



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διπλωματική Εργασία

*« Ανάπτυξη πρωτοκόλλου αξιολόγησης τασιενεργών ουσιών
σε υψηλή πίεση και επίδραση αυτών στην βιοαποδόμηση
πετρελαιοειδών »*

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΚΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΣΑΔΑΚΗΣ,

ΔΡ. ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

Μάριος Δασκαλάκης

Χανιά – Οκτώμβριος 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου, κ. Νικόλαο Καλογεράκη, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και καθηγητή μου, για την επιλογή του θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο και την ουσιαστική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια. Τον κ. Νίκο Πασαδάκη, καθηγητή της σχολής των Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, για την παροχή του αέριου χρωματογράφου στο εργαστήριο και για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας. Κυρίως όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ελευθερία Αντωνίου για την πολύτιμη βοήθεια της και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις της, για την εξαιρετική συνεργασία, μα πάνω από όλα για την απεριόριστη υπομονή που έδειξε με εμένα.

Καταληκτικά θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, που μέσα σε αυτά τα 5 χρόνια για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους και καθώς τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την εμφάνιση του πετρελαίου στην ανθρώπινη βιομηχανία ως κύρια πηγή καυσίμου τα προβλήματα για το περιβάλλον μόλις ξεκίνησαν. Πετρελαιοκηλίδα δημιουργείται κατά την απελευθέρωση μείγματος υδρογονανθράκων στο θαλάσσιο περιβάλλον συχνά λόγω της ανθρώπινης δραστηριότητας.

Τα τελευταία χρόνια, οι βιοτασιενεργές ουσίες καθώς και ο συνδυασμός τους με τη μέθοδο της βιοεξυγίανσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βασικός τρόπος αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων.

Η βιοεξυγίανση είναι η πιο φιλική, προς το περιβάλλον μέθοδος και έχει οριστεί ως η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης. Οι βιοτασιενεργές ουσίες είναι αμφίφυλα πολυμερή βιολογικής προέλευσης που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν τους υδρόφοβους ρύπους στην υδατική φάση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα βιολογικών τασιενεργών ουσιών με τη χρήση του πρωτοκόλλου της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής για την καταπολέμηση των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον και στη συνέχεια αναπτύχθηκε αντίστοιχο πρωτόκολλο για συνθήκες υψηλής πίεσης, με χρήση αντιδραστήρα υψηλής πίεσης. Με βάση τα πρωτόκολλα αξιολογήθηκαν βιοτασιενεργές ουσίες ως προς την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν το πετρέλαιο στην υδατική φάση. Στη συνέχεια η καταλληλότερη βιοτασιενεργή ουσία χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα βιοεξυγίανσης σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Προσομοιώθηκε πειραματικά η βιοαποδόμηση του πετρελαίου σε μεγάλα θαλάσσια βάθη (1000m και 100bar) με χρήση πιεζοφιλικών μικροοργανισμών και μελετήθηκε η επίδραση των βιοτασιενεργών ουσιών στο ρυθμό αποδόμησης των υδρογονανθράκων. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υδρογονανθράκων πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (GC/MS). Η ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού πληθυσμού κατά τη διάρκεια του πειράματος έγινε με την τεχνική της χρώσης του DNA των κυττάρων με πορτοκαλί ακριδίνη (Acridine Orange).

Καταληκτικά, η αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων με μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον όπως η βιοεξυγίανση και τα βιολογικά μέσα διασποράς, ορίζεται ως επιτακτική ανάγκη, αν αναλογιστούμε τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από ατυχήματα όπως το Deepwater horizon στον κόλπο του Μεξικό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Πετρέλαιο	9
1.1.1 Προέλευση πετρελαίου	9
1.1.2 Χημική σύσταση κ Φυσικοχημικές Ιδιότητες του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του.....	10
1.1.3 Μέθοδοι εντοπισμού πετρελαίου	13
1.1.4 Αντληση πετρελαίου	14
1.1.5 Χρήση	15
1.1.6 Επεξεργασία Πετρελαίου	16
1.2. Ρύπανση των Θαλασσών από Πετρελαιοειδή.	17
1.2.1 Χαρακτηριστικό παράδειγμα μόλυνσης της θάλασσας.....	19
1.3. Επιπτώσεις ρύπανσής από πετρελαιοειδή στο περιβάλλον	23
1.3.1 Βραχώδεις ακτές.....	24
1.3.2 Αμμώδεις και ιλυώδεις ακτές:	25
1.3.3 Πλαγκτόν	26
1.3.4 Θαλάσσια πτηνά και θηλαστικά.....	26
1.3.5 Άλλες επιπτώσεις της ρύπανσης από πετρελαιοειδή	27
1.4. Τρόποι Αντιμετώπισης Πετρελαιοκηλίδων σε Παράκτια Θαλάσσια Περιβάλλοντα.....	28
1.4.1 Φυσικές Μέθοδοι	29
1.4.2 Μη Χημικές Μέθοδοι.....	29
1.4.3 Χημικές Μέθοδοι.....	31
1.5. Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως Τεχνολογία Καθαρισμού Πετρελαιοκηλίδων.....	32
1.6. Βιοαποδόμηση Πετρελαίου.....	34
1.6.1 Μηχανισμοί Βιοαποδόμησης Του Πετρελαίου: Μικροβιολογική Προσέγγιση	34

1.6.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επιδρούν στην Βιοαποδόμηση του Πετρελαίου	35
1.7. Ο Ρόλος των Επιφανειοδραστικών Ενώσεων Βιολογικής Προέλευσης (biosurfactants)	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	41
2.1 Πειραματική διάταξη (set up)	41
2.2 Εκχύλιση - Liquid to liquid Extraction	43
2.3 Εκχύλιση Στερεής Φάσης-Solid Phase Extraction (SPE)	45
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για την ανάλυση με GCMS	47
2.5 Καλλιέργεια μικροοργανισμών	51
2.5.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων υγρής φάσης	51
2.5.2 Εφαρμογή βαφής Acridine Orange σε δείγμα μικροοργανισμών	51
2.6 Bioremediation-Αποδόμηση πετρελαίου τεστ με ταυτόχρονη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	56
Πρωτόκολλο αποτελεσματικότητας τασιενεργών ουσιών	56
3.1 Διαδικασία προσδιορισμού της απόδοσης των βιοτασιενεργών ουσιών με χρήση του πρωτοκόλλου Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA)	56
3.1.1 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε ατμοσφαιρική πίεση.	56
3.1.2 Διαδικασία προσδιορισμού της αποτελεσματικότητας των βιοτασιενεργών ουσιών στον αντιδραστήρα υψηλής πίεσης	58
3.1.3 Διαδικασία προσδιορισμού καμπύλης βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αργού πετρελαίου στο εκχύλισμα	59
3.2 Επίδραση των βιοτασιενεργών ουσιών στην βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς σε συνθήκες υψηλής πίεσης	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	61
4.1 Αποτελέσματα	61
4.1.1 Διαδικασία προσδιορισμού της απόδοσης των βιοτασιενεργών ουσιών με χρήση του πρωτοκόλλου Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA). ..	61
4.1.1.1 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε ατμοσφαιρική πίεση	61
4.1.1.2 Προσαρμογή του πρωτοκόλλου σε υψηλή πίεση	63
4.1.1.3 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του πετρελαίου στην απόδοση των επιφανειοδραστικών ουσιών σε υψηλή πίεση	63
4.1.2 Επίδραση των βιοτασιενεργών ουσιών στην βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς σε συνθήκες υψηλής πίεσης	67
4.2 Ενδεικτικά αποτελέσματα εφαρμογής της βαφής Acridine orange στα κύτταρα των μικροοργανισμών και των επωάσεων των δειγμάτων σε τρυβλία	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συμπεράσματα και συζήτηση	71

5.1 Τελικά συμπεράσματα.....	71
5.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Παραρτήματα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Οι μεγαλύτερες διαρροές πετρελαίου	22
Πίνακας 2 Οι πιο κοινές τεχνολογίες αντιμετώπισης	28
Πίνακας 3 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Oil Begone (ατμοσφαιρική πίεση).	76
Πίνακας 4 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Cherry (ατμοσφαιρική πίεση).	76
Πίνακας 5 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς BB-1000(ατμοσφαιρική πίεση).	76
Πίνακας 6 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Marichem (ατμοσφαιρική πίεση).	76
Πίνακας 7 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Experimental biosurfactant(ατμοσφαιρική πίεση).	77
Πίνακας 8 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Surfactant(ατμοσφαιρική πίεση).	77
Πίνακας 9 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Rhamnolipids Actygea. (ατμοσφαιρική πίεση).	77
Πίνακας 10 Τιμές συγκεντρώσεως αργού πετρελαίου καμπύλη βαθμονόμησης	77
Πίνακας 11 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Oil begone(υψηλή πίεση).	78
Πίνακας 12 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Experimental (υψηλή πίεση).	78
Πίνακας 13 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Marichem (υψηλή πίεση).	78
Πίνακας 14 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Cherry(υψηλή πίεση).	78
Πίνακας 15 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Rhamnolipids(υψηλή πίεση).	78
Πίνακας 16 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Surfactant(υψηλή πίεση).	79
Πίνακας 17 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς BB-1000(υψηλή πίεση).	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις αργού πετρελαίου	10
Εικόνα 2 Η χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά διάφορων αργών πετρελαίων.	11
Εικόνα 3 Άντληση πετρελαίου	14
Εικόνα 4 Άντληση πετρελαίου (θάλασσα)	15
Εικόνα 5 Χρήση πετρελαίου ως κάυσιμο	16
Εικόνα 6 Κλασματική απόσταξη πετρελαίου	16
Εικόνα 7 Πετρέλαιο απελευθερωμένο στη θάλασσα	17
Εικόνα 8 Κύριες εισαγωγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον	18
Εικόνα 9 Ατύχημα- απελευθέρωση πετρελαίου στη θάλασσα	18
Εικόνα 10 Ποσότητες πετρελαίου που διαρρέουν στο θαλάσσιο περιβάλλον ύστερα από ατύχημα	19
Εικόνα 11 Η καταστροφή του Deepwater Horizon.....	19
Εικόνα 12 Η καταστροφή του Deepwater Horizon.....	21
Εικόνα 13 Βραχώδης ακτή μολυσμένη από πετρελαίο	24
Εικόνα 14 Μολυσμένη ακτή από πετρέλαιο	25
Εικόνα 15 Πτηνά μολυσμένα από πετρέλαιο.....	26
Εικόνα 16 Πτηνά μολυσμένα από πετρέλαιο.....	27
Εικόνα 17 Τεχνικές Αντιμετώπισης-Καθαρισμού των Πετρελαιοκηλίδων	30
Εικόνα 19 Προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων σε ρυπασμένο νερό με πετρέλαιο	40
Εικόνα 20: Ο αντιδραστήρας της Parr Instruments	41
Εικόνα 21: Η συσκευή ελέγχου του αντιδραστήρα και οι φιάλες με την παροχή αέρα και αζώτου	42
Εικόνα 22: Ολόκληρη η διάταξη του αντιδραστήρα	42
Εικόνα 23: Water bath της Witeg.....	43
Εικόνα 24: Liquid-to-liquid Extraction.....	44
Εικόνα 25: SPE set-u	46
Εικόνα 25: Οι στήλες SPE	46
Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού ενός αέριου χρωματογράφου με φασματομετρία μάζας, πηγή: chromacademy.com	49
Εικόνα 27: GC/MS 7890A της Agilent Technologies (αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας)	50
Εικόνα 28 Baffled Flask	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Πετρέλαιο

Το **πετρέλαιο** (από τα Ελληνικά *πέτρα* και *έλαιο*, «λάδι της πέτρας» / λατινικά *petroleum*), που μερικές φορές στην καθημερινή γλώσσα αποκαλείται και *μαύρος χρυσός*, είναι παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα, που αποτελεί και τη σπουδαιότερη σήμερα φυσική πηγή ενέργειας. [1]

1.1.1 Προέλευση πετρελαίου

Παλαιότερα παραδέχονταν οι χημικοί και γεωλόγοι ερευνητές του αντικειμένου ότι το πετρέλαιο σχηματίστηκε από ανθρακομεταλλικές ενώσεις, τα λεγόμενα καρβίδια, όπως ακριβώς από το ανθρακαργίλιο που σχηματίζεται το μεθάνιο, από το ανθρακασβέστιο το ακετυλένιο, και από άλλα καρβίδια άλλοι κατώτεροι υδρογονάνθρακες όπως αυτοί που απαντώνται στο πετρέλαιο. Αν και η θεωρία αυτή ανάγει στη δημιουργία του πετρελαίου από ανόργανες πρώτες ύλες, είναι πράγματι ευφυής, παρά ταύτα σήμερα έχει τελείως εγκαταλειφθεί.

Ο γεωλόγος Ποτονιέ ξεκίνησε να δέχεται πως το πετρέλαιο είναι προϊόν αποσύνθεσης ζωικών και φυτικών οργανισμών που εγκλείστηκαν μέσα στα πετρώματα_σε μεγάλο βάθος στη Γη. Οπαδοί αυτού δέχονται επίσης πως οι εν λόγω οργανισμοί ήταν κυρίως θαλάσσιοι, ανάλογοι με εκείνους που αποτελούν το πλαγκτόν. Τα λείψανα αυτών των οργανισμών παρασύρθηκαν από θαλάσσια ρεύματα και ανέμους και συγκεντρώθηκαν κατά μεγάλες ποσότητες στους πυθμένες θαλασσίων λεκανών (κόλπων, λιμνοθαλασσών κ.τ.λ.).

Οι λεκάνες αυτές στη συνέχεια από διάφορες αναστατώσεις της επιφάνειας της Γης αποκλείστηκαν και καταχώθηκαν. Έτσι, εκ του αποκλεισμένου αυτού οργανικού υλικού προέκυψε με αποσύνθεση, υπό την επίδραση αναεροβίων βακτηρίων, το πετρέλαιο.

Η θεωρία αυτή βασίστηκε επίσης στο γεγονός ότι στα διάφορα πετρέλαια βρέθηκαν επίσης ίχνη χλωροφύλλης και αιμίνης. Η ύπαρξη των ενώσεων αυτών αποδεικνύει αφενός τη φυτική και ζωική προέλευση, αφετέρου ότι η δημιουργία αυτή έγινε κάτω από ήπια βιολογική δράση, δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές αποσυντίθενται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 250 βαθμών. Η θεωρία αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο και από το γεγονός ότι τα πετρέλαια σήμερα εντοπίζονται πάντα σε τυπικά

ιζηματογενή πετρώματα, ενώ στη βάση των πετρελαϊκών κοιτασμάτων ανευρίσκεται, σχεδόν πάντα, αλμυρό νερό. [1]

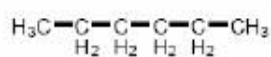
1.1.2 Χημική σύσταση κ Φυσικοχημικές Ιδιότητες του Αργού Πετρελαίου και των Προϊόντων του.

Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο είναι υγρό πέτρωμα, και αποτελείται τόσο από ενώσεις υδρογονανθράκων (αποτελούν το 50-98% της συνολικής σύνθεσης) όσο και από ενώσεις που δεν περιέχουν υδρογονάνθρακες (non- hydrocarbon) (που περιέχουν θείο, άζωτο, οξυγόνο και διάφορα ίχνη μετάλλων) σε μια ευρεία σειρά συνδυασμών . [2] [3].

Χαρακτηριστικό ή Συνστατικό	Prudhoe Bay	South Louisiana	Kuwait
API gravity (20°C)	27.8	34.5	31.4
Θείο (wt%)	0.94	0.25	2.44
Άζωτο(wt%)	0.23	0.69	0.14
Νικέλιο (ppm)	10	2.2	7.7
Βανάδιο (ppm)	20	1.9	28
Κλάσμα Νάφθας (wt%) ^a	23.2	18.6	28
Κορεσμένες Ενώσεις	19.9	16.5	20.3
Αρωματικές Ενώσεις	3.2	2.1	2.4
Ρητίνες & Ασφαλτένια	-	-	-
Κλάσμα υψηλού βρασμού (wt%) ^b	76.8	81.4	77.3
Κορεσμένες Ενώσεις	47.7	56.3	34
Αρωματικές Ενώσεις	25	16.5	21.9
Ρητίνες & Ασφαλτένια	4.1	8.6	21.4
^a	Κλάσμα που βράζει από 20 έως 205 °C		
^b	Κλάσμα που βράζει πάνω από 205 °C		

Εικόνα 1 Αντιπροσωπευτικές οργανικές ενώσεις αργού πετρελαίου

SATURATES



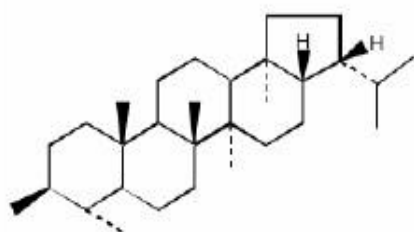
n-hexane



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



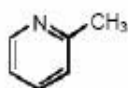
pristane ($\text{C}_{19}\text{H}_{40}$)



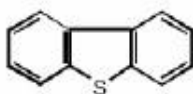
17α(H),21β(H)-hopane

RESINS

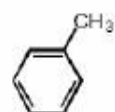
2-methylpyridine



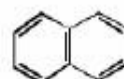
dibenzo-
thiophene



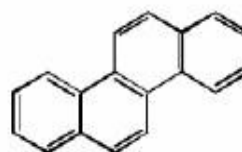
AROMATICS



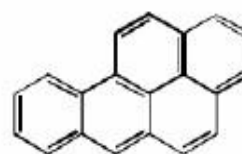
toluene



naphthalene

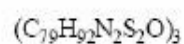


chrysene



benzo[a]pyrene

ASPHALTENES



Εικόνα 2 Η χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά διάφορων αργών πετρελαίων.

Τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες ομάδες βασιζόμενοι στη διαφορετική διαλυτότητά τους στους οργανικούς διαλύτες. [4]

- Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες:

Περιλαμβάνουν τα κανονικά και διακλαδισμένα αλκάνια με δομή C_nH_{2n+2} (αλειφατικά) και κυκλικά αλκάνια με δομή C_nH_{2n} (αλκυκυκλικά), τα οποία κυμαίνονται σε μήκος αλυσίδας από έναν άνθρακα έως και πάνω από 40 άνθρακες.

Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες είναι συνήθως τα συστατικά που υπάρχουν σε αφθονία στο αργό πετρέλαιο.

- Αρωματικοί υδρογονάνθρακες:

Περιλαμβάνουν τις μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις (π.χ., βενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλια) και τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) (π.χ., ναφθαλίνη, ανθρακένιο και φθενανθρένιο), οι οποίοι έχουν δύο ή περισσότερους συζυγείς αρωματικούς δακτυλίους. Τα PAHs είναι ιδιαίτερης περιβαλλοντικής σημασίας επειδή είναι πιθανές καρκινογόνες ουσίες ή μπορούν να μετασχηματιστούν σε καρκινογόνες ουσίες από το μικροβιακό μεταβολισμό.

- Ρητίνες:

Περιλαμβάνουν τις πολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, θείο και οξυγόνο (π.χ., πυριδίνες και θειοφαίνια). Αναφέρονται συχνά ως ενώσεις NSO.

- Ασφαλτένια:

Αποτελούνται από τις φτωχά χαρακτηρισμένες (poorly characterized) ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που περιλαμβάνουν τόσο υψηλού μοριακού βάρους όσο και φτωχά χαρακτηρισμένους υδρογονάνθρακες. Τα μέταλλα όπως το νικέλιο, το βανάδιο και ο σίδηρος συνδέονται επίσης με τα ασφαλτένια.

