάζεται την 14^η μέρα. Οι κοινότητα E8 και ο ESPA έχουν μέγιστη παραγωγή ίση με 35mg/L ενώ ο Υ έχει 52,5g/L.



Σχήμα 9: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από την μικροβιακή κοινότητα Ε8 χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7



Σχήμα 10: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό Υ χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7



Σχήμα 11: Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από τον απομονωμένο μικροοργανισμό ESPA χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7

Υποθέτοντας ότι έχουμε δύο βιοαντιδραστήρες του ενός κυβικού με την κοινότητα E8 στον ένα και τον μικροοργανισμό Υ στον άλλο και ότι απομακρύνεται από αυτούς το 2,5% και το 2,1% του όγκου της καλλιέργειας καθημερινά. Η παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από το E8 θα ήταν 0,87g/day ενώ από τον Υ θα ήταν 1,1g/day. Συγκρίνοντας αυτές τιμές, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός Υ έχει την δυνατότητα παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων BSs υψηλής καθαρότητας. Ο Υ λοιπόν είναι ο πλέον κατάλληλος μικροοργανισμός για έναν βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας για την παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών.

3.4 Χαρακτηρισμός βιοτασιενεργών ουσιών με TLC

Για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων BSs έγινε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4. Αρχικά, έγινε η διεργασία αυτή για Ραμνολιπίδια του εμπορίου καθαρότητας 95%. Βάσει αυτού του δείγματος, υπολογίστηκε ο συντελεστής RF των Ραμνολιπιδίων και συγκρίθηκε με τους συντελεστές RF των προϊόντων που προέκυψαν από τα

πειράματα. Ο συντελεστής RF ορίζεται ως ο λόγος του ύψους όπου εμφανίζεται η κουκίδα προς το ύψος που ανήλθε ο διαλύτης.

Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός Ραμνολιπιδίων πειράματος παραγωγής και απομόνωσης βιοτασιενεργών ουσιών με αναπλήρωση NP και ONR7 στην καλλιέργεια

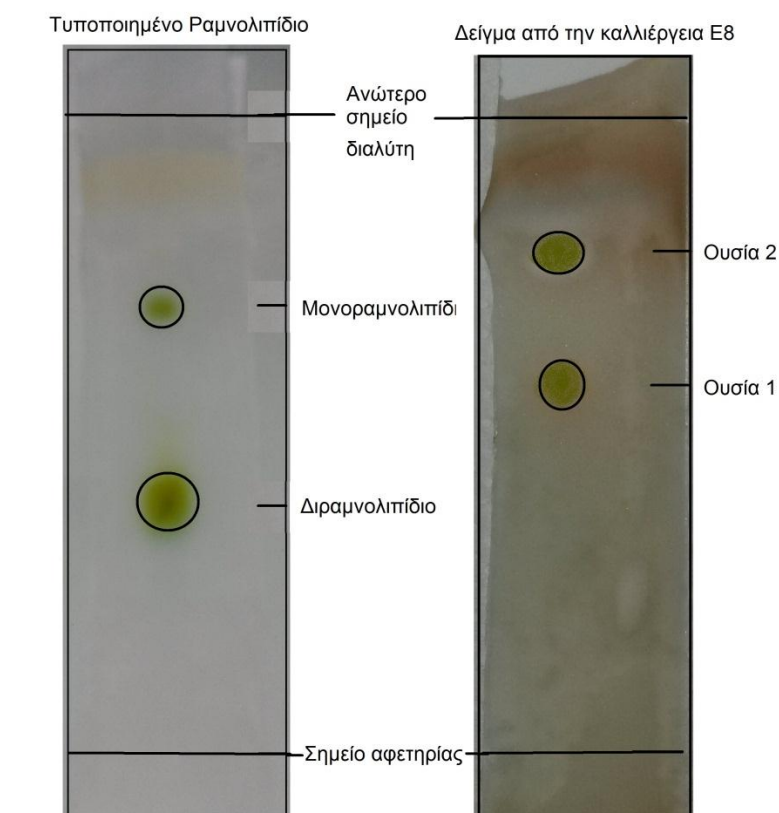
Δείγμα	Μονοραμνολιπίδια RF	Απόκλιση	Διραμνολιπίδια RF	Απόκλιση
Τυποποιημένο δείγμα 95% καθαρότητας	0,303	0%	0,667	0%
E8	0,242	20,11%	0,684	2,63%
Υ	0,200	34,00%	0,700	5,00%
ESPA	0,348	14,78%	0,565	15,22%
ESPA CO	0,114	62,50%	0,455	31,82%
YELOW	0,435	43,48%	0,783	17,39%