1.1.3 Μέθοδοι εντοπισμού πετρελαίου

Οι γεωλόγοι ερευνητές αναγκάζονται να ακολουθήσουν διάφορες μεθόδους όσον αφορά τον εντοπισμό του πετρελαίου και να είναι ικανές προς εξαγωγή σαφέστερων συμπερασμάτων, όπως τη σεισμική, την ηλεκτρική, τη σταθμική, τη ραδιενεργή μέθοδο, καθώς και τους δύο τρόπους γεώτρησης, τύπου «κείμεπ τουλ» και η τύπου «ρόταρυ». Στην πράξη, σπάνια χρησιμοποιείται μία μοναδική μέθοδος. Συνήθως χρησιμοποιείται, ανάλογα με την θέση έρευνας, συνδυασμός περισσότερων της μιας μεθόδων.

1. Σεισμική μέθοδος. Αυτή η μέθοδος βασίζεται κυρίως στην ταχύτητα μετάδοσης των δονήσεων ενός τεχνητού **σεισμού**, ο οποίος προκαλείται, συνήθως, με χρήση κατάλληλων εκρηκτικών. Πραγματοποιείται με δύο τρόπους: Είτε της διάθλασης είτε της ανάκλασης των σεισμικών κυμάτων και, βεβαίως, με αντίστοιχα σεισμικά όργανα, δεδομένου ότι τα σεισμικά κύματα δεν διέρχονται εξ ολοκλήρου από υγρά. Η μέθοδος αυτή έχει το μειονέκτημα ότι αντί πετρελαϊκού κοιτάσματος μπορεί να εντοπίσει μεγάλες ποσότητες υπόγειων υδάτων.
2. Ηλεκτρική μέθοδος. Αυτή η μέθοδος βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι ο φλοιός της Γης έχει ορισμένες ηλεκτρικές σταθερές, μία εκ των οποίων είναι και η αντίσταση διέλευσης του ηλεκτρικού ρεύματος. Έτσι, με δεδομένο ότι το πετρέλαιο δεν είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού, η ένδειξη μεγαλύτερης σχετικής αντίστασης μπορεί να θεωρηθεί ένδειξη παρουσίας πετρελαϊκού κοιτάσματος.
3. Ηλεκτρομαγνητική μέθοδος. Αυτή βασίζεται σε ευαίσθητα όργανα, τα καλούμενα μαγνητόμετρα, που μπορούν να μετρήσουν με σχετικά μεγάλη ακρίβεια την ένταση του μαγνητικού πεδίου της Γης από τόπο σε τόπο.
4. Σταθμική ή βαρυτομετρική μέθοδος. Αυτή βασίζεται στην μέτρηση της έντασης του πεδίου βαρύτητας στα διάφορα σημεία της επιφάνειας της Γης.
5. Ραδιενεργή μέθοδος. Η μέθοδος αυτή κρίνεται πολύ αξιόπιστη και εφαρμόζεται με επιτυχία σε τοποθεσίες με ήπιο ανάγλυφο.

Παρά την επικρατούσα άποψη, το πετρέλαιο δεν είναι και τόσο σπάνιο πέτρωμα, αφού δεν υπάρχει σχεδόν καμία χώρα που να μην έχει ίχνη πετρελαίου ή ασφάλτου ή φυσικά γήινα αέρια. Όμως η δυνατότητα εκμετάλλευσης αυτών είναι που το προσδιορίζει ως σπάνιο (υφιστάμενη ποσότητα και κόστος εξόρυξης). [1] [7]

1.1.4 Άντληση πετρελαίου

Η άντληση του πετρελαίου γίνεται από ειδικές πυργωτές εγκαταστάσεις, που εγκαθίστανται πάνω στις λεγόμενες πετρελαιοπηγές. Το πετρέλαιο λαμβάνεται μετά από διάτρηση του εδάφους, τη λεγόμενη γεώτρηση με τη μορφή αρτεσιανού φρέατος όπου το πετρέλαιο, σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω των υφιστάμενων πιέσεων, αναβλύζει υπό μορφή πίδακα ύψους πολλών μέτρων. Συνηθέστερα όμως εξάγεται με απάντληση κατόπιν προκαλούμενης πίεσης, στην αρχή, νερού επί του οποίου και επιπλέει το προς εξόρυξη πετρέλαιο.



Εικόνα 3 Άντληση πετρελαίου

Γενικά το πετρέλαιο από τις πετρελαιοπηγές φέρεται αναμεμιγμένο με αέρια, νερό καθώς και με μικρές ποσότητες άμμου. Τα μεν αέρια αποχωρίζονται μέσω ενός διαχωριστή και χρησιμοποιούνται είτε προς επανεισαγωγή εντός των πηγών (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) είτε οδηγούνται προς το εμπόριο ως φυσικά αέρια, είτε, τέλος, διαβιβάζονται μέσα σε απορροφητικό έλαιο, το δε νερό αποχωρίζεται από το πετρέλαιο με παραμονή του σε δεξαμενές, οπότε και αποχωρίζεται και η άμμος (με καθίζηση).

Αν, όμως, έχει αναμιχθεί το πετρέλαιο με το νερό ως γαλάκτωμα, τότε είναι απαραίτητο να ακολουθήσουν ιδιαίτερες διεργασίες θέρμανσης, καθώς και χημικές ή ηλεκτρικές μέθοδοι αποχωρισμού του νερού.

Το καθαρό πλέον ακατέργαστο πετρέλαιο συλλέγεται σε δοχεία ορισμένης χωρητικότητας από τα οποία και οδηγείται σε μεγάλες δεξαμενές από τις οποίες και θα ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία του, δηλαδή η διύλιση του (κλασματική απόσταξη). [1] [5] [6] [7]



Εικόνα 4 Άντληση πετρελαίου (θάλασσα)

1.1.5 Χρήση

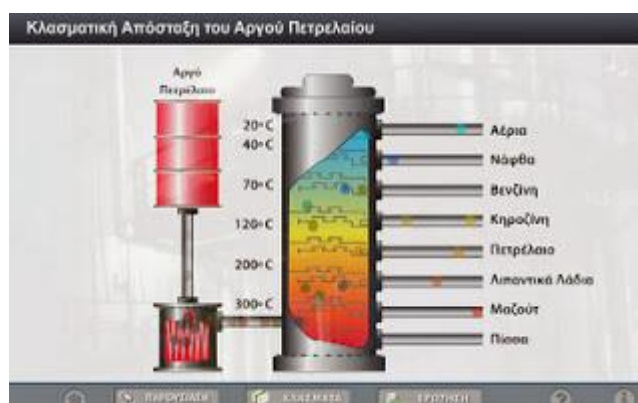
Χρησιμοποιείται συνήθως για την παραγωγή καυσίμων για μηχανές εσωτερικής καύσης και για το λόγο αυτό είναι μια σημαντική πηγή ενέργειας (στατιστικές παγκόσμιας ενέργειας ΔΟΕ -Διεθνής Οργανισμός Ενεργείας). Είναι, επίσης, η πρώτη ύλη για πολλά χημικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών, των λιπασμάτων, των φυτοφαρμάκων, καθώς και στα συνθετικά προϊόντα όπως των πλαστικών και των απορρυπαντικών ακόμη και ορισμένων εκρηκτικών υλών. Τα προϊόντα που προέρχονται από το πετρέλαιο λέγονται *πετροχημικά* (petrochemicals) και ο κλάδος της Χημείας που ασχολείται με την ανάπτυξή τους Πετροχημεία. [7] [8] [9] [1]



Εικόνα 5 Χρήση πετρελαίου ως καύσιμο

1.1.6 Επεξεργασία Πετρελαίου

Τα ακατέργαστα πετρέλαια είναι σύνθετα μίγματα πλήθους - συνήθως υδρογονανθρακικού τύπου - συστατικών με μια ευρεία ποικιλία ιδιοτήτων, συνεπώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για βιομηχανικές ή εμπορικές εφαρμογές. Επομένως τα ακατέργαστα πετρέλαια πρέπει να επεξεργαστούν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας (διυλιστήρια πετρελαίου) με τις κατάλληλες διεργασίες για να παραγάγουν μια σειρά προϊόντων που μπορούν να πωληθούν σύμφωνα με συγκεκριμένες ποιοτικές απαιτήσεις.



Εικόνα 6 Κλασματική απόσταξη πετρελαίου

Η πρώτη επεξεργασία την οποία υφίσταται ονομάζεται κλασματική απόσταξη. Η κλασματική απόσταξη είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών πετρελαίου σε ομάδες υδρογονανθράκων με κριτήριο το σημείο βρασμού τους. Έπειτα ορισμένα κλάσματα του πετρελαίου υποβάλλονται σε αποθείωση και αποσκοπεύει στην απομάκρυνση των θειούχων προσμείξεων, οι οποίες κατά την καύση δημιουργούν τα ρυπογόνα οξεία του θείου.

- Το **πετρέλαιο** (υγρό καύσιμο), μαζί με τους γαιάνθρακες, (στερεό καύσιμο) και το φυσικό αέριο, (αέριο καύσιμο), αποτελούν τα **ορυκτά καύσιμα**. [7] [8] [9] [1]

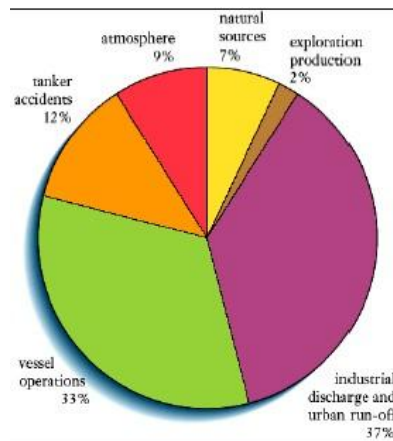
1.2. Ρύπανση των Θαλασσών από Πετρελαιοειδή.

Η σύγχρονη κοινωνία συνεχίζει να στηρίζεται στη χρήση των υδρογονανθράκων πετρελαίου για τις ενεργειακές ανάγκες της. Παρά τις πρόσφατες τεχνολογικές προόδους, τα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες του αργού πετρελαίου και των ραφιναρισμένων προϊόντων του εμφανίζονται σε συχνή βάση κατά τη διάρκεια των διεργασιών εξαγωγής, μεταφοράς, αποθήκευσης, ραφινάρισματος και διανομής. Υπολογίζεται ότι μεταξύ 1,7 και 8,8 εκατομμυρίων μετρικών τόνων του πετρελαίου απελευθερώνεται στο υδάτινο περιβάλλον κάθε έτος των οποίων περισσότερο από 90% συσχετίζεται άμεσα με τις ανθρώπινες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένης της σκόπιμης διάθεσης αποβλήτων. Αντίθετα με την κοινή αντίληψη, μόνο το 12% του πετρελαίου που απελευθερώνεται στο υδρόβιο περιβάλλον είναι από τα ατυχήματα δεξαμενόπλοιων. [10]



Εικόνα 7 Πετρέλαιο απελευθερωμένο στη θάλασσα

Κατ' εκτίμηση 100000000 τόνοι, το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής πετρελαίου που φορτώνεται ετησίως σε δεξαμενόπλοια, μεταφέρεται μέσω της Μεσογείου. Από αυτούς, κατ' εκτίμηση 330000 τόνοι αποβάλλονται σκόπιμα σε αυτήν την κλειστή θάλασσα, ενώ τα ατυχήματα αποτελούν μια πρόσθετη πηγή ρύπανσης 1.000000 τόνων ετησίως.

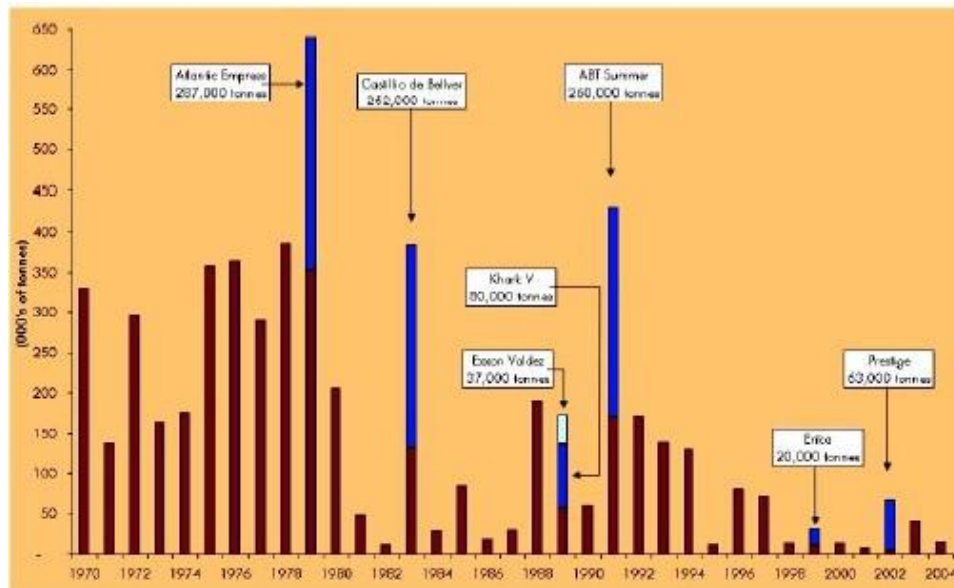


Εικόνα 8 Κύριες εισαγωγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον



Εικόνα 9 Ατύχημα- απελευθέρωση πετρελαίου στη θάλασσα

Οι προκύπτουσες κηλίδες πετρελαίου ξεβράζονται στην ξηρά από τους ανέμους επάνω στις πυκνά κατοικημένες μεσογειακές ακτές. Παρά την υψηλή ευαισθησία της Μεσογείου στα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες, με βάση τη βιβλιογραφία οι προσπάθειες αντιμετώπισης αυτών των διαρροών πετρελαίου σε αυτήν την ευαίσθητη περιοχή είναι λιγοστές. [11] Ποσότητες πετρελαίου που λόγω ατυχήματος ή ανθρώπινης αμέλειας διαρρέουν και εξαπλώνονται στην επιφάνεια της θάλασσας, αποτελούν μία από τις σοβαρότερες αιτίες ρύπανσης και καταστροφής της χλωρίδας και της πανίδας στην έκταση που καταλαμβάνουν.



Εικόνα 10 Ποσότητες πετρελαίου που διαρρέουν στο θαλάσσιο περιβάλλον ύστερα από ατύχημα

1.2.1 Χαρακτηριστικό παράδειγμα μόλυνσης της θάλασσας.



Εικόνα 11 Η καταστροφή του Deepwater Horizon

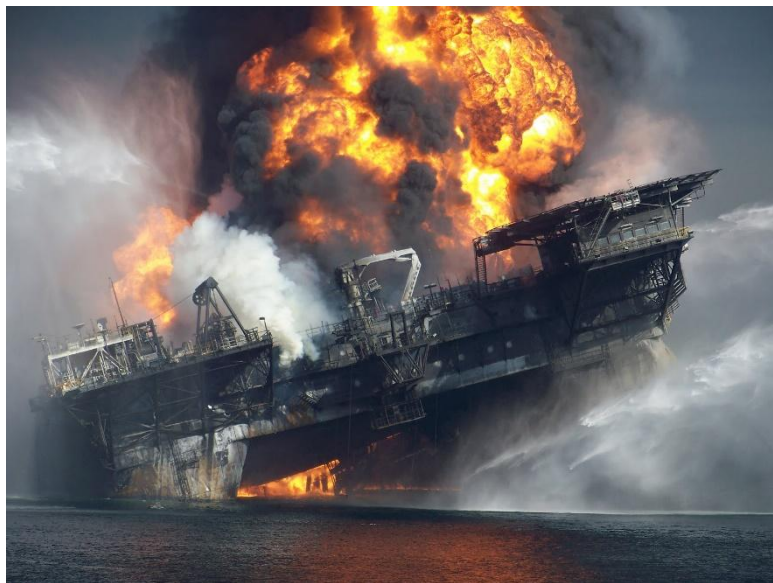
Το Deepwater Horizon ήταν ένα εξαιρετικά βαθέων υδάτων, δυναμικά τοποθετημένο, ημι-υποβρύχιο υπεράκτιας εξέδρας γεώτρησης πετρελαίου που ανήκε στην εταιρεία Transocean. Τον Απρίλιο του 2010, ενώ γινότανε γεώτρηση στο Macondo Prospect, μια έκρηξη προκλήθηκε στην εξέδρα με αποτέλεσμα να σκοτωθούν 11 μέλη του πληρώματος. Δημιουργήθηκε μια φλόγα ορατή από 40 μίλια (64 χιλιόμετρα) μακριά. Δυστυχώς η πυρκαγιά δεν μπορούσε να σβήσει και, στις 22 Απριλίου 2010, το Deepwater Horizon βυθίστηκε, αφήνοντας το πηγάδι του να αναβλύζει στο βυθό της θάλασσας και προκαλώντας τη μεγαλύτερη διαρροή πετρελαίου στα ύδατα των ΗΠΑ.

Μετά την έκρηξη, η εξέδρα Deepwater Horizon άρχισε να αναβλύζει πάνω από δύο εκατομμύρια γαλόνια πετρελαίου κάθε μέρα. Τριάντα ημέρες μετά την έκρηξη, οι άνεμοι και τα ρεύματα που κινούνται στους ωκεανούς μετακίνησαν το πετρελαίου του Deepwater Horizon από την ανοικτή θάλασσα στις πολύτιμες αλυκές των ακτών της Λουιζιάνα, Μισισσιπής, Τέξας, Αλαμπάμα και Φλόριντα, σε επίστρωση πάνω από 1.000 μίλια της ακτογραμμής. Μια περιοχή που παράγει το 80% των στρειδιών ΗΠΑ, το 69% των γαρίδων, και το 26% των εθνών μπλε καβούρι ξαφνικά συναντήθηκε με μια πλημμύρα του πετρελαίου. Αποτέλεσμα, τα αλιεία έκλεισαν, ο τουρισμός σταμάτησε.

Η πετρελαιοκηλίδα του Deepwater Horizon πετρελαίου ήταν μια άνευ προηγουμένου καταστροφή στην ιστορία των ΗΠΑ. Όχι μόνο ήταν η πιο μαζική από την άποψη του όγκου του πετρελαίου που χύθηκε, αλλά και γιατί ήταν η μεγαλύτερη στη χρήση μιας τοξικής ουσίας διασποράς, Corexit, στο φυσικό περιβάλλον. Πολυάριθμες μελέτες που διεξάχθηκαν από τους ερευνητές στην περιοχή έδειξαν ότι το μέσο διασποράς είναι τοξικό για το φυτοπλαγκτόν και για άλλα είδη που ζουν στον Κόλπο με μία μελέτη που υποδηλώνει ότι το μίγμα πετρελαίου και Corexit μαζί δημιουργεί συνθήκες που είναι 52 φορές πιο τοξικές από μόνο του.

Ακόμα και μετά από πέντε χρόνια έρευνας από τις ομοσπονδιακές και ιδιωτικές βιομηχανίες, ακόμα δεν γνωρίζουμε τις μακροπρόθεσμες συνέπειες και για πόσο καιρό το πετρέλαιο και ο παράγοντας διασποράς θα συνεχίσουν να υπάρχουν στον κόλπο, πόσο καιρό θα ταξιδέψουν μέσω της τροφικής αλυσίδας, και, τελικά, ο αντίκτυπος που θα έχει για τον άνθρωπο όταν καταναλώσει είδη που έχουν συσσωρεύσει αυτές τις χημικές ουσίες. Χιλιάδες πουλιά, θαλάσσιες χελώνες και τα δελφίνια ξεβράστηκαν κατά τους μήνες μετά τη διαρροή, γαρίδες βρέθηκαν χωρίς μάτια, καβούρια χωρίς νύχια, και τα ψάρια με βλάβες και όγκοι σε όλα τα όργανα τους, μεταξύ άλλων μεταλλάξεων. Η μοίρα των θαλάσσιων θηλαστικών, ιδιαίτερα ρινοδέλφια στον Κόλπο, συνεχίζει να παραμένει ζοφερή. Ο αριθμός των δελφινιών που ξεβράστηκαν στις παραλίες του Κόλπου ήταν 8 φορές υψηλότερος από τον ιστορικό μέσο όρο στη Λουιζιάνα, και 4 και 5 φορές υψηλότερος στην Αλαμπάμα και το Μισισσιπή, αντίστοιχα. Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε πειστικές αποδείξεις που συνδέουν τους θανάτους δελφινιών στην πετρελαιοκηλίδα.

Ενώ οι σοβαρές επιπτώσεις για τα φυσικά οικοσυστήματα από την πετρελαιοκηλίδα ήταν τεράστιες, οι συνέπειες της πετρελαιοκηλίδας και της χημικής ουσίας διασποράς για την ανθρώπινη υγεία έχει αγνοηθεί. Στα χρόνια μετά την πετρελαιοκηλίδα, υπολογίζεται ότι 170.000 άνθρωποι εργάστηκαν σε κάποιο πόστο για να καθαριστούν από το λάδι και την πίσσα οι ακτές. Οι πιο συχνές ιατρικές εκθέσεις από τους εργαζόμενους ήταν πονοκέφαλοι, δύσπνοια, δερματικά εξανθήματα και χρόνιο βήχα. Οι άνθρωποι που εργάστηκαν για την πετρελαιοκηλίδα είχαν σημαντικά αλλαγμένο προφίλ του αίματος που τους θέτει σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος, λευχαιμία και άλλες διαταραχές. [16]



Εικόνα 12 Η καταστροφή του Deepwater Horizon

Οι μεγαλύτερες διαρροές πετρελαίου στον κόσμο

Όνομα	Περιοχή	Ημερομηνία	Μέγεθος (βαρέλια)
Πόλεμος του Κόλπου	Περσικός Κόλπος	21/1/1991	10-11.000.000
Ixtoc I (πλατφόρμα)	Περσικός Κόλπος	3/6/1979 – 23/3/1980	3,3-3.500.000
Atlantic Empress και Aegean Captain (σύγκρουση 2 τάνκερ)	Τρινιντάντ και Τομπάγκο	19/7/1979	2.100.000
Κοιλάδα της Φεργκάνα	Ουζμπεκιστάν	2/3/1992	2.100.000
Πετρελαϊκές Εγκαταστάσεις Nowruz	Περσικός Κόλπος	Φεβρουάριος 1983	1.900.000
ABT Summer (τάνκερ)	Αγκόλα	1991	1.900.000
Castillo de Bellver (τάνκερ)	Νότια Αφρική	6/8/1983	1.850.000
Amoco Cadiz (τάνκερ)	Βρετάνη, France	16/3/1978	1.600.000
Amoco Haven (τάνκερ)	Μεσόγειος	1991	1.060.000
Odyssey (τάνκερ)	Nova Scotia, Καναδάς	1988	970.000
Sea Star (τάνκερ)	Κόλπος του Ομάν	19/12/1972	840.000
Torrey Canyon (τάνκερ)	Νησιά Scilly, Μεγάλη Βρετανία	18/3/1967	590.000-870.000
Irenes Serenade (τάνκερ)	Ελλάδα	1980	730.000
Urquiola (τάνκερ)	Λα Κορούνια, Ισπανία	12/5/1976	730.000
Exxon Valdez (τάνκερ)	Κόλπος της Αλάσκα	24/3/1989	257.000
Deepwater Horizon (πλατφόρμα)	Κόλπος του Μεξικού	20/4/ 2010 - ?	5.0 θε μέρα

Πίνακας 1 Οι μεγαλύτερες διαρροές πετρελαίου

1.3. Επιπτώσεις ρύπανσής από πετρελαιοειδή στο περιβάλλον

Η ρύπανση της θάλασσας αλλά και του εδάφους με πετρελαιοειδή έχει τεράστιες συνέπειες στο φυσικό περιβάλλον. Το πετρέλαιο είναι ελαφρότερο από το νερό και γι' αυτό επιπλέει στην επιφάνειά του. Από τη στιγμή που το πετρέλαιο θα βρεθεί στη θάλασσα, αρχίζει μια αργή, φυσική διαδικασία οξείδωσης και βιοδιάσπασης του από μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να διασπούν υδρογονάνθρακες.

Το υπόλειμμα του πετρελαίου τρεις μήνες περίπου μετά τη δημιουργία της πετρελαιοκηλίδας αποτελείται από ένα υδρόφοβο τμήμα, που συσσωματώνεται σε σβώλους, και ένα υδρόφιλο τμήμα, το οποίο προσλαμβάνει μεγάλες ποσότητες νερού και μετατρέπεται σε ένα παχύρρευστο γαλάκτωμα με τη μορφή ελαιώδους λάσπης, που ονομάζεται "μους σοκολάτα".

Οι σβώλοι κατακάθονται στο βυθό ή μεταφέρονται με τη βοήθεια ρευμάτων στις κοντινές ακτές μαζί με τη "μους σοκολάτα", όπου παραμένουν για λίγους μήνες (ακτές με έντονα κύματα) ή και για χρόνια (ήρεμες ακτές). Το 30-40% των πετρελαιοειδών που ρίχνονται στην επιφάνεια της θάλασσας αποτελείται από πτητικά συστατικά, τα οποία εξατμίζονται γρήγορα, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά σχηματίζουν ένα λεπτό, «μονομοριακό» όπως λέγεται, στρώμα πετρελαίου το οποίο εμποδίζει τις φυσικές ανταλλαγές που συμβαίνουν μεταξύ νερού και ατμοσφαιρικού αέρα, και οι οποίες είναι απαραίτητες για το βιολογικό κύκλο της θαλάσσιας ζωής.

Το στρώμα αυτό του πετρελαίου, με άλλα λόγια, μειώνει στο ελάχιστο την ανανέωση του νερού με το οξυγόνο του αέρα, εμποδίζει τις ακτίνες του ήλιου να εισχωρήσουν βαθιά στη θάλασσα για τη φωτοσύνθεση, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και υπερβολική ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν οξυγόνο. Τα μαλάκια και τα φυτά είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε αυτή τη ρύπανση γιατί δηλητηριάζονται και πεθαίνουν από ασφυξία. Το ίδιο συμβαίνει και με τα ψάρια εκείνα που δεν εγκαταλείπουν έγκαιρα τη ρυπασμένη περιοχή.

Η πίσσα που εκβράζεται στις παραλίες καταστρέφει τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, ενώ έχει υπολογιστεί ότι απαιτούνται 2-3 χρόνια για να αποκατασταθεί μερικώς η παράκτια χλωρίδα.

Ως προς τα πουλιά οι επιπτώσεις της ρύπανσης είναι δραματικές. Τα φτερά τους καλύπτονται από πετρέλαιο, δεν μπορούν να πετάξουν, πεθαίνουν από το κρύο γιατί δεν έχουν πλέον το μονωτικό στρώμα των φτερών και των πούπουλων, ενώ όσα επιβιώνουν, δηλητηριάζονται και πεθαίνουν στην προσπάθειά τους να απαλλαγούν από το πετρέλαιο

Στη Μεσόγειο, λόγω της απουσίας μεγάλων κυμάτων, έντονων καιρικών φαινομένων, αλλά και μεγαλύτερης συγκέντρωσης αλατότητας, η φυσική διάλυση μιας πετρελαιοκηλίδας δυσχεραίνεται. Ο ρυθμός των ποσοτήτων του πετρελαίου που βουλιάζουν ή διαλύονται είναι αργός κατά τη διάρκεια μιας πετρελαιο ρύπανσης. Εκτός από τις καταστρεπτικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, αξιοσημείωτες είναι και οι δυσμενείς επιπτώσεις των πετρελαιοκηλίδων στην αλιεία και τον τουρισμό στις περιοχές που πλήττονται, καθώς και η απώλεια μεγάλων ποσοτήτων πετρελαίου που για να δημιουργηθεί από τη φύση χρειάστηκαν εκατομμύρια χρόνια. [14]

1.3.1 Βραχώδεις ακτές

Οι θαλάσσιες ακτές είναι σημαντικοί δημόσιοι και οικολογικοί πόροι που αποτελούν το σπίτι για ποικίλα είδη της άγριας φύσης και παρέχουν δημόσια αναψυχή. Οι θαλάσσιες πετρελαιοκηλίδες, ιδιαίτερα τα ατυχήματα μεγάλης κλίμακας, έχουν θέσει σε μεγάλο κίνδυνο και έχουν προκαλέσει εκτενή ζημιά στα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα.



Εικόνα 13 Βραχώδης ακτή μολυσμένη από πετρέλαιο

Παραδείγματος χάριν, η πετρελαιοκηλίδα 37.000 τόνων αργού πετρελαίου North Slope στον Prince William Sound, της Αλάσκας, από το Exxon Valdez το 1989 που οδήγησε στη θνησιμότητα χιλιάδων θαλασσοπουλιών και θαλάσσιων θηλαστικών, σε σημαντική μείωση του πληθυσμού πολλών οργανισμών και σε πολλές μακροπρόθεσμες περιβαλλοντικές [13] [14]

Λόγω της υψηλής ενέργειας (κυματισμός, παλίρροιες κλπ) το πετρέλαιο ξεπλένεται γρήγορα, εν τούτοις υπάρχουν φαινόμενα άμεσης τοξικότητας στα Χλωροφύκη και Ροδοφύκη, καθώς και σημαντικές άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στους πληθυσμούς των φυτοφάγων οργανισμών, μεταβάλλοντας σημαντικά την δομή των βιοκοινωνιών. [14]

1.3.2 Αμμώδεις και ιλυώδεις ακτές:

Εδώ οι επιπτώσεις είναι σημαντικότερες, γιατί το πετρέλαιο κατακαθίζει στον βυθό, ενσωματώνεται στο επιφανειακό ίζημα με αποτέλεσμα την δημιουργία ανοξικών συνθηκών με ολέθριες συνέπειες για την ενδοπανίδα. Η επιπανίδα υφίσταται τόσο την άμεση τοξική δράση του πετρελαίου, όσο και τις έμμεσες συνέπειες που έχει αυτό στην τροφή της, δηλ. Την ενδοπανίδα. Επιπλέον η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου σε αυτές τις ακτές, έχει σαν αποτέλεσμα τη βραδύτερη αποικοδόμηση του πετρελαίου και επομένως την παράταση της τοξικής του δράσης. [14]



Εικόνα 14 Μολυσμένη ακτή από πετρέλαιο

1.3.3 Πλαγκτόν

Το Πλαγκτόν, και ιδιαίτερα το νευστόν, υφίσταται εντονότερα την τοξική δράση του πετρελαίου στην πρώτη φάση, όταν δηλαδή επιπλέει, διότι περιέχει ακόμη μεγάλες ποσότητες μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους ενώσεις που είναι και οι πλέον τοξικές.

Το πετρέλαιο σε αυτή τη φάση, έχει σχετικά μικρό ειδικό βάρος και κατά συνέπεια συγκρατείται στα ανώτερα στρώματα της στήλης του νερού. Έκτος της τοξικής χημικής δράσης του σημαντική είναι και η φυσική: το πετρέλαιο έχει την τάση να απλωθεί σε όσο γίνεται μεγαλύτερη έκταση στην επιφάνεια του νερού, δημιουργώντας έτσι ένα λεπτό στρώμα (φιλμ), το οποίο εμποδίζει την ανταλλαγή των αερίων, αλλά και την εισχώρηση της ηλιακής ακτινοβολίας, που είναι απαραίτητη για την φωτοσύνθεση. Οι επιπτώσεις αυτές όμως δεν διαρκούν πολύ και φαίνεται ότι το πλαγκτονικό σύστημα ανακάμπτει σχετικά γρήγορα. [14]

1.3.4 Θαλάσσια πτηνά και θηλαστικά

Στην περίπτωση των θαλασσίων πτηνών έχουμε ίσως την σοβαρότερη συνέπεια της ρύπανσης από πετρελαιοειδή και αυτό οφείλεται κυρίως στην φυσική δράση του πετρελαίου, το οποίο ερχόμενο σε επαφή με το πτέρωμα των πτηνών καταστρέφει την μόνωση που αυτό παρέχει έναντι του νερού, οπότε τα πτηνά είτε βυθίζονται, είτε πεθαίνουν από απώλεια θερμότητας.



Εικόνα 15 Πτηνά μολυσμένα από πετρέλαιο

Αντίθετα η τοξική-χημική δράση του πετρελαίου στα πουλιά δεν είναι σημαντική, γιατί δρα μόνο μετά την κατάποση, κάτι που δεν συμβαίνει εύκολα. Οι απώλειες στους πληθυσμούς των θαλάσσιων πτηνών που έχουν αναφερθεί είναι πολλές και δύσκολα

αναπληρώσιμες, λόγω του σχετικά μικρού αριθμού απογόνων τους σε σχέση με άλλους οργανισμούς.



Εικόνα 16 Πτηνά μολυσμένα από πετρέλαιο

Τα θαλάσσια θηλαστικά δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε αυτή τη μορφή ρύπανσης και δεν έχουν αναφερθεί παρά μερικές περιπτώσεις μικρών φώκιας που μολύνθηκαν από πετρέλαιο.[14]

1.3.5 Άλλες επιπτώσεις της ρύπανσης από πετρελαιοειδή

Εκτός της επίδρασης στα οικοσυστήματα, μία άλλη δυσμενής επίπτωση κυρίως της χρόνιας μορφής ρύπανσης από πετρελαιοειδή, είναι οι οικονομικές συνέπειες στην αγορά αλιευμάτων. Ακόμα και μικρές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων, προσδίδουν μια χαρακτηριστική δυσάρεστη γεύση τόσο στα ψάρια, όσο και σε άλλα αλιεύματα που οδηγεί στην απαγόρευση διάθεσής τους στο εμπόριο.

Σε ότι αφορά τον τουριστικό τομέα, η τουριστική αγορά δεν αποδέχεται ακτές που έχουν επηρεαστεί από διαρροές πετρελαίου. Ιδιαίτερο πρόβλημα αποτελούν οι μορφές πίσσας, που μολονότι δεν έχουν τοξική δράση δημιουργούν δυσάρεστη αίσθηση και κυρίως παραμένουν στις ακτές όπου αποτίθενται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.[14]

1.4. Τρόποι Αντιμετώπισης Πετρελαιοκηλίδων σε Παράκτια Θαλάσσια Περιβάλλοντα.

Η πετρελαϊκή ρύπανση του θαλάσσιου χώρου αποτελεί ένα μείζον περιβαλλοντικό και οικονομικό ζήτημα παγκοσμίως διαστάσεων. [14]

Οι στρατηγικές για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων επηρεάζονται πολύ από ποικίλους παράγοντες, όπως ο τύπος του πετρελαίου, τα χαρακτηριστικά της πληγείσας περιοχής και περιστασιακά από τις πολιτικές εκτιμήσεις. Διάφορες προσεγγίσεις και τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αναθεωρηθεί και έχουν περιγραφεί εκτενώς σε διάφορα τεχνικά έγγραφα, όπως: Shoreline Countermeasure Manual [18], Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response [19], Understanding Oil Spills and Oil Spill Response [20], and Oil Spill Response in the Marine Environment [21].

Κατηγορία Μεθόδων Αντιμετώπισης	Τεχνολογία
Φυσικές Μέθοδοι	Φυσική βιοεξυγίανση
Μη χημικές μέθοδοι	Booming Skimming Manual removal Mechanical removal Washing Sediment relocation Tiling In- situ burning
Χημικές Μέθοδοι	Dispersants Demulsifiers Solidifiers Surface film chemicals

Πίνακας 2 Οι πιο κοινές τεχνολογίες αντιμετώπισης

1.4.1 Φυσικές Μέθοδοι

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

1.4.2 Μη Χημικές Μέθοδοι

Η μη χημικές μέθοδοι συγκράτησης και αποκατάστασης του μαζικού ή ελεύθερου πετρελαίου είναι η πρωταρχική επιλογή αντιμετώπισης στις Ηνωμένες Πολιτείες για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Οι συνήθεις χρησιμοποιημένες μη χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν:

Booming and skimming: Χρήση των πλωτών φραγμών για να συγκρατηθεί και να ελεγχθεί η μετακίνηση του επιπλέοντος πετρελαίου και χρήση των εξαρτιστών για να ανακτηθεί. Η περιβαλλοντική επίδραση αυτής της μεθόδου είναι ελάχιστη εάν ελέγχεται η κυκλοφορία του εργατικού δυναμικού καθαρισμού.

Wiping with absorbent materials: Χρήση υδροφοβικών υλικών για την απομάκρυνση του πετρελαίου επάνω από τη μολυσμένη επιφάνεια. Αν και η διάθεση των ρυπασμένων απορριμμάτων είναι ένα ζήτημα, η περιβαλλοντική επίπτωση αυτής της μεθόδου είναι επίσης περιορισμένη εάν η κυκλοφορία των πληρωμάτων καθαρισμού και η παραγωγή αποβλήτων ελέγχεται.

Μηχανική απομάκρυνση: Συλλογή και απομάκρυνση των ρυπασμένων επιφανειών με πετρέλαιο, των ιζημάτων χρησιμοποιώντας μηχανικό εξοπλισμό. Αυτή η μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν μικρά ποσά υλικών με πετρέλαιο. Δεν πρέπει να ληφθεί υπόψη στον καθαρισμό των ευαίσθητων βιότοπων ή όπου η διάβρωση είναι ζήτημα.

Πλύση: έκπλυση του πετρελαίου που εμμένει κατά μήκος των ακτών στο νερό για συλλογή. Οι στρατηγικές έκπλυσης κυμαίνονται από χαμηλής πίεσεως έκπλυση με κρύο νερό σε έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Αυτή η μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται ειδικά με υψηλή πίεση ή καυτό νερό, πρέπει να αποφεύγεται σε υγρότοπος ή άλλους ευαίσθητους βιότοπους.

Sediment relocation and tilling: Μετακίνηση του ρυπασμένου με πετρέλαιο ιζήματος από το ένα τμήμα της παραλίας σε άλλο ή με επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling) και αναμιξη του ρυπασμένου ιζήματος για να ενισχυθεί ο φυσικός καθαρισμός μέσω της διασποράς του πετρελαίου στην υδάτινη στήλη και την προώθηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πετρελαίου και των ανόργανων σωματιδίων. Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διείσδυση του πετρελαίου βαθιά στα ιζήματα των ακτών. Οι πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις από την απελευθέρωση του πετρελαίου και τα ρυπασμένα ιζήματα στα παρακείμενα υδάτινα στρώματα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη.

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



Εικόνα 17 Τεχνικές Αντιμετώπισης-Καθαρισμού των Πετρελαιοκηλίδων

1.4.3 Χημικές Μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι, ιδιαίτερα οι χημικές ενώσεις διασποράς (dispersants), έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως σε πολλές χώρες ως επιλογή αντιμετώπισης. Για μερικές χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, όπου οι δύσκολες παράκτιες συνθήκες μπορούν να καταστήσουν τη μηχανική αντιμετώπιση προβληματική, οι χημικές ενώσεις διασποράς είναι η αρχική επιλογή [22]. Εντούτοις, οι χημικές μέθοδοι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω της διαφωνίας σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και της ανησυχίας περί τοξικότητας και μακροπρόθεσμων περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους ([20]).