Πίνακας 5: Χαρακτηρισμός Ραμνολιπιδίων πειράματος παραγωγής και απομόνωσης βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7 στην καλλιέργεια

Δείγμα	Μονοραμνολιπίδια RF	Απόκλιση	Διραμνολιπίδια RF	Απόκλιση
Τυποποιημένο δείγμα 95% καθαρότητας	0,303	0%	0,667	0%
E8	0,571	88,57%	0,771	15,71%
Υ	0,276	8,97%	0,759	13,79%
ESPA	0,286	5,71%	0,556	16,67%

Τα δείγματα που αναλύθηκαν με TLC επιλέχθηκαν τυχαία. Όπως φαίνεται στους Πίνακες 4 και 5, το τελικό προϊόν δεν αποτελείται μονάχα από Ραμνολιπίδια. Αυτό είναι λογικό καθώς οι μικροοργανισμοί δεν παράγουν μονάχα Ραμνολιπίδια, αλλά και άλλα είδη βιοτασιενεργών ουσιών ταυτόχρονα. Η μικροβιακή κοινότητα E8 εμφανίζει την μέγιστη απόκλιση στον συντελεστή RF σε σχέση με τον αντίστοιχο συντελεστή του τυποποιημένου προϊόντος. Η απόκλιση αυτή φτάνει το 88,57%. Λόγω του ότι πρόκειται για μία κοινότητα μικροοργανισμών και όχι για ένα απομονωμένο μικροοργανισμό, το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο. Ο απομονωμένος μικροοργανισμός Υ που έχει δείξει να παράγει την μεγαλύτερη ποσότητα BSs σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς, φαίνεται να έχει και τις μικρότερες αποκλίσεις στον συντελεστή RF. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι ο

συγκεκριμένος μικροοργανισμός, είναι ο καταλληλότερος από αυτούς που μελετήθηκαν για την παραγωγή Ραμνολιπιδίων.



Εικόνα 14: Σύγκριση τυποποιημένου Ραμνολιπιδίου καθαρότητας 95% και δείγματος E8 με TLC

Τέλος, συγκρίνοντας την μέγιστη συγκέντρωση Ραμνολιπιδίων που παράγει ο μικροοργανισμός Υ με τις συγκεντρώσεις Ραμνολιπιδίων που έχουν παραχθεί σε άλλες μελέτες (πίνακας 6), καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός με την συγκεκριμένη πηγή άνθρακα (HOF) δεν είναι τόσο αποδοτικός.

Πίνακας 6: Απόσπασμα του Πίνακα 2 (Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα) (27)

Rhamnolipid	P. aeruginosa DSM 7107	Σογιέλαιο	112g
Rhamnolipid	P. aeruginosa UI 29791	Καλαμποκέλαιο	46g

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μελετώντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έλαβαν χώρα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου ως πηγή άνθρακα, είναι μία πολύ καλή επιλογή στην παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών χωρίς προσμίξεις. Η χρήση άλλων κλασμάτων πετρελαίου ή άλλων πηγών άνθρακα (π.χ. το σογιέλαιο) δεν επιτρέπει την παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών υψηλής καθαρότητας διότι η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στην υγρή φάση. Για την απομόνωση των βιοτασιενεργών ουσιών απαιτούνται περισσότερες διεργασίες (και άρα μεγαλύτερο κόστος) απ' ότι χρειάστηκαν στο παρόν πείραμα, καθώς πρέπει να αφαιρεθεί ο άνθρακας από το τελικό προϊόν. Μια τέτοια διεργασία είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης.