Σημαντικοί υπάρχοντες χημικοί παράγοντες είναι:

Χημικές ενώσεις διασποράς: (dispersing agents), που περιέχουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες, χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια για να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη προτού το πετρέλαιο φθάσει και μολύνει την ακτή. Χρησιμοποιούνται για να μειωθούν οι τοξικές επιδράσεις του πετρελαίου με τη διάλυση του σε κατώτατες συγκεντρώσεις και να επιταχυνθεί ο ρυθμός βιοδιάσπασης του

Demulsifiers: Χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τα πετρέλαιο σε νερό (oil-in-water) γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά.

Solidifiers: Οι χημικές ουσίες που ενισχύουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν το πετρέλαιο, για να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση και για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης.

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

1.5. Η Βιοεξυγίανση (Bioremediation) ως Τεχνολογία Καθαρισμού Πετρελαιοκηλίδων

Αν και οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η φυσική απομάκρυνση (physical removal), είναι ο πρώτος τρόπος αντιμετώπισης, σπάνια επιτυγχάνουν τον πλήρη καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων. Οι τρέχουσες μηχανικές μέθοδοι ανακτούν χαρακτηριστικά λιγότερο από 10-15 τοις εκατό του πετρελαίου μετά από μία μεγάλης έκτασης πετρελαιοκηλίδα [23]. Η βιοεξυγίανση έχει προκύψει ως μια από τις πιο ελπιδοφόρες δευτεροβάθμιες επιλογές επεξεργασίας (secondary treatment options) για την απομάκρυνση πετρελαίου μετά από την επιτυχή εφαρμογή της (στο ατύχημά του Exxon Valdez του 1989 [24],[25]).

Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως "η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης" ([26]). Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπάσιμο στη φύση ([27], [28], [29]). Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τη δυνατότητά 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.).

Τόσο οι εργαστηριακές μελέτες όσο και οι μελέτες πεδίου έχουν δείξει ότι η βιοεξυγίανση, και η βιοδιέγερση ειδικότερα, μπορεί να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στις ρυπασμένες ακτές ([30], [31]).

Η βιοεξυγίανση έχει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνολογιών. Κατ' αρχάς, η εφαρμογή της βιοεξυγίανσης είναι σχετικά ανέξοδη. ([33]). Η βιοεξυγίανση είναι επίσης μια πιο περιβαλλοντικά φιλική τεχνολογία δεδομένου ότι

περιλαμβάνει την τελική αποικοδόμηση του πετρελαίου σε ανόργανα προϊόντα (όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό), ενώ οι φυσικές και χημικές μέθοδοι μεταφέρουν χαρακτηριστικά το ρυπαντή από το ένα περιβαλλοντικό διαμέρισμα σε άλλο. Δεδομένου ότι είναι βασισμένη σε φυσικές διεργασίες και είναι λιγότερο παρεισφρητική και αποσυνδεδετική για τη ρυπασμένη περιοχή, αυτή η "πράσινη τεχνολογία" μπορεί επίσης να είναι πιο αποδεκτή στο ευρύ κοινό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοεξυγίανση περιλαμβάνει ιδιαίτερα ετερογενείς και σύνθετες διεργασίες. Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης πετρελαίου εξαρτάται από την κατοχή των κατάλληλων μικροοργανισμών στο πεδίο με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η λειτουργική χρήση της μπορεί να περιοριστεί από τη σύνθεση του πετρελαίου. Είναι επίσης μια σχετικά αργή διαδικασία, που απαιτεί εβδομάδες έως μήνες για να εφαρμοστεί, η οποία μπορεί να μην είναι εφικτή όταν απαιτείται άμεσος καθαρισμός.

Ανησυχίες προκύπτουν επίσης από τα πιθανά δυσμενή αποτελέσματα που συνδέονται για με την εφαρμογή των παραγόντων βιοεξυγίανσης (bioremediation agents). Αυτά περιλαμβάνουν την τοξικότητα των ιδίων βιοεξυγίανσης και των μεταβολικών παραπροϊόντων της αποικοδόμησης του πετρελαίου και τον πιθανό ευτροφισμό που συνδέεται με τον θρεπτικό εμπλουτισμό [29].

Εν κατακλείδι η βιοεξυγίανση έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα οικονομικό εργαλείο επεξεργασίας, εάν χρησιμοποιείται κατάλληλα, στον καθαρισμό ορισμένων ρυπασμένων με πετρέλαιο περιβαλλόντων. Έχουν παρατηρηθεί λίγα καταστρεπτικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή της στο πεδίο. Η εφαρμογή της βιοεξυγίανσης συναντά προκλήσεις. Παρόλο που έχει πραγματοποιηθεί εκτενής έρευνα για τη βιοεξυγίανση πετρελαίου, δεν γίνεται εφαρμογή της, διότι οι περισσότερες υπάρχουσες μελέτες έχουν επικεντρωθεί είτε στην αξιολόγηση της δυνατότητας πραγματοποίησης της βιοεξυγίανσης για την αντιμετώπιση της ρύπανσης πετρελαίου, είτε στη δοκιμή προϊόντων και μεθόδων [34]

Υπάρχει άμεση ανάγκη για ένα λεπτομερές και εφαρμόσιμο σύνολο οδηγιών για την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας που να απαντά στις ερωτήσεις όπως πότε να χρησιμοποιηθεί η βιοεξυγίανση, ποιοι παράγοντες βιοεξυγίανσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν, πώς να τους εφαρμόσουν και πώς να ελέγξουν και να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα.

1.6. Βιοαποδόμηση Πετρελαίου

Η βιοαποδόμηση 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.

Η βιοαποδόμηση περιλαμβάνεται στην βιοεξυγίανση και δεν είναι συνώνυμοι οι όροι, αναφέρεται στη φυσική διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα μικροοργανισμοί μεταβάλλουν και διασπούν τα οργανικά μόρια (υδρογονάνθρακες) σε άλλες ουσίες, όπως λιπαρά οξέα και διοξείδιο του άνθρακα

Πολυάριθμα επιστημονικά άρθρα έχουν καλύψει τις διάφορες πτυχές αυτής της διεργασίας και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό βιοδιάσπασης ([46], [47], [26], [36], [10], [37], [35]).

1.6.1 Μηχανισμοί Βιοαποδόμησης Του Πετρελαίου: Μικροβιολογική Προσέγγιση

1.6.1.1 Κατανομή των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου και τις σχετικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένοι στο θαλάσσιο και όχι μόνο περιβάλλον. 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 [47].

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κυρίαρχοι βιοαποδομητές υδρογονανθράκων με εύρος κατανομής που καλύπτει ακόμη και τα ακραία κρύα ανταρκτικά και αρκτικά περιβάλλοντα ([48], [36]).

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 μόλυνση πετρελαίου θα έχουν υψηλότερο ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων σε σχέση με τις αρρύπαντες περιοχές.

Στα "καθαρά (pristine)" οικοσυστήματα, οι μικροοργανισμοί που καταναλίσκουν υδρογονάνθρακες μπορεί να αποτελούν λιγότερο από 0,1% της μικροβιακής κοινότητας και στα ρυπασμένα με πετρέλαιο περιβάλλοντα, μπορεί να αποτελούν μέχρι και το 100% των βιώσιμων μικροοργανισμών [27]. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν

υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με τη μεταβολική ικανότητα να αποδομεί 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.

Καταληκτικά παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση [48].

1.6.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επιδρούν στην Βιοαποδόμηση του Πετρελαίου

Όταν εμφανίζονται πετρελαιοκηλίδες στο περιβάλλον, ο ρυθμός βιοδιάσπασης του πετρελαίου επηρεάζεται επίσης πολύ από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος.

1.6.2.1 Διεργασίες γήρανσης

Οι διεργασίες γήρανσης έχουν βαθιές επιδράσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η εξάτμιση των πτητικών συστατικών του πετρελαίου μπορεί να ωφελήσει τους μικροοργανισμούς με την απομάκρυνση των τοξικότερων μικρού μοριακού βάρους συστατικών όπως το βενζόλιο και των μικρότερων n-αλκανίων.

Εντούτοις, αυτή η διαδικασία οδηγεί επίσης σε ένα μικρότερο βιοδιασπάσιμο ποσοστό πετρελαίου, δεδομένου ότι αυτά τα συστατικά γενικά βιοδιασπώνται εύκολα ([27], [10]).

Η περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου είναι σημαντική επειδή η αύξηση των βιοαποδομητών πετρελαίου εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος [46].

Ο σχηματισμός των νερό σε πετρέλαιο γαλακτωμάτων ή «μους» μειώνει την περιοχή επιφάνειας, επομένως μειώνεται η βιοδιάσπαση. Οι πίσσες, που είναι μεγάλα σύνολα γηρασμένου και μη αποικοδομήσιμου πετρελαίου, περιορίζουν επίσης την πρόσβαση των μικροοργανισμών λόγω της περιορισμένης περιοχής επιφάνειάς τους [35].

Ο σχηματισμός των πετρελαιο σε νερό γαλακτωμάτων μέσω της μικροβιακής παραγωγής και της απελευθέρωσης των επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) έχει βρεθεί επίσης ότι είναι μια σημαντική διεργασία στη λήψη των υδρογονανθράκων από τα βακτήρια και τους μύκητες [47].

Αντίθετα, η εφαρμογή των χημικών διασποράς (dispersants) έχει παραγάγει μικτά αποτελέσματα και δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να ενισχυθεί η βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η φωτοοξειδωση οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων διαλυτών ενώσεων, οι οποίες είναι συχνά πιο βιοδιασπάσιμες. Εντούτοις, η επίδραση των διεργασιών φωτοοξειδωσης στη βιοδιάσπαση ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή [38].

Συμπερασματικά, οι διεργασίες γήρανσης επηρεάζουν τις τελικές συγκεντρώσεις των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον με διάφορους τρόπους. Η εξάτμιση μπορεί να μειώσει τις συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων αλλά συγκεντρώνει μερικά άλλα συστατικά. Η προσρόφηση και η γαλακτωματοποίηση συγκεντρώνουν τους ρύπους, ενώ η διασπορά και η διάλυση τείνουν να τους αραιώνουν. [48]

1.6.2.2 Θερμοκρασία

Η ατμοσφαιρική θερμοκρασία ενός περιβάλλοντος επηρεάζει τόσο τις ιδιότητες του πετρελαίου όσο και τη δραστηριότητα του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, το ιξώδες του πετρελαίου αυξάνεται, ενώ η πτητικότητα των τοξικών μικρού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων μειώνεται, καθυστερώντας την αρχή της βιοδιάσπασης [27].

Μερικοί υδρογονάνθρακες είναι πιο διαλυτοί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (π.χ., τα αλκάνια μικρής αλυσίδας), και μερικές μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις είναι πιο διαλυτές σε υψηλότερες θερμοκρασίες [48]. Αν και η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων μπορεί να εμφανιστεί πέρα από ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, ο ρυθμός βιοδιάσπασης μειώνεται γενικά μειώνοντας τη θερμοκρασία.

Υψηλότεροι ρυθμοί αποικοδόμησης εμφανίζονται γενικά στη περιοχή από 15 έως 20°C στο θαλάσσιο περιβάλλον ([47], [39], [27]). Η επίδραση της θερμοκρασίας περιπλέκεται επίσης από άλλους παράγοντες όπως η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού. Στα περιβάλλοντα όπου ένας ψυχρόφιλος πληθυσμός έχει καθιερωθεί, η αποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί σε σημαντικούς ρυθμούς υπό κρύες συνθήκες. Η

βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασία τόσο χαμηλή όσο 0-2 °C στο θαλασσινό νερό και -1.1 °C στο έδαφος.

1.6.2.3 Οξυγόνο

Οι αερόβιες συνθήκες θεωρούνται γενικά απαραίτητες για την εκτενή αποδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον δεδομένου ότι τα σημαντικότερα μονοπάτια αποδόμησης και για τα κορεσμένα και για τα αρωματικά περιλαμβάνουν τις οξυγενάσεις ([27], [41]). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση του οξυγόνου οδηγεί σε αισθητά μειωμένες δραστηριότητες βιοδιάσπασης στα θαλάσσια ιζήματα και στα εδάφη ([27], [47]). Οι περιοριστικές συνθήκες οξυγόνου κανονικά δεν υπάρχουν στα ανώτερα επίπεδα της υδάτινης στήλης στα θαλάσσια περιβάλλοντα και στο επιφανειακό στρώμα των περισσότερων ακτών. Το οξυγόνο μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας στα υποεπιφανειακά ιζήματα, στις ανοξικές ζώνες των υδάτινων στηλών και στις περισσότερες λεπτόκοκκες θαλάσσιες ακτές.

Οι παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι η δράση του κύματος και η ροή του νερού, η φυσική κατάσταση του πετρελαίου και το ποσό των διαθέσιμων υποστρωμάτων (substrates). Η αναερόβια αποικοδόμηση του πετρελαίου σύμφωνα με κάποιες μελέτες εμφανίζεται μόνο σε αμελητέους ρυθμούς [27], οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η περιβαλλοντική σημασία της αναερόβιας αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων μπορεί να απορριφθεί. Μελέτες επίσης έχουν καταδείξει ότι σε μερικά θαλάσσια ιζήματα, τα PAHs και τα αλκάνια μπορούν να αποικοδομηθούν κάτω από συνθήκες αναγωγής θειϊκών σε παρόμοιους ρυθμούς με αυτούς υπό αερόβιες συνθήκες ([49], [37]). Η σημασία της αναερόβιας βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο περιβάλλον απαιτεί ακόμα περαιτέρω μελέτη.

1.6.2.4 Θρεπτικά

Θεωρητικά, χρησιμοποιούνται περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε υλικό κυττάρων [48]. Όταν μια μεγάλη πετρελαιοκηλίδα εμφανίζεται στα θαλάσσια περιβάλλοντα η παροχή άνθρακα αυξάνεται εντυπωσιακά και η διαθεσιμότητα σε άζωτο και σε φωσφόρο γίνεται γενικά ο περιοριστικός παράγοντας για την αποικοδόμηση του πετρελαίου ([26], [37]). Στα θαλάσσια περιβάλλοντα, ο θρεπτικός περιορισμός (nutrient limitation) συσχετίζεται γενικά με τα χαμηλά επίπεδα υποβάθρου σε άζωτο και φωσφόρο στο θαλασσινό νερό

[38]. Μια άλλη πιθανή περιοριστική θρεπτική ουσία είναι ο σίδηρος, ο οποίος βρέθηκε να περιορίζει την αποικοδόμηση πετρελαίου στο καθαρό παράκτιο νερό [37].

1.7. Ο Ρόλος των Επιφανειοδραστικών Ενώσεων Βιολογικής Προέλευσης (biosurfactants)

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (surfactants) είναι ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια των διαφόρων συστατικών και είναι ικανές να μειώσουν την επιφάνεια και την επιφανειακή τάση στις διεπιφάνειες των υγρών, στερεών και αερίων, με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να αναμιχθούν ή να διασκορπιστούν εύκολα ως γαλακτώματα στο νερό ή σε άλλα υγρά.

Η τεράστια αγοραστική ζήτηση για επιφανειοδραστικές ενώσεις ικανοποιείται αυτήν την περίοδο από τις πολυάριθμες συνθετικές, κυρίως πετρελαϊκού χαρακτήρα χημικές επιφανειοδραστικές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως τοξικές στο περιβάλλον και μη-βιοδιασπάσιμες. Μπορούν να βιοσυσσωρεύονται και η παραγωγή τους, οι διεργασίες και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα.

Καθώς οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται πιο αυστηροί και η συνειδητοποίηση για την ανάγκη να προστατευθεί το οικοσύστημα αυξάνεται, το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (**biosurfactants**) ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων συνεχώς αυξάνεται.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφυλες ενώσεις (amphiphilic compounds) μικροβιακής προέλευσης με ιδιαίτερη δυνατότητα σε εμπορικές εφαρμογές μέσα στις διάφορες βιομηχανίες [50]. Παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών. Είναι μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις [52], που μπορούν να παραχθούν επικερδώς υπό *ex situ* συνθήκες, η *in situ* παραγωγή τους μπορεί να υποκινηθεί στη περιοχή της ρύπανσης και μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν [52].

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης κατατάσσονται σε πέντε μεγάλες ομάδες:

- (1) γλυκολιπίδια (glycolipids),
- (2) φωσφολιπίδια (phospholipids) και λιπαρά οξέα,
- (3) λιποπεπτίδια/λιποπρωτεΐνες (lipopeptide/lipoproteins),
- (4) πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις (polymeric surfactants) και

Όσο αφορά τη μοριακή τους δομή αποτελούνται:

(α) από ένα υδρόφοβο τμήμα που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα και/ή υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες (fatty alcohols), αντιστοίχως από

(β) ένα υδρόφιλο τμήμα αποτελούμενο από μόνο-, ολίγο- ή πολυσακχαρίτες, πεπτίδια ή πρωτεΐες.

Αποτελέσματα που έχουν προκύψει από την χρήση των επιφανειοδραστικών ενώσεων καταδεικνύουν την ικανότητα τους να απομακρύνουν περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως το πετρέλαιο, από τα φυσικά υποστρώματα.

Όλες αυτές οι μελέτες είναι εργαστηριακές και η επιτυχής βιοεξυγίανση των εκτεθειμένων περιοχών ανοιχτής θαλάσσης που χρησιμοποιούν επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παραμένει μια πρόκληση. Οι βιολογικής προέλευσης ενώσεις χαρακτηρίστηκαν για τη δυνατότητά τους να απομακρύνουν τους υδρογονάνθρακες από το αμμώδες έδαφος και από το λασπώδες έδαφος [53].

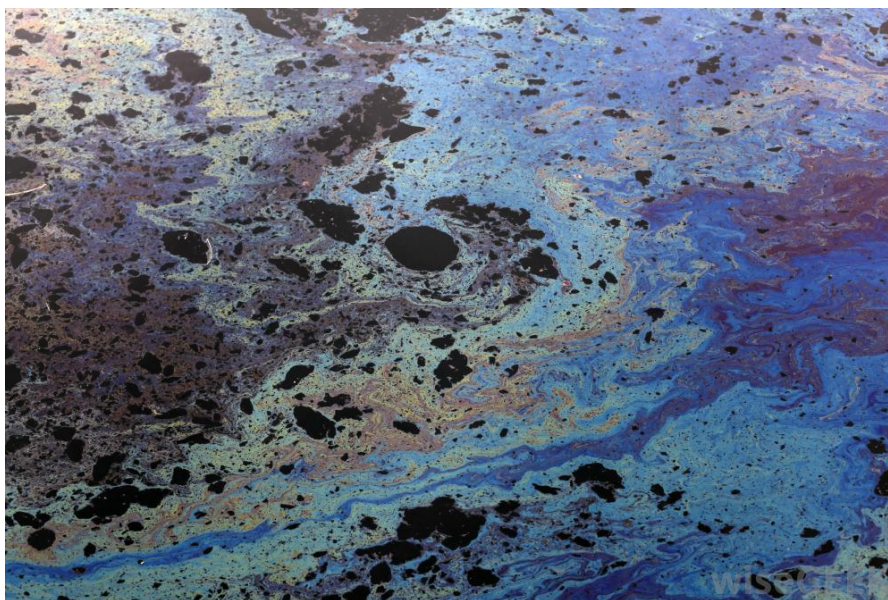
Μια αξιολόγηση της δυνατότητας των υδατικών διαλυμάτων επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (αεσκίνη (aescin), λεκιθίνη, σαπωνίνη και τανίνη) για τις πιθανές εφαρμογές τους στο πλύσιμο του ρυπασμένου εδάφους με αργό πετρέλαιο πραγματοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης ήταν σε θέση να αφαιρέσουν σημαντικό ποσό αργού πετρελαίου από το ρυπασμένο έδαφος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις [51].

Η ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να γαλακτωματοποιούν τα μίγματα υδρογονανθράκων-ύδατος ενισχύει την αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων στο περιβάλλον. Η παρουσία των μικροβιακών

αποδομητών υδρογονανθράκων στο νερό της θάλασσας καταστά τη βιοδιάσπαση μια από τις αποδοτικότερες μεθόδους για την απομάκρυνση ρυπαντών ([54], [37] [55]).

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών με το πετρέλαιο. Ειδικότερα 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»[28].

Από οικολογική άποψη η χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης είναι προφανής. Πράγματι τα αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι είναι ελάχιστα έως καθόλου τοξικοί και εύκολα βιοδιασπάσιμοι. Επίσης οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης έχουν δείξει ότι διαθέτουν παρόμοια ή και ανώτερα φυσικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις συνθετικές επιφανειοδραστικές ενώσεις. 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).



Εικόνα 18 Προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων σε ρυπασμένο νερό με πετρέλαιο

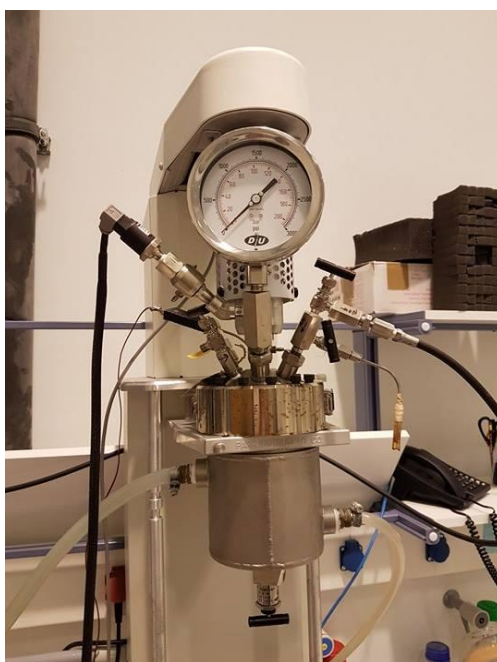
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Πειραματική διάταξη (set up)

Αρχικά, εξετάστηκε σε βάθος περίπου 1km από την επιφάνεια της θάλασσας, σε περίπτωση διαρροής πετρελαίου, πόσο αποτελεσματικά θα αντιδράσουν οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί στην βιοαποδόμηση του. Το πείραμα επιτεύχθηκε με την πειραματική προσομοίωση των συνθηκών με τη χρήση αντιδραστήρα υψηλής πίεσης.

Το βασικό όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος σε συνθήκες υψηλής πίεσης ήταν ο αντιδραστήρας υψηλής πίεσης, τύπου bench top (επί πάγκου), της εταιρείας Parr Instrument Company, μοντέλο 4525, με τις εξής τεχνικές προδιαγραφές:

- Μέγιστη πίεση: 200 bar/ 3000 psi
- Μέγιστη χωρητικότητα αντιδραστήρα: 0.970 L
- Μαγνητικός αναδευτήρας μέγιστων στροφών: 600 rpm
- Θερμοκρασιακό εύρος: -10°C / 350°C
- Έτος κατασκευής: 2015



Εικόνα 19: Ο αντιδραστήρας της Parr Instruments



Εικόνα 20: Η συσκευή ελέγχου του αντιδραστήρα και οι φιάλες με την παροχή αέρα και αζώτου



Εικόνα 21: Ολόκληρη η διάταξη του αντιδραστήρα

Η πίεση μέσα στον αντιδραστήρα αυξήθηκε με την εισαγωγή πεπιεσμένου μίγματος αέρα και πεπιεσμένου αζώτου, σε ίσες ποσότητες αντίστοιχα, διατηρώντας έτσι την πίεση στα 100 bar.

Επίσης, βασικό χαρακτηριστικό του βάθους των 1000m είναι οι 14°C, οπότε για την σταθερή ψύξη του αντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε water bath της εταιρείας Witeg.



Εικόνα 22: Water bath της Witeg

Κατά την πειραματική διαδικασία, οι χημικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα του πετρελαίου συμπεριελάμβαναν εκχύλιση υγρού σε υγρό, SPE εκχύλιση και ανάλυση από GC/MS. Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις καλλιέργειας με επώαση αποικιών σε τρυβλία και εφαρμογή βαφής DNA κυττάρων στους μικροοργανισμούς.

2.2 Εκχύλιση - Liquid to liquid Extraction

Αρχικά για την ανάλυση του δείγματος πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης. Η εκχύλιση γίνεται με διαλύτη DCM (διχλωρομεθάνιο). Ο όγκος του διαλύτη είναι 3 φορές τον όγκο του διαλύματος. Επομένως για 30ml δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 90ml DCM συνολικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητας του DCM, η οργανική φάση είναι βαρύτερη από την υδατική και απομακρύνεται πρώτη από την διαχωριστική χοάνη ($\rho_{DCM} = 1.3266 \frac{g}{m^3} > \rho_{H_2O} = 1.000 \frac{g}{m^3}$).

Υλικά

1. Χοάνη εκχύλισης των 250 mL
2. Μποτίλιες των 250 mL
3. Rotary evaporator
4. Vials των 4 mL

Μέθοδος

- Το διάλυμα μαζί με ίση ποσότητα διαλύτη αναδεύεται πολύ καλά σε χοάνη εκχύλισης.
- Αφήνουμε το διάλυμα να ηρεμήσει και να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (υδατική-οργανική).
- Με αργό ρυθμό αφήνουμε την οργανική φάση να διαπεράσει την χοάνη.
- Η ίδια διαδικασία γίνεται 3 φορές με την ίδια ποσότητα διαλύτη κάθε φορά.
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε το δείγμα στο rotary evaporator ώστε να εξατμιστεί όλο το DCM.
- Ζυγίζουμε τα άδεια vials των 4 mL στα οποία θα μεταφέρουμε το δείγμα.
- Ξεπλένουμε με λίγη ποσότητα DCM για να πάρουμε όλο το δείγμα και το περνάμε στα ζυγισμένα vials.
- Τοποθετούμε τα δείγματα σε θερμαινόμενη βάση, στους 50°C και με τη βοήθεια εμφυσούμενου αέριου αζώτου, εξατμίζεται σταδιακά ο διαλύτης.
- Τέλος, μετά την εξάτμιση, τα μεταφέρουμε στον ξηραντήρα. Την επομένη, ζυγίζουμε τα vials και από τη διαφορά του αρχικά ζυγισμένου απόβαρου βρίσκουμε τη ζητούμενη μάζα του εκχυλίσματος.



Εικόνα 23: Liquid-to-liquid Extraction

2.3 Εκχύλιση Στερεής Φάσης-Solid Phase Extraction (SPE)

Ακολουθεί η εκχύλιση SPE. Η εκχύλιση SPE είναι μια διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος με την οποία οι ενώσεις οι οποίες διαλύονται ή εναιωρούνται σε ένα υγρό μίγμα διαχωρίζονται από άλλες ενώσεις στο μίγμα, σύμφωνα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. Τα συστατικά της κινητής φάσης διαχωρίζονται (mobile phase) από τα συστατικά της στατικής φάσης (stationary phase). Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το εξάνιο C₆, για την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και το διχλωρομεθάνιο DCM, για την απομάκρυνση των αρωματικών υδρογονανθράκων, που περιέχονται στο δείγμα του πετρελαίου.

Υλικά

1. Διάταξη εκχύλισης SPE
2. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 mL
3. Πιπέτες
4. Vials
5. Σύριγγες με διηθητικό φίλτρο

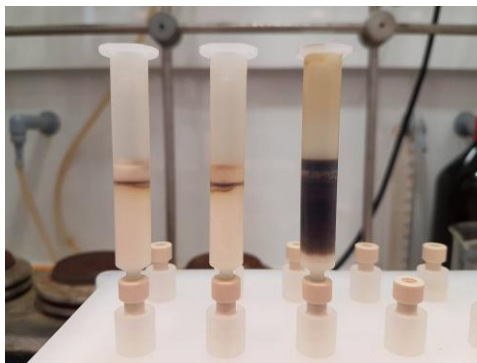
Μέθοδος

- Αρχικά, έγινε ‘pre-conditioning’ των στηλών (σύριγγες) με 2 mL C₆. Έπειτα αφού ανοίχθηκαν οι στήλες, αφέθηκε να περάσει όλος ο διαλύτης για να ξεπλύνει, συλλέγοντας τον παράλληλα με τοποθετημένα vials από κάτω.
- Επίσης, διαλύθηκαν σε 1 mL C₆ τα δείγματα.
- Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν καθαρά vials των 6 mL κάτω από τις μύτες των στηλών, όπου διαπερνάει το δείγμα. Οι ογκομετρικοί κύλινδροι γέμισαν με 4 mL C₆ και αντιστοιχήθηκαν σε κάθε στήλη για να μην χάνεται η σειρά.
- Με διαφορετικές πιπέτες για κάθε δείγμα, γεμίζουμε κάθε στήλη με τα δείγματα.
- Ανοίγουμε τις στήλες και αφήνουμε να περάσει το δείγμα. Μόλις αδειάσει η στήλη, εκλούουμε με όλη την ποσότητα του διαλύτη.
- Όταν γεμίσουν τα vials έχοντας πάρει το κλάσμα των κορεσμένων, τα αλλάζουμε με καθαρά για να πάρουμε στη συνέχεια το κλάσμα των αρωματικών.
- Γεμίζουμε τους ογκομετρικούς κυλίνδρους με 4 mL DCM.

- Ξεπλένουμε με ελάχιστη ποσότητα DCM τα vials με τα δείγματα και γεμίζουμε τις στήλες. Μόλις περάσει όλο το δείγμα από τις στήλες, ξεπλένουμε και πάλι με όλη την ποσότητα του διαλύτη.
- Τοποθετούμε τα vials σε θερμαινόμενη βάση, στους 50° C και με τη βοήθεια εμφυσούμενου αερίου αζώτου, εξατμίζεται σταδιακά ο διαλύτης.
- Την επόμενη, προσθέτουμε στα εξατμισμένα δείγματα τον αντίστοιχο διαλύτη για κάθε κλάσμα και τα μεταφέρουμε σε προ ζυγισμένα vials των 2 mL. Τα αφήνουμε να εξατμιστούν overnight και τα μεταφέρουμε στον ξηραντήρα.
- Μετά την εξατμισμό, ζυγίζουμε τα vials και από τη διαφορά του αρχικά ζυγισμένου απόβαρου βρίσκουμε τη ζητούμενη μάζα του εκχυλίσματος. Τέλος, προσθέτουμε από 1 mL C₆ και DCM στα αντίστοιχα δείγματα (κορεσμένα και αρωματικά) και προχωράμε στην ανάλυση GC/MS των δειγμάτων.



Εικόνα 24: SPE set-u



Εικόνα 25: Οι στήλες SPE

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για την ανάλυση με GCMS

Ο διαχωρισμός, η ανίχνευση, η ταυτοποίηση καθώς και η ποσοτικοποίηση των συστατικών του δείγματος επιτυγχάνεται με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Είναι μια αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας για τον προσδιορισμό διαφορετικών πτητικών ουσιών σε ένα δείγμα ^[25]. Η συσκευή που χρησιμοποιούμε για τις αναλύσεις είναι το μοντέλο 7890A της Agilent Technologies. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για τις αναλύσεις, τέθηκε στη παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (περιγράφεται παρακάτω). Αυτό διότι σκοπός είναι η εύρεση συγκεκριμένων στοιχείων του αργού πετρελαίου.

Αρχή λειτουργίας

Αέριος χρωματογράφος:

Το φέρον αέριο (συνήθως N₂, He, H₂, Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαράσύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου. Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2m για της πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών δεκάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των μm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες. Το δείγμα, συνήθως όγκου 1 μL, εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του

διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Φασματομετρία μάζας:

Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματόμετρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από:

- Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου,
- Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z ,
- Τον ανιχνευτή.

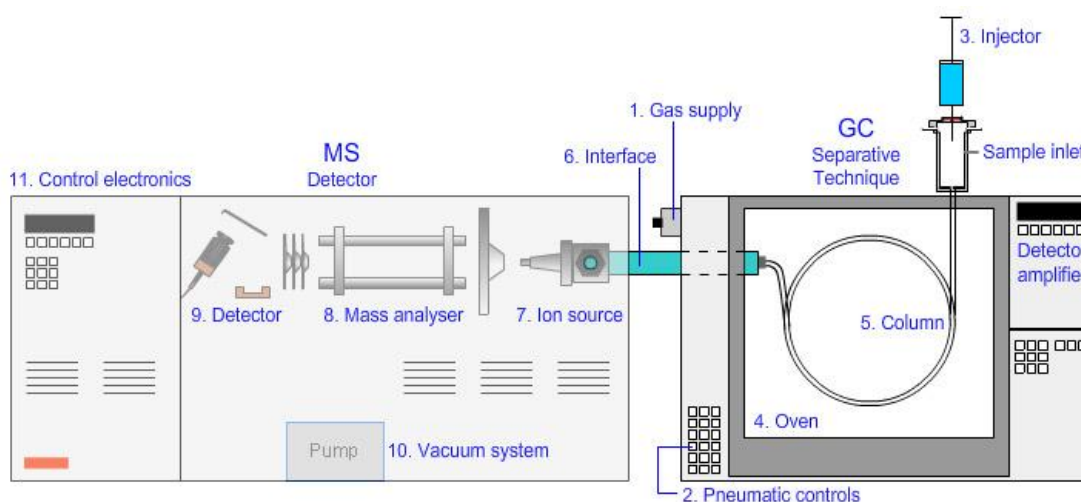
Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές – διαφράγματα μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται.

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης

ενέργειας (συνήθως 70 eV), δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιονική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιονικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι: ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμός με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB). Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι: αναλυτής τομέα, τετραπολικός αναλυτής, παγίδα ιόντων, αναλυτής χρόνου πτήσης.

Στην παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM-selected ion monitoring) ορισμένα θραύσματα ιόντων εισέρχονται στη μέθοδο του οργάνου και μόνο εκείνα τα θραύσματα μάζας ανιχνεύονται από το φασματομέτρο μάζας. Τα πλεονεκτήματα της SIM είναι ότι το όριο ανίχνευσης είναι χαμηλότερο αφού το όργανο αναζητά μόνο σε ένα μικρό αριθμό στοιχείων (π.χ. τρία θραύσματα) κατά τη διάρκεια κάθε σάρωσης. Περισσότερες σαρώσεις μπορούν να λάβουν χώρα κάθε δευτερόλεπτο. Για επιπλέον επιβεβαίωση της πιθανότητας ενός δυνητικού θετικού αποτελέσματος, είναι σημαντικό να είμαστε σίγουροι ότι οι αναλογίες ιόντων των διαφόρων θραυσμάτων μάζας είναι συγκρίσιμες με ένα γνωστό πρότυπο αναφοράς.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού ενός αέριου χρωματογράφου με φασματομετρία μάζας, πηγή: chromacademy.com

Για την ανάλυση αρχικά χρειάζονται τα εξής:

1. Τυφλό δείγμα με εξάνιο C₆.
 2. Internal Standard 200 ppm (εσωτερικό πρότυπο: διάλυμα 4 δευτεριωμένων ενώσεων (d₈-naphthalene, d₁₀-anthracene, d₁₂-chrysene και d₁₂-perylene), όπου η κάθε μία ποσοτικοποιεί διαφορετική ομάδα υδρογονανθράκων)
- Αρχικά, θερμαίνουμε το internal standard σε αμμόλουτρο και στη συνέχεια περνάμε 5 μL σε καθένα από τα δείγματα με την ειδική σύριγγα.
 - Στη συνέχεια, θερμαίνουμε ομοιόμορφα και τα δείγματα σε αμμόλουτρο στους 60 °C για 45 λεπτά.
 - Αφού έχουμε επιλέξει μέθοδο ανάλυσης στο όργανο, τοποθετούμε στις θέσεις 1, A και B το τυφλό δείγμα, το χλωροφόρμιο και το C₆ supra soln αντίστοιχα.
 - Το όργανο, αφού πρώτα ξεπλύνει τη σύριγγα του (πρώτα με χλωροφόρμιο και μετά με εξάνιο), σταματάει και τοποθετούμε τα φιαλίδια με τα δείγματα στις θέσεις που του έχουμε θέσει στην καρτέλα sequence του προγράμματος στον H/Y. Θέτουμε σε λειτουργία το όργανο, με χρονική διάρκεια για την επεξεργασία κάθε δείγματος τα 60 λεπτά.



Εικόνα 27: GC/MS 7890A της Agilent Technologies (αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας)

2.5 Καλλιέργεια μικροοργανισμών

2.5.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων υγρής φάσης

Αραιώσεις υγρής φάσης πραγματοποιήθηκαν στα πειράματα που καλλιεργήθηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα διαλύματα των αραιώσεων στρώθηκαν σε τρυβλία (petri dish), στα οποία πραγματοποιήθηκε επώαση των μικροοργανισμών. Σκοπός ήταν να εξεταστεί η ζωτικότητα και η επιβίωση των μικροοργανισμών μέσα στην καλλιέργεια του πετρελαίου. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στον μικροβιολογικό απαγωγό σε αποστειρωμένες συνθήκες. Πληρούνται οι προϋποθέσεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Υλικά

- Σωλήνες αραιώσης
- Τρυβλία
- Πιπέτες των 10ml, 1ml, 100μl
- Διάλυμα ONR7
- Vortex

Μέθοδος

- Αρχικά, προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα από 9 mL ONR7.
- Στον πρώτο σωλήνα προστέθηκε και 1 mL δείγματος (από την καλλιέργεια του πετρελαίου).
- Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε 1 mL από τον ένα σωλήνα στον άλλον, αφού πρώτα προηγηθεί ανάδευση με vortex, από την 10^{-1} μέχρι την 10^{-10} αραιώση.
- Για τις αραιώσεις 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} στρώθηκαν από 2 τρυβλία (duplicates) προσθέτοντας σε κάθε τρυβλίο από 100μl.
- Τέλος, τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο και αφέθηκαν να αναπτυχθούν.

2.5.2 Εφαρμογή βαφής Acridine Orange σε δείγμα μικροοργανισμών

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στις καλλιέργειες των πειραμάτων σε υψηλή πίεση. Δεν εφαρμόστηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις, καθώς λόγω της εκτόνωσης κατά τη δειγματοληψία, τα κύτταρα των μικροοργανισμών δεν προλαβαίνουν να διαχωριστούν και πολύ πιθανόν να μην επιβιώνουν. Οπότε δεν θα μπορούσαν να σχηματιστούν αποικίες κατά την επώαση σε τρυβλία. Σκοπός της μεθόδου λοιπόν είναι να εντοπιστούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών, είτε αυτά ζουν είτε όχι, ώστε να επιβεβαιωθεί βιωσιμότητά τους μέσα στον αντιδραστήρα.