Ο μικροοργανισμός *Alcanivorax borkumensis* SK2 θεωρείται ο πιο αποτελεσματικός, από αυτούς που μελετήθηκαν, στην παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών και συγκεκριμένα στην παραγωγή Ραμνολιπιδίων. Μπορεί να μην παράγει μεγάλες ποσότητες βιοτασιενεργών ουσιών σε σχέση με τιμές της βιβλιογραφίας, παράγει όμως ένα προϊόν ελεύθερο από προσμίξεις καθώς δεν διαλύει το εύκολα το βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου στην υδατινή φάση. Το τελικό συμπέρασμα για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας.

Αντιθέτως, ο μικροοργανισμός *Paracoccus marcusii* διαλύει το βαρύ κλάσμα αργού πετρελαίου με μεγάλη ευκολία. Το ίδιο ισχύει και για τον μη ταυτοποιημένο μικροοργανισμό YELLOW. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι στην βιοαποικοδόμηση βαρέων κλασμάτων πετρελαίου. Μια δεύτερη εναλλακτική είναι να χρησιμοποιούνται σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου, όπου το δείγμα θα απομακρύνεται προτού λάβει χώρα η διάλυση του βαρέως κλάσματος πετρελαίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Δάβρης, Εμμανουήλ Γ.** ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ. ΧΑΝΙΑ : s.n., 2013.
2. **Νάσια.** Μαύρος Χρυσός - Ο καταραμένος πλούτος. http://oil-evolution.blogspot.gr/2007/10/blog-post_2582.html. [Ηλεκτρονικό] 2007.
3. ΒΙΚΙΠΑΙΔΕΙΑ. el.wikipedia.org/wiki/Πετρέλαιο. [Ηλεκτρονικό]
4. <http://www.marinedefenders.com/>. [Ηλεκτρονικό]
5. **American Academy of Sciences.** Oil in the Sea. 2003.
6. **Wikins, Tim.** an introduction to the international regulations for the prevention of pollution by oil. *MARPOL Annex I Regulation for Prevention of Pollution by Oil*. s.l. : INTERTANKO.
7. ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ .
https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5479/3/02_chapter_2.pdf.
[Ηλεκτρονικό]
8. **CHRIS WILKINS/AFP/Getty.**
9. *The devastation of Deepwater Horizon from above: Mesmerizing photos show Gulf's 210 MILLION gallon oil slick* . **GORDON, JAMES.** s.l. : Mail Online.
10. **Repanich, Jeremy.** The Deepwater Horizon Spill by the Numbers.
<http://www.popularmechanics.com/science/energy/a6032/bp-oil-spill-statistics/>.
[Ηλεκτρονικό] 2010.
11. **Βεργούλης, Πάνος.** <http://stasinews.gr/>. <http://stasinews.gr/tribute/ta-megalitera-perivallontika-atichimata-stin-istoria-tis-exorixis-petroleou/>.
[Ηλεκτρονικό] 2015.
12. **ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ. Greece, Greenpeace.**
Αύγουστος 2006.
13. **ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΕΞΟΡΥΞΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ. ΑΡΕΤΗ-ANNA, ΤΣΑΚΙΡΟΓΛΟΥ.** ΧΑΝΙΑ : s.n., 2014.
14. **Πετρέλαιο και θαλάσσιο περιβάλλον. ΡΟΔΙΑΚΗ.**

15. NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION, National Ocean Service . [Ηλεκτρονικό]
16. **Shigenaka, Gary.** *Oil and Sea Turtles BIOLOGY, PLANNING, AND RESPONSE* . s.l. : National Oceanic and Atmospheric Administration, US DEPARTMENT OF COMMERCE , 2010.
17. **Jeff Chen and Michael S. Denison, Ph.D.** 84JYI | May2011| Vol. 21Issue 6©2011 The Journal of Young InvestigatorsThe Deepwater Horizon Oil Spill: Environmental Fate of the Oil and the Toxicological Effects on Marine Organisms.
18. **ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ, ΡΙΖΟΥ.** *ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΑΣ ΣΤΟ ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ.* ΞΑΝΘΗ : s.n., 2010.
19. **ΜΑΡΙΑ, ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ.** *Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδιασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων.* ΧΑΝΙΑ : s.n., 2005.
20. **Nikolopoulou, Maria P.** *Oil spills bioremediation in marine environment- biofilm characterization around oil droplets.* CHANIA : s.n., 2013.
21. **ΚΟΡΚΑΚΑΚΗ, ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ.** *ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.* ΧΑΝΙΑ : s.n., 2012.
22. **Sommerville, Matthew.** 50 Years of Response Technology . [Ηλεκτρονικό] 2012.
23. WIKIPEDIA. <https://en.wikipedia.org/wiki/Surfactant>. [Ηλεκτρονικό]
24. WIKIPEDIA. <https://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>. [Ηλεκτρονικό]
25. WIKIPEDIA. https://nl.wikipedia.org/wiki/Oppervlakte-actieve_stof. [Ηλεκτρονικό]
26. **Ιωαννίδου, Λένα.** skingurus. Νερά αλλιώτικα από τα άλλα. <http://www.skingurus.gr/show/?id=811>. [Ηλεκτρονικό]
27. **Naim Kosaric, Fazilet Vardar Sukan.** *BIOSURFACTANTS Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics.* 2015.
28. **Γεώργιος, Ράπτης.** *Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με χρήση καθαρής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Tetragenococcus koreensis*.* ΠΑΤΡΑ : s.n., 2014.

29. **Eleftheria Antoniou, Stillianos Fodelianakis, Emmanouela Korkakaki and Nicolas Kalogerakis.** Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *frontiers in Microbiology*. 2015, 10.3389/fmicb.2015.00274.
30. Microbe Wiki, *Alcanivorax borkumensis* .
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Alcanivorax_borkumensis. [Ηλεκτρονικό]
31. ΒΙΚΙΠΑΙΔΕΙΑ. el.wikipedia.org/wiki/Φασματοσκόπιο_απορρόφησης.
[Ηλεκτρονικό]
32. **T.J.P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, I.M. Banat.** Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. [συγγρ. βιβλίου] Kenneth N. Timmis. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin : Springer-Verlag, 2010.
33.
<https://www.chem.wisc.edu/deptfiles/OrgLab/handouts/CHEM%20344%20TLC%20info.pdf>. [Ηλεκτρονικό]
34. **Beltra, Daniel.** s.l. : Greenpeace.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΠΙΝΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Πίνακας 7: Πίνακας τιμών καμπυλών ανάπτυξης μικροοργανισμών

Χρόνος (hr)	E8		Υ		ESPA	
	Απορρόφηση (ABS)	CFUs/ml	Απορρόφηση (ABS)	CFUs/ml	Απορρόφηση (ABS)	CFUs/ml
0	0		0		0	
25	0,086		0		0,044	
47	0,110	1400000	0,027	1000000	0,038	282000
72	0,262	62085000	0,322	4310000	1,113	121400000
98	0,577	189500000	0,445	16500000	1,813	485000000
124	0,984	189000000	0,740	12650000	2,075	246000000
140	1,089	341500000	0,744	40000000	2,197	660000000
166,5	1,063	-	0,815	60000000	2,382	1335000000
190,5	1,294	365000000	0,823	58000000	2,482	2800000000
214,3	1,317	-	0,943		2,515	2700000000
239	1,369	365000000	0,982		2,311	
262	1,352		1,033		2,369	
291,5			1,103			
311,5			1,141			
332,5			1,169			
357			1,241			
381,5			1,244			
405,5			1,310			
430,5			1,293			
453,5			1,346			
477,5			1,387			
501,3			1,452			