Υλικά

- Διάλυμα acridine orange 1% w/v (0.1g acridine orange σε 10 mL H₂O)
- Διάλυμα glacial acetic acid + Acridine orange (0.5 mL acridine orange 1 % w/v + 0.5 mL glacial acetic acid 1% v/v σε 50 mL H₂O)
- Διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% v/v
- Διάλυμα 1xPBS (phosphate buffer saline)
- Συσκευή διήθησης κενού με φίλτρα
- Μικροσκόπιο

Μέθοδος

1. Αρχικά, λήφθηκαν τα δείγματα από τον αντιδραστήρα μέσα σε σύριγγες που περιέχουν 10 mL φορμαλδεΰδης.
2. Τα δείγματα φιλτράρονται αρχικά στη συσκευή διήθησης μέσω black polycarbonate μεμβράνης διαμέτρου πόρων 0.2 μ m.
3. Οι φιλτραρισμένες μεμβράνες βάφονται με το διάλυμα glacial acetic acid + acridine orange 1% w/v. Οι μεμβράνες φυλάσσονται για 2 λεπτά στο σκοτάδι.
4. Υπόλειμμα της βαφής ξεπλένεται από το φίλτρο με 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος 1x PBS.
5. Οι μεμβράνες τοποθετούνται προσεκτικά στα γυάλινα slides του μικροσκόπιου και καταγράφονται τα βαμμένα κύτταρα.
6. Τέλος, με την χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής τραβήχτηκαν φωτογραφίες που απεικονίζουν τα βαμμένα κύτταρα των μικροοργανισμών πάνω στις μεμβράνες.

Τα κύτταρα κατά τη δειγματοληψία από τον αντιδραστήρα δεν προλαβαίνουν να διασπαστούν, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ‘κορδέλες’ (ribbons), οι οποίες αποτελούν τα συσσωματώματα των κυττάρων αυτών. Στις απεικονίσεις φαίνονται ξεκάθαρα οι ‘κορδέλες’.

2.6 Bioremediation-Αποδόμηση πετρελαίου τεστ με ταυτόχρονη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών

Χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό επιλεγμένο από την παραλία του Αγίου Ονουφρίου στα Κουνουπιδιανά.

Η μικροβιακή κοινότητα που επιλέχθηκε (consortia), απομονώθηκε πρώτα από μεγάλο βάθος της θάλασσας και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, πράγμα το οποίο την καθιστά ανθεκτική σε διαφορετικές πιέσεις (piezotolerant).

Στο διάλυμα του τεχνητού θαλασσινού νερού, προστέθηκε επίσης διάλυμα αζώτου και φωσφόρου ως θρεπτικά, καθώς και πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, σε αναλογία C:N:P 100:10:1. Η αναλογία του πετρελαίου και του όγκου της υγρής καλλιέργειας ήταν 0,5% w/v. Δηλαδή στα 100 mL υγρού όγκου καλλιέργειας έχουμε 0,5 g crude oil, 0,05 g N και 0,005 g P. Η πυκνότητα του πετρελαίου ήταν 0,8232 g/mL. Να σημειωθεί ότι το πετρέλαιο προέρχεται από την περιοχή του Καζακστάν και χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο στις καλλιέργειες.

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 1.1 bar για 40 λεπτά.

Διάλυμα 1 (σε 1L H ₂ O)	Διάλυμα 2 (σε 500ml H ₂ O)	Διάλυμα 3 (σε 100ml H ₂ O)
NaCl 113,95g	MgCl ₂ x 6H ₂ O 55,9g	FeC ₂ x 4H ₂ O 10mg
Na ₂ SO ₄ 19,9g	CaCl ₂ x 2H ₂ O 7,3g	
KCl 3,6g	SrCl ₂ x 6H ₂ O 120mg	
NaBr 415mg		
NaHCO ₃ 155mg		
H ₃ BO ₃ 135mg		
FeC ₂ x 4H ₂ O 10mg		

NaF 13mg		
NH ₄ Cl 0,35g		
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 445mg		

Πίνακας 3 Παρασκευή διαλύματος ONR7

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

Μετά την ανάμειξη το τελικό διάλυμα ONR7 αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 40 λεπτά.

Παρασκευή διαλύματος N-P 50x (συμπυκνωμένο):

Στην παρασκευή διαλύματος N-P 50xε επιλέχθηκε η συγκέντρωση του αζώτου να είναι 0,05 g/L και η συγκέντρωση του φωσφόρου 0,005 g/L. Επομένως, χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα KNO₃ και K₂HPO₄ με μοριακό βάρος 101,10 g/mol και 174,18 g/mol αντίστοιχα. Με βάση το μοριακό βάρος του αζώτου (14 g) και του φωσφόρου (30,9gr) που περιέχονται στα αντίστοιχα άλατα, προέκυψε ότι χρειάζονται 36,10 g KNO₃ και 2,81 g K₂HPO₄ σε 100 mL απιονισμένου νερού. Για το συμπυκνωμένο διάλυμα 50x αραιώθηκε το παραπάνω διάλυμα (100x) σε επιπλέον 100 mL απιονισμένου νερού (δηλαδή τελικός όγκος διαλύματος 200ml). Το τελικό διάλυμα N-P αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120 °C και πίεση 1.1 bar για 40 λεπτά

Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος marine broth:

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί χρειάστηκε να έχουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Κατασκευάστηκε διάλυμα, στο 15 g agar και 40,25 g Zobell Marine Broth 2216 σε 1 L απιονισμένου νερού. Το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120 °C και πίεση 1.1 bar για 40 λεπτά. Τέλος, το διάλυμα μοιράστηκε ισόποσα σε petri dish, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ψυγείο ώστε να στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό.

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν στην καλλιέργεια, όταν επιστρωθούν σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο, σχηματίζουν ορατές και ξεχωριστές αποικίες. Επιλέχθηκε λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στο δείγμα. Οι αραιώσεις έγιναν σε διάλυμα ONR7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πρωτόκολλο αποτελεσματικότητας τασιενεργών ουσιών

Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα βιολογικών τασιενεργών ουσιών με τη χρήση του πρωτοκόλλου της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής για την καταπολέμηση των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ειδικότερα αξιολογήθηκαν οι βιοτασιενεργές ουσίες ως προς την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν το πετρέλαιο στην υδατική φάση. Αναπτύχθηκε αντίστοιχο πρωτόκολλο για συνθήκες υψηλής πίεσης, στον αντιδραστήρα. Στη συνέχεια η καταλληλότερη βιοτασιενεργή ουσία χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα βιοεξυγίανσης σε συνθήκες υψηλής πίεσης.

3.1 Διαδικασία προσδιορισμού της απόδοσης των βιοτασιενεργών ουσιών με χρήση του πρωτοκόλλου Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA)

3.1.1 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε ατμοσφαιρική πίεση.

Ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας των βιοτασιενεργών ουσιών (biosurfactant) έγινε με βάση το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής για την καταπολέμηση των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, 120 ml συνθετικού θαλασσινού νερού σε κατάλληλη θερμοκρασία, προστίθεται σε ειδική κωνική φιάλη προσομοίωσης του κυματισμού της θάλασσας (baffled flask) 100 ml αργού πετρελαίου διανέμονται απευθείας πάνω στην επιφάνεια του συνθετικού θαλασσινού νερού χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική πιπέτα Eppendorf. Έπειτα 4 ml επιφανειοδραστικής ένωσης διανέμονται στο κέντρο της πετρελαιοκηλίδας, παρέχοντας μια αναλογία μέσου διασποράς και αργού πετρελαίου 25:1.



Εικόνα 28 Baffled Flask

Η φλάσκα τοποθετείται σε τροχιακό αναδευτήρα και αναμειγνύεται για 10 λεπτά με την επιθυμητή ταχύτητα περιστροφής 200 rpm στο τέλος της οποίας αφαιρείται από τον αναδευτήρα και αφήνεται ακίνητη στην επιφάνεια του πάγκου για άλλα 10 λεπτά.

Στο τέλος του χρόνου καθίζησης, τα πρώτα 2 ml του δείγματος απομακρύνονται και λαμβάνονται 30 ml για ανάλυση. Το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη, και εκχυλίζεται τρεις φορές με 5 ml DCM. Το εκχύλισμα στη συνέχεια αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 ml και φωτομετράται στα 340, 370, και 400nm.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για 7 διαφορετικά biosurfactant σε 4 επαναλήψεις:

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν:

1. Oil Begone
2. Marichem (χημικό προϊόν)
3. New cherry
4. BB-1000
5. Experimental Biosurfactant
6. New Surfactant (χημικό προϊόν)
7. Rhamnolipids Actygea (Ραμνολιπίδια)

Οι πίνακες με τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων είναι στο Παράρτημα.

3.1.2 Διαδικασία προσδιορισμού της αποτελεσματικότητας των βιοτασιενεργών ουσιών στον αντιδραστήρα υψηλής πίεσης.

3.1.2.1 Προσαρμογή του πρωτοκόλλου σε υψηλή πίεση

Το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής για την καταπολέμηση των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον τροποποιήθηκε κατάλληλα για χρήση του σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Οι αναλογίες των συστατικών που συνθέτουν το διάλυμα είναι οι εξής:

- ❖ 600 ml διάλυμα ONR7
- ❖ 1.2 ml crude oil (0,2% w/w)
- ❖ 0,048 ml biosurfactant (25:1 πετρέλαιο : βιοεπιφανειοδραστική ουσία)
- ❖ Surfactants: oil begone , marichem , experimental biosurfactant, New cherry , New surfactant , BB-1000, Rhamnolipidis Actygea

Έπειτα, εφόσον τοποθετήθηκαν τα 600 ml διάλυμα ONR7 στον αντιδραστήρα, συλλέχθηκε δείγμα για να το λεγόμενο background και στη συνέχεια τοποθετήθηκε το πετρέλαιο και το biosurfactant. Το κάθε δείγμα λαμβάνεται αφού ο βιοαντιδραστήρας λειτουργήσει στα 100bar και ανάδευση 100 rpm για 10 λεπτά , και στη συνέχεια παραμένει σε ηρεμία χωρίς ανάδευση για άλλα 10 λεπτά. Το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη , και εκχυλίζεται τρεις φορές με 5 ml DCM. Το εκχύλισμα στη συνέχεια αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 ml και φωτομετράται στα 340, 370, και 400nm.

3.1.2.2 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του πετρελαίου στην απόδοση των επιφανειοδραστικών ουσιών σε υψηλή πίεση.

Το συγκεκριμένο πείραμα έλαβε μέρος μες τον βιοαντιδραστήρα με κύριο στόχο την παρακολούθηση της επίδρασης των βιοτασιενεργών ουσιών στη διαλυτοποίηση του πετρελαίου. Πρόκειται για μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου , το οποίο εφαρμόζεται σε υψηλή πίεση , μες τον βιοαντιδραστήρα , με κύρια διαφορά , την αύξηση της συγκέντρωσης του πετρελαίου ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Για κάθε ένα biosurfactant , λάβαμε δείγμα για τιμές συγκεντρώσεων 0,1% , 0,2% , 0,3% ,0,4% v/v αργού πετρελαίου σε συνθετικό θαλασσινό νερό κρατώντας την αναλογία με το surfactant σταθερή. Το κάθε δείγμα λαμβάνεται αφού ο

βιοαντιδραστήρας λειτουργήσει στα 100bar και ανάδευση 100 rpm για 10 λεπτά , και στη συνέχεια παραμείνει σε ηρεμία χωρίς ανάδευση για άλλα 10 λεπτά.

Να σημειωθεί ότι για κάθε διαφορετικό τύπο biosurfactant που βάλαμε, κάθε φορά καθαριζόταν ο αντιδραστήρας και τα συστατικά κάθε φορά ήταν τα ίδια με μόνη διαφορά το biosurfactant.

Στο τέλος του χρόνου καθίζησης, τα πρώτα 2 ml του δείγματος απομακρύνονται και λαμβάνονται 30 ml για ανάλυση. Το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη , και εκχυλίζεται τρεις φορές με 5 ml DCM. Το εκχύλισμα στη συνέχεια αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 ml. Στο μηχάνημα εισάγονται τυφλό δείγμα καθαρού DCM, ακολουθούμενο από τα 4 δείγματα καθενός από τα surfactant. Εισάγονται με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης και οι τιμές της απορρόφησης σημειώνονται για μήκη κύματος 340 , 370 , 400 nm.

3.1.3 Διαδικασία προσδιορισμού καμπύλης βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αργού πετρελαίου στο εκχύλισμα.

Σκοπός της δημιουργίας της καμπύλης βαθμονόμησης , είναι για να υπολογίσουμε την συγκέντρωση του crude oil , μέσα στο θαλασσινό νερό με χρήση φωτομετρίας.

Χρησιμοποιώντας διάλυμα 10v/v% αργό πετρέλαιο σε διχλωρομεθάνιο (DCM) παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα αργού πετρελαίου σε τεχνητό θαλασσινό νερό (Saline water). 1 ml διαλύματος αργού πετρελαίου σε DCM (Δ) (1000 μl), 0,1 ml Δ (100 μl), 0,05 ml Δ (50 μl) , 0,025 ml Δ (25μl) , 0,01 ml Δ (10 μl), 0,005 ml Δ (5μl) σε 30 ml Saline water

Τα διαλύματα εκχυλίστηκαν ως εξής:

- Τοποθετούμε το διάλυμα σε χοάνη εκχύλισης.
- Εκχυλίζουμε χρησιμοποιώντας 5 ml DCM.
- Αναδεύουμε καλά 3 φορές.
- Αφήνουμε το διάλυμα να ηρεμήσει και να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (υδατική-οργανική).
- Με αργό ρυθμό αφήνουμε την οργανική φάση να διαπεράσει την χοάνη.
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές (Συνολικά 3).

- Στη συνέχεια, αραιώνουμε το εκχύλισμα στα 20 ml και μετράμε την απορρόφηση στο φωτόμετρο, στα 340, 370, και 400nm.

3.2 Επίδραση των βιοτασιενεργών ουσιών στην βιοαποδόμηση των

υδρογονανθράκων από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς σε συνθήκες υψηλής πίεσης

Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου σε συνθήκες υψηλής πίεσης από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και πως αυτή επηρεάζεται από τη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών.

Σύνθεση δείγματος crude oil με biosurfactant oil begone

Οι αναλογίες των συστατικών που συνθέτουν το διάλυμα που καλλιεργήθηκε στον αντιδραστήρα υψηλής πίεσης είναι οι εξής:

- 600ml θαλασσινού νερού (Νερό του Αγίου Ονουφρίου) φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο
- 3 ml crude oil (0.5% w/v)
- 1 ml biosurfactant Oil begone
- 12ml N-P
- 5ml consortia

Θέσαμε σε λειτουργία τον αντιδραστήρα, αυξάνοντας την πίεση στα 100bar, παρέχοντας 50bar άζωτο και 50bar μίγμα ατμοσφαιρικού αέρα. Ακόμη, με τη βοήθεια του water bath η θερμοκρασία μειώθηκε στους 14⁰C, η οποία διατηρείται σταθερή. Επίσης, οι στροφές ανάδευσης του δοχείου επιλέχθηκαν στις 60 rpm.

Οι δειγματοληψίες ήταν εβδομαδιαίες, δηλαδή κάθε 7 ημέρες λαμβάναμε 30ml x2 από τον αντιδραστήρα για τις χημικές αναλύσεις (60 ml συνολικά κάθε φορά). Επίσης, λαμβάναμε δείγμα και από την υγρή φάση (μικροοργανισμοί) για να εξεταστεί η πληθυσμιακή τους κατάσταση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Αποτελέσματα

4.1.1 Διαδικασία προσδιορισμού της απόδοσης των βιοτασιενεργών ουσιών με χρήση του πρωτοκόλλου Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA).

4.1.1.1 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε ατμοσφαιρική πίεση.

Με το πέρας των πειραμάτων, στην ατμοσφαιρική πίεση ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων μας στο Spectrophotometer. Για τον υπολογισμό της απόδοσης των επιφανειοδραστικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις όπως αναφέρονται στο πρωτόκολλο της EPA.

$$Area = \frac{(Abs_{340} + Abs_{370}) * 30}{2} + \frac{(Abs_{370} + Abs_{400}) * 30}{2}$$

Αποτελεσματικότητα (%) = Σύνολο πετρελαίου διασκορπισμένα χ 100 / ($\rho_{oil} V_{oil}$)

$$Eff \% = \frac{total\ oil\ dispersed}{\rho_{oil} * V_{oil}} * 100$$

ρ_{oil} = πυκνότητα του ελαίου δοκιμής (g / L)

V_{oil} = όγκος του πετρελαίου προστίθεται στην φιάλη δοκιμής (L)

Σύνολο πετρελαίου διασκορπισμένο = $Mass\ of\ oil * \frac{V_{tw}}{V_{ew}}$ μάζα του πετρελαίου x 120ml / 30mL

V_{tw} = ολικός όγκος νερου 120 ml

V_{ew} = όγκος νερού που λήφθηκε για το διαλυμένο πετρέλαιο 30 ml

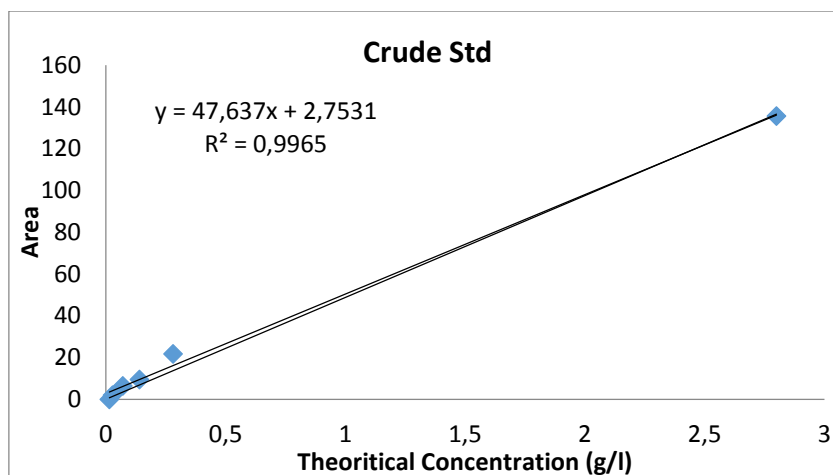
Μάζα του πετρελαίου = συγκέντρωση του πετρελαίου x V_{DCM}

V_{DCM} = τελικός όγκος του DCM εκχύλισμα του δείγματος νερού (0,020 L)

Η συγκέντρωση του πετρελαίου :

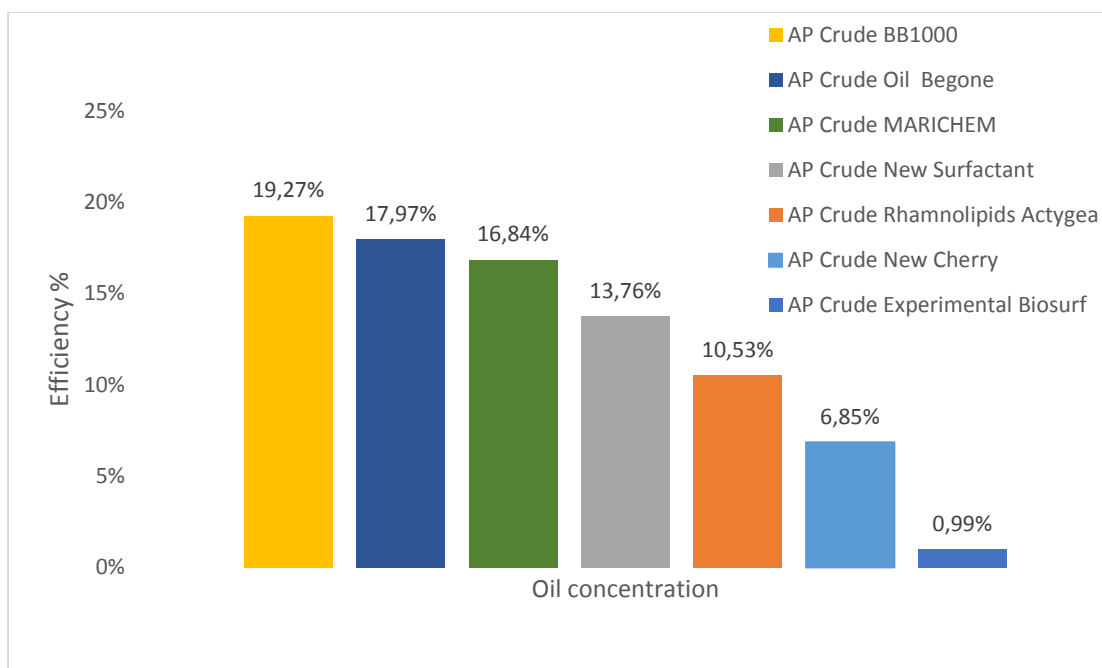
$$Concentration\ of\ oil\ g/l = \frac{Area}{\text{συντελεστή γραμμή καμπύλης βαθμονόμησης}}$$

Για τον υπολογισμό της απόδοσης της κάθε βιοτασιενεργής ουσίας, είναι ο προσδιορισμός της καμπύλης βαθμονόμησης, προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του διαλυτοποιημένου αργού πετρελαίου στο θαλασσινό νερό. Η καμπύλη φαίνεται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1 Καμπύλη βαθμονόμησης αργού πετρελαίου

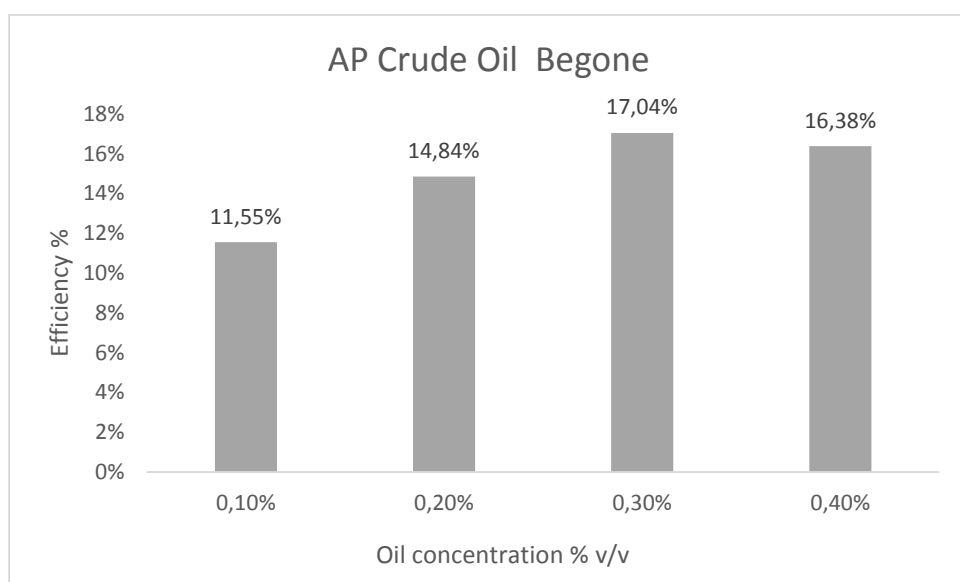
Οι 6 βιοτασιενεργές και μια χημική επιφανειοδραστική ένωση εξετάστηκαν σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Παρατηρείται ότι το BB 1000 , το oil begone ‘έχουν καλή απόδοση της τάξεως του 20% και μάλιστα καλύτερη από το χημικό προϊόν που ήδη υπάρχει στην αγορά, το marichem . Τα άλλα 4 δεν παρουσιάζουν τόσο καλή απόδοση.



Γράφημα 2 Μέση απόδοση αποδόμηση βιοτασιενεργών ουσιών (ατμοσφαιρική πίεση) με βάσει το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής.

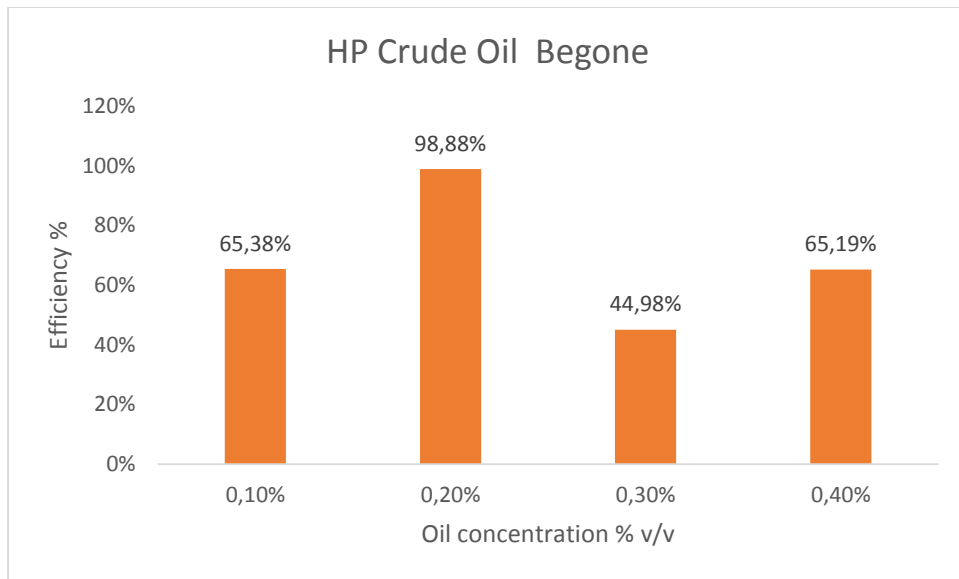
4.1.1.2 Προσαρμογή του πρωτοκόλλου σε υψηλή πίεση-Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του πετρελαίου στην απόδοση των επιφανειοδραστικών ουσιών.

Το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής για την καταπολέμηση των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον τροποποιήθηκε κατάλληλα για χρήση του σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Εξετάστηκαν 3 βιοτασιενεργές ουσίες σε συνθήκες υψηλής πίεσης και μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του αργού πετρελαίου στην απόδοση του surfactant κρατώντας σταθερή την αναλογία των 2. Αρχικά έγινε πείραμα μέσα στον αντιδραστήρα , σε ατμοσφαιρική πίεση για να συγκριθεί με τα αποτελέσματα του πρωτότυπου πρωτοκόλλου. Παρατηρούμε στο Γράφημα 3 ότι η απόδοση του oil begone , σε ατμοσφαιρική πίεση μέσα στον αντιδραστήρα είναι ίδια με αυτή που προέκυψε από το πρωτόκολλο.

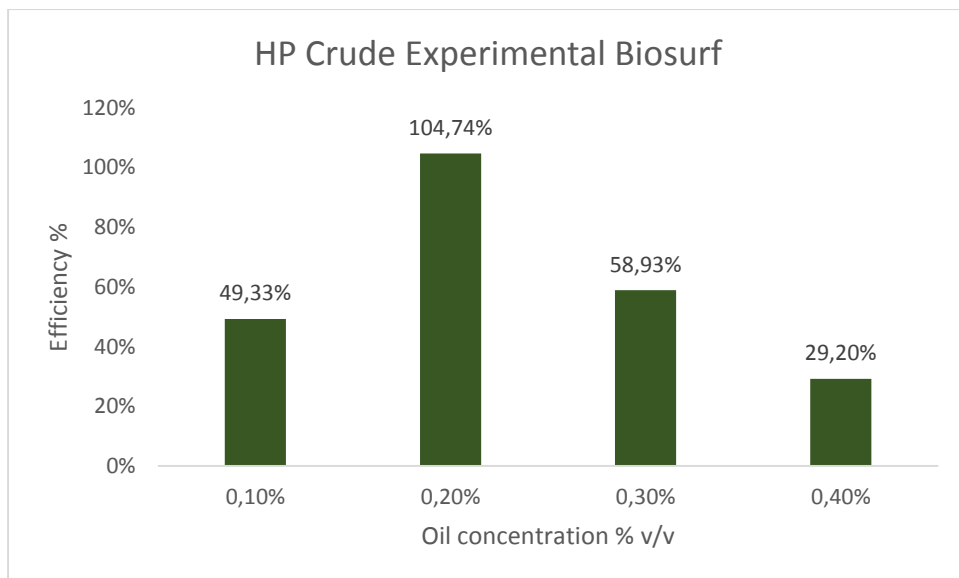


Γράφημα 3 Επίδραση της συγκέντρωσης πετρελαίου στην απόδοση βιοτασιενεργών ουσιών(σε ατμοσφαιρική πίεση)
Oil Begone

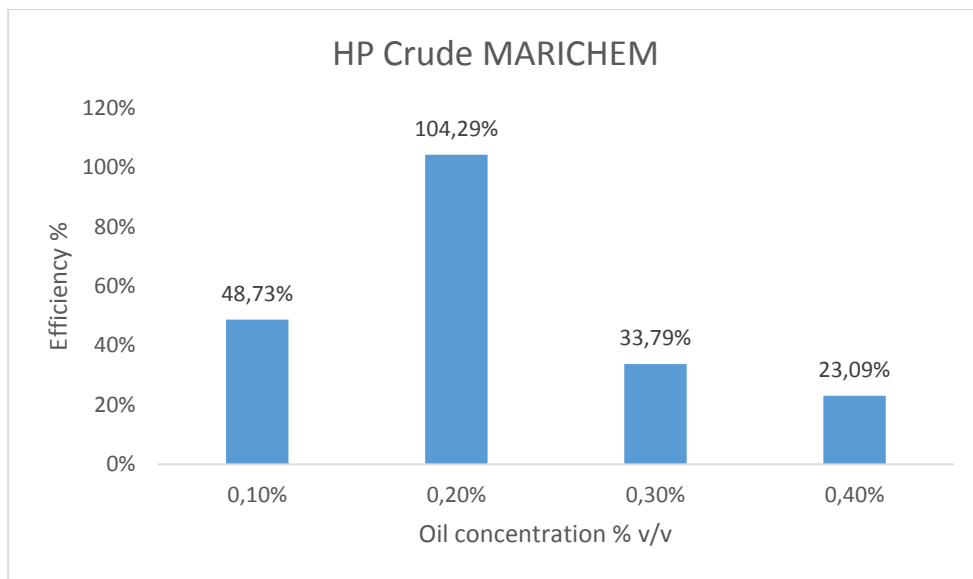
Στη συνέχεια εξετάστηκαν το oil begone , marichem , και το experimental biosurfactant μέσα στον βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες υψηλής πίεσης και η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του πετρελαίου της επιφανειοδραστικής ουσίας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα γραφήματα 4,5,6. Ειδικότερα, στο πρώτο διάγραμμα , παρατηρούμε ότι η απόδοση της ουσίας, αυξάνεται με αύξηση τη συγκέντρωσης του πετρελαίου, στο 0,2% v/v .Έπειτα εμφανίζει μια αισθητή πτώση . Και τα τρία παρουσιάζουν αντίστοιχη απόδοση σε αυτή τη συγκέντρωση το οποίο είναι σημαντικό για την περίπτωση αντικατάστασης των χημικών από βιολογικής προέλευσης επιφανειοδραστικές ουσίες.



Γράφημα 4 Επίδραση της συγκέντρωσης πετρελαίου στην απόδοση βιοτασιενεργών ουσιών(σε υψηλή πίεση) Oil Begone



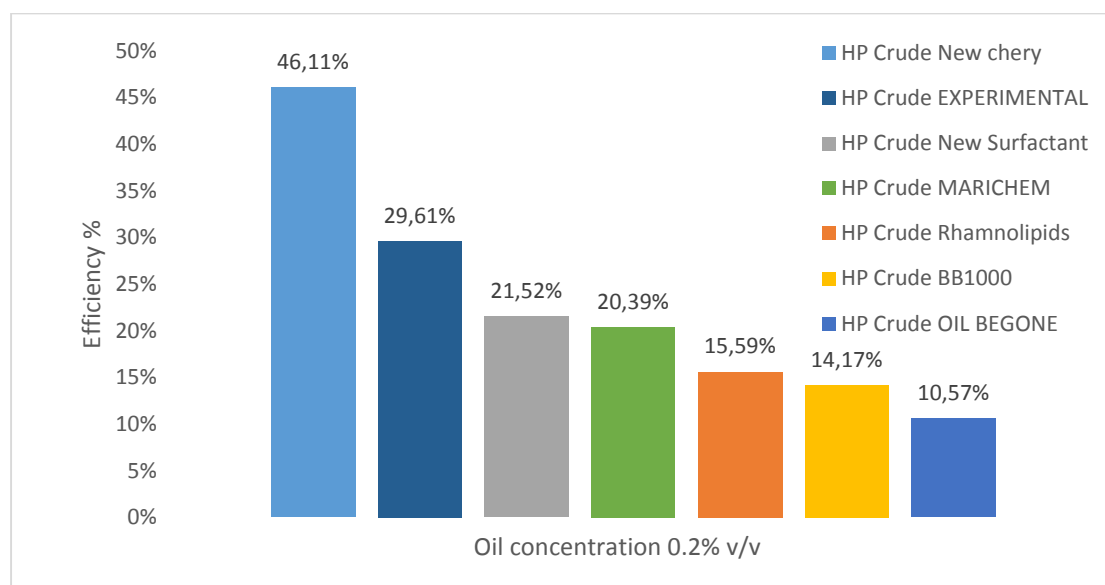
Γράφημα 5 Επίδραση της συγκέντρωσης πετρελαίου στην απόδοση βιοτασιενεργών ουσιών(σε υψηλή πίεση) Experimental



*Γράφημα 6 Επίδραση της συγκέντρωσης πετρελαίου στην απόδοση βιοτασιενεργών ουσιών(σε υψηλή πίεση)
Marichem*

4.1.1.3 Προσαρμογή του πρωτοκόλλου σε υψηλή πίεση-συγκέντρωση αργού πετρελαίου 0,2% v/v.

Με βάσει τα προηγούμενα αποτελέσματα όπου παρατηρήθηκε υψηλότερη απόδοση όταν η συγκέντρωση του πετρελαίου είναι 0,2%, μελετήσαμε όλες τις βιοτασιενεργές ουσίες ,εκ νέου. Η απόδοση του New Cherry , είναι η μεγαλύτερη ακολουθούμενη από το Experimental, αφήνοντας πίσω το New Surfactant, και το εμπορικά ήδη εκμεταλλευόμενο Marichem. Παρατηρείται αυξημένη απόδοση των 2 πρώτων σε σχέση με την απόδοση τους σε ατμοσφαιρική πίεση. Αξίζει να τονισθεί , ότι η απόδοση των λιγότερων αποδοτικών ουσιών σε ατμοσφαιρική αισθητά.



Γράφημα 7 Μέση απόδοση αποδόμηση βιοτασιενεργών ουσιών (υψηλή πίεση)με βάσει το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency (EPA)) της Αμερικής.

4.1.2 Επίδραση των βιοτασιενεργών ουσιών στην βιοαποδόμηση των υδρογονανθράκων από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς σε συνθήκες υψηλής πίεσης

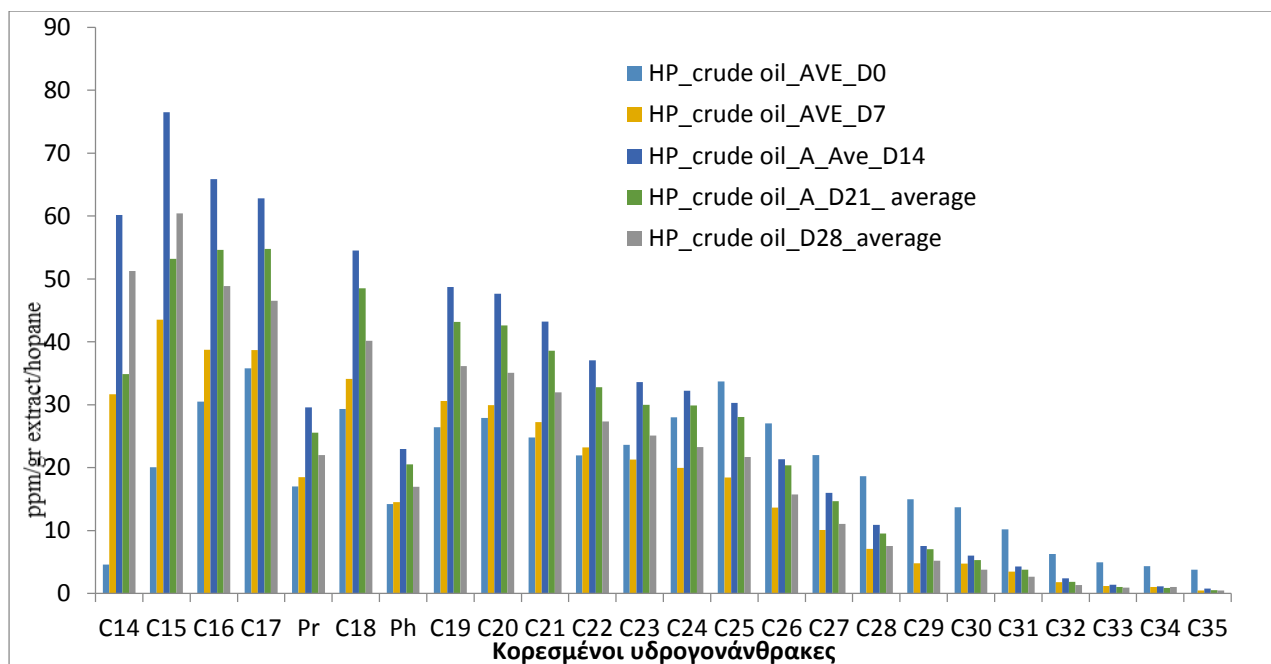
Όσον αφορά το πείραμα της βιοεξυγίανσης με τις επιφανειοδραστικές ουσίες βιολογικής προέλευσης ακολούθησε η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων με το πρόγραμμα του GC/MS Data Analysis και στην εισαγωγή και περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων με το υπολογιστικό πρόγραμμα Excel.

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα από την διόρθωση των χρωματογραφημάτων, (οι συγκεντρώσεις των στοιχείων) εισάγονται στο excel. Έπειτα διαιρούνται οι συγκεντρώσεις αυτές (μονάδες ppm-parts per million) με τις ποσότητες των εκχυλισμάτων από κάθε δείγμα (extracts), ώστε να ανάγουμε τις συγκεντρώσεις αυτές στην ποσότητα του δείγματος που έχουμε, προκύπτει $\frac{ppm}{gr\ extract}$. Οι τιμές αυτές διαιρούνται με τη συγκέντρωση του χοπανίου (17a21b_hopane), η οποία λειτουργεί ως διορθωτικός παράγοντας. Οπότε προκύπτει $\frac{\frac{ppm\ A}{gr\ extract}}{\frac{ppm\ hopane}{gr\ extract}}$, όπου A ένα στοιχείο.

Η ποσοτικοποίηση των διαφορών προκύπτει με γραφήματα με τις διορθωμένες συγκεντρώσεις ως προς το χοπάνιο, για κάθε πείραμα ξεχωριστά. Να σημειωθεί ότι ανά ημέρα έχουν ληφθεί υπόψη οι μέσοι όροι των τιμών των δειγμάτων, διότι σε κάθε δειγματοληψία λαμβάναμε διπλά δείγματα.