Πίνακας 8: Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs με αναπλήρωση NP και ONR7

Ημέρα	Ποσότητα καλλιέργειας (ml)	OD (ABS)	BSs στον όγκο του δείγματος (mg)	BSs (mg/L)
ΒΑΡΥ ΚΛΑΣΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ				
E814C ΒΑΡΥ ΚΛΑΣΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ				
23	50	0,3247	2,4	48
27	25	0,2163	2,1	84
27	25	0,2163	1,6	64
36	25	0,1176	3,3	132
40	25	0,3346	1,1	44
41	25	0,2979	0,9	36
46	25	0,2908	0,9	36
50	25	0,4397	1,2	48
ΥΡΑΗ ΒΑΡΥ ΚΛΑΣΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ				
10	25	0,0392	0,3	12
17	25	0,2169	1	40
42	12	0,2600	0,6	24
48	25	0,2968	0,7	28
56	25	0,2545	0,5	20
ESPA ΒΑΡΥ ΚΛΑΣΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ				
7	25	0,2185	1,2	48
8	25	0,2620	1,1	44
10	25	0,4365	1,5	60
Έπειτα από διάλυση του HOF στην υδατική φάση				
13	25	0,8971	2,1	84
17	25	1,2468	1,8	72
20	25	1,4376	1,7	68
YELLOW ΒΑΡΥ ΚΛΑΣΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ				
4	25	0,2310	0,6	24
8	25	0,1680	0,9	36
11	25	0,4137	0,4	16
Έπειτα από διάλυση του HOF στην υδατική φάση				
23	25	1,6906	2,6	104
29	25	1,5242	2,2	88
37	25	1,4028	2,2	88
ΑΡΓΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ				BSs +CO (mg/L)
ESPA C.O.				
	50	2,6345	30,9	618
	50	2,3818	29,9	598
	50	2,7994	32,3	646
YELLOW C.O.				
	50	0,5009	38,8	776
	50	0,7180	4,6	92
	50	2,3005	35,9	718

Πίνακας 9: Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs χωρίς αναπλήρωση NP και ONR7

Μέρα	Απορρόφηση (ABS)	Ποσότητα καλλιέργειας (ml)	OD (ABS)	Συγκέντρωση BSs (mg/L)
E8 1				
0	-	-	-	-
2	0,0433	-	-	-
6	0,0948	20	0,5	25
8	0,1317	-	-	0
10	0,1398	20	0,3	15
13	0,1990	-	-	-
14	0,1792	20	0,4	20
16	0,1771	-	-	-
18	0,1942	20	0,4	20
20	0,2212	-	-	-
22	0,1433	20	0,7	35
24	0,2991	-	-	-
26	0,4728	20	1,2	60
28	0,5234	-	-	-
30	0,7196	50	3,4	68
E8 2				
0	-	-	-	-
2	0,0643	-	-	-
6	0,1144	20	0,5	25
8	0,1342	-	-	-
10	0,1743	20	0,2	10
13	0,1733	-	-	-
14	0,1465	20	0,2	10
16	0,1360	-	-	-
18	0,1431	20	0,7	35
20	0,1981	-	-	-
22	0,1425	20	0,7	35
24	0,2875	-	-	-
26	0,4574	20	1,1	55
28	0,5356	-	-	-
30	0,7616	50	2,9	58
E8 3				
0	-	-	-	-
2	0,0627	-	-	-
6	0,1340	20	0,5	25
8	0,1552	-	-	-
10	0,2019	20	0,6	30
13	0,2549	-	-	-
14	0,2368	20	0,3	15
16	0,2252	-	-	-
18	0,2727	20	0,7	35
20	0,3203	-	-	-
22	0,2679	20	0,7	35
24	0,5651	-	-	-
26	0,7278	20	1	50
28	0,7322	-	-	-
30	0,9407	50	4,3	86

Πίνακας 9 (Συνέχεια): Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs χωρίς αναπλήρωση NP και

ONR7

Μέρα	Απορρόφηση (ABS)	Ποσότητα καλλιέργειας (ml)	OD (ABS)	Συγκέντρωση BSs (mg/L)
Υ 1				
0	-	-	-	-
2	0,0117	-	-	-
6	0,1108	20	0,8	40
8	0,2266	-	-	-
10	0,3771	20	0,4	20
13	0,7517	-	-	-
14	0,7823	20	-	-
16	0,8545	-	-	-
18	0,8971	20	0,6	30
20	0,9927	-	-	-
22	0,9932	20	1	50
24	1,2032	-	-	-
26	1,3607	20	1,5	75
28	1,0536	-	-	-
30	0,7579	29	2,5	86
Υ 2				
0	-	-	-	-
2	0,0159	-	-	-
6	0,0985	20	0,5	25
8	0,2047	-	-	-
10	0,4698	20	0,6	30
13	0,7003	-	-	-
14	0,7367	10	0,3	30
16	0,8938	-	-	-
18	0,9360	20	0,7	35
20	1,0751	-	-	-
22	1,0732	20	1,1	55
24	1,2974	-	-	-
26	1,3428	20	1,6	80
28	1,2258	-	-	-
30	1,5952	35	4,1	117
Υ 3				
0	-	-	-	-
2	0,0018	-	-	-
6	0,0938	20	0,6	30
8	0,1547	-	-	-
10	0,2505	20	0,3	15
13	0,2980	-	-	-
14	0,2914	20	0,2	10
16	0,3899	-	-	-
18	0,4995	20	1,1	55
20	0,5841	-	-	-
22	0,4835	20	0,6	30
24	0,5375	-	-	-
26	0,6622	10,5	0,8	76
28	0,7166	-	-	-
30	0,9000	40	2,4	60

Πίνακας 9 (Συνέχεια): Αναλυτικός πίνακας μετρήσεων πειράματος παραγωγής BSs χωρίς αναπλήρωση NP και

ONR7

Μέρα	Απορρόφηση (ABS)	Ποσότητα καλλιέργειας (ml)	OD (ABS)	Συγκέντρωση BSs (mg/L)
ESPA 1				
0	-	-	-	-
2	0,1104	-	-	-
6	0,5060	20	1,1	55
8	0,8234	-	-	-
10	1,0997	20	0,8	40
13	1,3279	-	-	-
14	1,3883	20	0,8	40
16	1,4055	-	-	-
18	1,4362	20	1,2	60
20	1,3755	-	-	-
22	1,1567	20	1,2	60
24	1,2339	-	-	-
26	1,5295	20	1,7	85
28	1,5349	-	-	-
30	1,4015	50	4,6	92
ESPA 2				
0	-	-	-	-
2	0,1661	-	-	-
6	0,4912	20	0,5	25
8	0,5430	-	-	-
10	0,8027	20	0,6	30
13	1,2506	-	-	-
14	1,3113	20	0,6	30
16	1,3198	-	-	-
18	1,2769	20	0,9	45
20	1,2830	-	-	-
22	1,3245	20	1,3	65
24	1,3313	-	-	-
26	1,3486	20	1,6	80
28	1,4724	-	-	-
30	1,4028	54	4	74
ESPA 3				
0	-	-	-	-
2	0,2340	-	-	-
6	0,4319	20	0,5	25
8	0,4818	-	-	-
10	0,5874	20	0,6	30
13	0,8341	-	-	-
14	1,1605	20	0,3	15
16	1,3818	-	-	-
18	1,4495	20	0,9	45
20	1,4756	-	-	-
22	1,3558	20	0,8	40
24	1,6932	-	-	-
26	1,8306	20	2,1	105
28	1,8270	-	-	-
30	1,9890	34	5	147