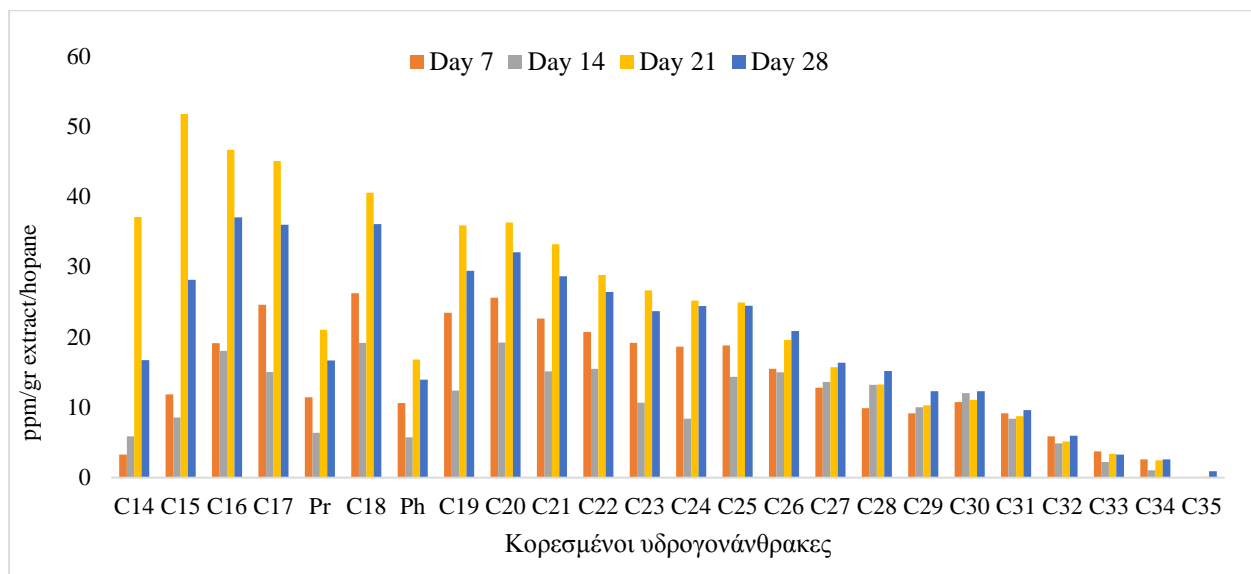
Στο τέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες από την εφαρμογή της βαφής *Acridine Orange* που απεικονίζουν τα βαμμένα κύτταρα των μικροοργανισμών από τα δείγματα του αντιδραστήρα.

Το πείραμα αυτό αφορά την βιοαποδόμηση του πετρελαίου σε συνθήκες υψηλής πίεσης από πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και πως αυτή επηρεάζεται από τη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών. Έγινε μέσα στον αντιδραστήρα με τη χρήση πιεζοφιλικών μικροοργανισμών οι οποίοι ενισχύθηκαν με θρεπτικά συστατικά (άζωτο-φώσφορο) και με βιοτασιενεργή ουσία (oil begone). Παρατηρείται η αύξηση της διαλυτοποίησης από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 14. Έπειτα από την μέρα 14 ακολουθεί μείωση της συγκέντρωσης των διαλυτοποιημένων υδρογονανθράκων μέχρι και την ημέρα 28.(Γράφημα 8)



Γράφημα 8 Συγκέντρωση υδρογονανθράκων σε σχέση με το χρόνο με χρήση βιοτασιενεργής ουσίας(σε υψηλή πίεση)

Τα αποτελέσματα του πειράματος συγκρίθηκαν με τη περίπτωση μη χρήσης βιοτασιενεργής ουσίας τα οποία φαίνονται στο γράφημα.

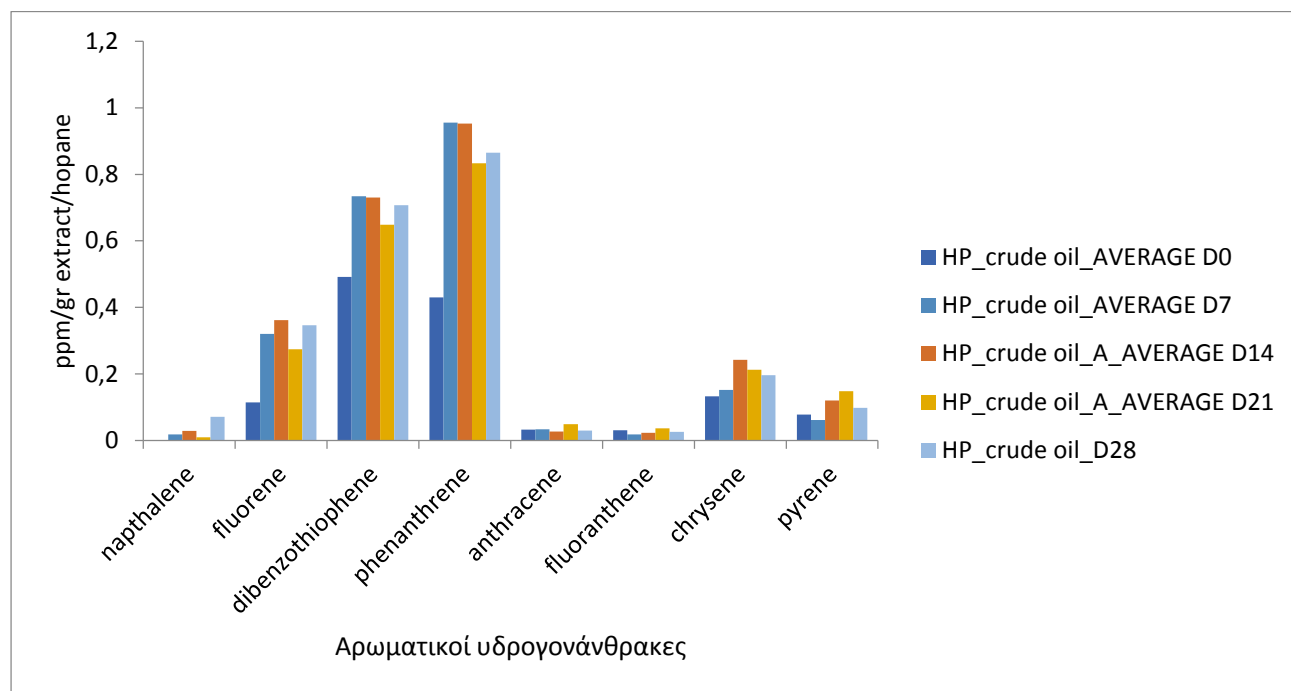


Γράφημα 9 Συγκέντρωση υδρογονανθράκων σε σχέση με το χρόνο (σε υψηλή πίεση)

Παρατηρείται ότι με τη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών η διαλυτοποίηση του πετρελαίου είναι αυξημένη σε σχέση με τη περίπτωση μη χρήσης. Ειδικότερα, η διαλυτοποίηση αυξάνεται μέχρι την ημέρα 14 στη περίπτωση χρήσης biosurfactant σε σχέση με τη μέρα 21 του πειράματος απλής βιοεξυγίανσης. Επίσης σημειώνεται

αποδόμηση των υδρογονανθράκων της τάξης 15-20% η οποία είναι αυξημένη με το 5% του απλού πειράματος.

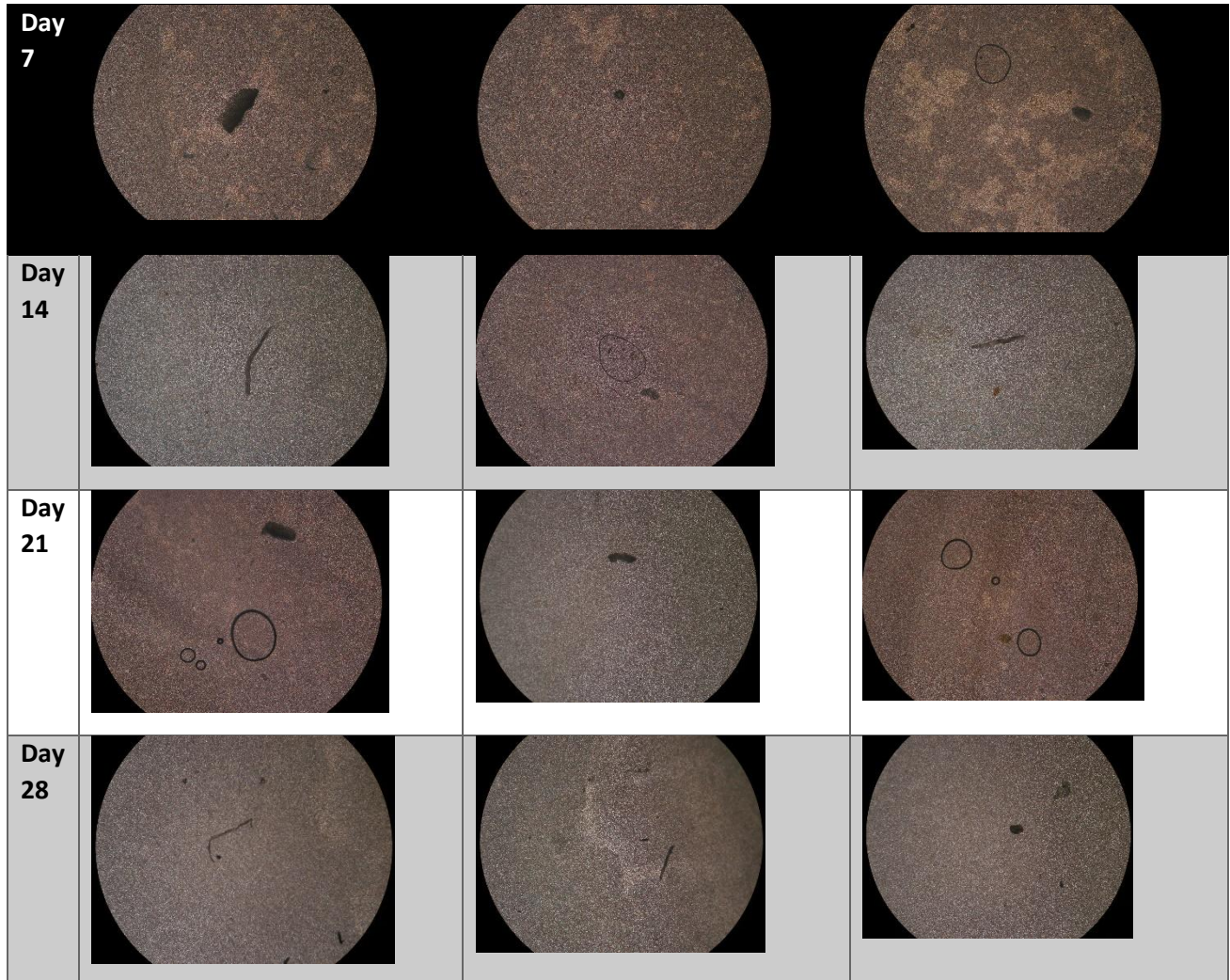
Όσον αφορά τα αρωματικά, δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου αποδόμηση σύμφωνα με το γράφημα 10.



Γράφημα 10 Συγκέντρωση Αρωματικών υδρογονανθράκων σε σχέση με το χρόνο με τη χρήση βιοτασιενεργών ουσιών (σε υψηλή πίεση)

4.2 Ενδεικτικά αποτελέσματα εφαρμογής της βαφής *Acridine orange* στα κύτταρα των μικροοργανισμών

Οι εικόνες που ακολουθούν είναι από το πείραμα υψηλής πίεσης με τη χρήση μικροοργανισμών και βιοτασιενεργής ουσίας:



Σύμφωνα με τις φωτογραφίες , αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού καθώς περνούν οι μέρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες μες τον αντιδραστήρα είναι ευνοϊκές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση και Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, έγινε ο προσδιορισμός της απόδοσης βιοτασιενεργών ουσιών με χρήση του πρωτοκόλλου Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (EPA). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου παρατηρήθηκε, ότι η απόδοση των επιφανειοδραστικών ουσιών κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 %. Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η προσαρμογή του πρωτοκόλλου σε υψηλή πίεση. Η προσαρμογή έγινε με επιτυχία και παρατηρήθηκε ότι η απόδοση των βιοτασιενεργών ουσιών είναι μεγαλύτερη σε υψηλή πίεση από ότι στην ατμοσφαιρική. Η επίδραση της επιφανειοδραστικής ουσίας oil begone στη βιοαποδόμηση αργού πετρελαίου σε συνθήκες υψηλής πίεσης με χρήση πιεζοφιλικών οργανισμών παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα και αύξηση της βιοαποδόμησης σε σχέση με τη περίπτωση μη χρήσης βιοτασιενεργής ουσίας. Να σημειωθεί ότι, το πείραμα είχε αρκετά προβλήματα, τα οποία μπορεί να διαμόρφωσαν μέχρι κάποιο βαθμό τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δεν υπάρχει εικόνα του εσωτερικού δοχείου του αντιδραστήρα. Ιδανικά, εάν το δοχείο ήταν διάφανο θα μπορούσε να παρατηρηθεί και η διαλυτοποίηση του πετρελαίου στην υδατική φάση. Ακόμα, μεγάλο πρόβλημα αποτέλεσαν οι μεταβολές της πίεσης στον αντιδραστήρα κατά τη δειγματοληψία. Οι αυξομειώσεις αυτές, ίσως να προκάλεσαν προβλήματα στους μικροοργανισμούς.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Είναι αναγκαίο να παραθέσουμε μερικές προτάσεις για την περαιτέρω βελτίωση της έρευνας. Αρχικά, στο πείραμα της βιοεξυγίανσης είναι σημαντικό στα πειράματα υψηλής πίεσης να γίνεται προσδιορισμός της ποσότητας των θρεπτικών που έχουν απομείνει στο διάλυμα σε όλη την διάρκεια ενός πειράματος. Αυτό θα μας βοηθήσει, να γνωρίζουμε σε τι στάδιο βρίσκεται η συγκέντρωσή, αν χρειάζεται η προσθήκη επιπλέον θρεπτικών. Χρειάζεται να αυξηθεί η χρονική διάρκεια του πειράματος από 28 ημέρες που προτείνει η EPA ώστε να έχουμε πιο σαφή αποτελέσματα όσον αφορά βιοαποδόμηση. Θα ήταν χρήσιμο να γίνει εφαρμογή του τροποποιημένου πρωτοκόλλου στην περίπτωση αύξησης της συγκέντρωσης του αργού πετρελαίου με μεγαλύτερη λεπτομέρεια και επαναληψιμότητα. Συγκεκριμένα, αποφεύγοντας την αυξομείωση της πίεσης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του πετρελαίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Wikipedia, el.wikipedia.org/wiki/Πετρέλαιο.
- [2] Clark, R. C. and Brown, D. W. (1977). Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems. In Malins (Ed) Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum. Academic Press, Inc., New York, 1-89.
- [3] 25 Jokuty, P., Whiticar, S.P., Wang, Z., Fingas, M., Lambert, P., Fieldhouse, B., and Mullin, J. (2000). A Catalogue of Crude Oil and Oil Product Properties. Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, ON. http://www.etcentre.org/spills/oil_intr.html.
- [4] Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. Microbial Reviews, 53(3), 305-315.
- [5] Δ. Καρώνης, Ε. Λόης, Φ. Ζαννίκος: "Τεχνολογία Πετρελαίου και Φυσικού Αερίου", ΕΜΠ, Αθήνα 2011.
- [6] Χριστίδης, Γιώργος: «Δημιουργία και μετανάστευση του πετρελαίου: Μια πολύπλοκη φυσική διαδικασία», *Περισκόπιο της Επιστήμης*, τεύχος 207 (Ιούνιος 1997), σελ. 20
- [7] Hyne, Norman J.: *Nontechnical Guide to Petroleum Geology, Exploration, Drilling, and Production*, PennWell Corporation 2001, ISBN 0-87814-823-X
- [8] Speight, James G.: *The Chemistry and Technology of Petroleum*, Marcel Dekker 1999, ISBN 0-8247-0217-4.
- [9] Vassiliou, Marius: *Historical Dictionary of the Petroleum Industry*, Scarecrow Press (Rowman & Littlefield) 2009, ISBN 0-8108-5993-9
- [10] National Academy of Sciences (1985). Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects, National Academy Press, Washington DC.]
- [11] Santas R., Korda A., Tenente A., Buchholzi K. and Santas Ph. (1999). Mesocosm Assays of Oil Spill Bioremediation with Oleophilic Fertilizers: Inipol, F1 or Both? Marine Pollution Bulletin, 38 (1), 44-48
- [12] http://5dim-pyrgou.ilei.sch.gr/sea_web/htm/polution2.html
- [13] Spies R.B., Rice S.D., Wolfe D.A. and Wright B.A. (1996). The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment, Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium, American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp1-16
- [14] Α. Τεύχος, "Μοντέλο Τύχης / Γήρανσης Κηλίδων Πετρελαίου," 2008.
- [16] Wikipedia, en.wikipedia.org/wiki/Deepwater_Horizon_oil_spill
- [17] Wikipedia, en.wikipedia.org/wiki/Environmental_impact_of_the_Deepwater_Horizon_oil_spill
- [18] NOAA (1992). Shoreline Countermeasure Manual, National Oceanic & Atmospheric Administration, Seattle, Washington.

- [19] NOAA and API (1994). Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response, National Oceanic & Atmospheric Administration and American Petroleum Institute.
- [20] U.S. EPA (1999a). Understanding oil spills and oil spill response, EPA 540-K99-007, Office of Emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency.
- [21] Doerffer, J.W. (1992). Oil Spill Response in the Marine Environment, Pergamon Press, Oxford, U.K.
- [22] Lessar R.R. and Demarco G. (2000). The significance of oil spill dispersants. Spill Science & Technology Bulletin, 6(1), 59-68.
- [23] Office of Technology Assessment (1990). Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies, OTA-BP-O-63, Washington, DC.
- [24] Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J. and Atlas R.M. (1994). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature, 368, 413-418.
- [25] Prince, R. C., Clark, J.R., Lindstrom, J.E., Butler, E.L., Brown, E.J., Winter, G., Grossman, M.J., Parrish, P.R., Bare, R.E., Braddock, J.F., Steinhauer, W.G., Douglas, G.S., Kennedy, J.M., Barter, P.J., Bragg, J.R., Harner, E.J., and Atlas, R. M. (1994). Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy. In: R.E. Hinchey et al.(Eds.), Hydrocarbon Bioremediation. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp107-124.
- [26] Office of Technology Assessment (1991). Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies, OTA-BP-O-70, Washington, DC.
- [27] Atlas, R. M. (1984). Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York.
- [28] Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. Microbiol. Rev. 45, 180-209.
- [29] Prince, R.C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. Critical Rev. Microbiol. 19, 217-242.
- [30] Swannell, R.P.J., Lee, K., and McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiological Reviews, 60(2), 342-365.
- [31] Lee, K., Lunel, T., Wood, P., Swannell, R., and Stoffyn-Egli, P. (1997a). Shoreline cleanup by acceleration of clay-oil flocculation processes. Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington DC, 235-240.
- [32] Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L, King, D.W., and Holder, E. (1996). Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. Environmental Science and Technology, 30, 1764-1775. [33] Atlas, R. M., and Cerniglia, C. E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants. Bioscience, 45, 332-338.
- [33] Mearns, A. J. (1997). Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. Spill Science & Technology Bulletin, 4(4), 209-217.
- [34] Venosa, A.D. (1998). Oil spill bioremediation on coastal shorelines: a critique. In: S.K. Sikdar & R.I. Irvine(Eds.), Bioremediation: Principles and Practice. Vol. III. Bioremediation Technologies. Technomic, Lancaster, PA, 259-301

- [35] Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3), 305-315.
- [36] Jordan, R.E. and Payne, J.R. (1980). Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, MI.
- [37] Nicodem, D.E., Fernandes, M.C., Guedes, C.L.B., Correa, R.J. (1997). Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. *Biogeochemistry*, 39, 121-138.
- [38] Zobell, C.E. (1973). Microbial degradation of oil: Present statue, problems, and perspectives. In Ahearn and Meyers (Eds.), *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*, Publication No. LSU-SG-73-01, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, 3-16.
- [39] Foght, J.M. and Westlake, D.W.S. (1987). Biodegradation of hydrocarbons in freshwater. In: Vandermeulen and Hruddy (Ed), *Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology*. Pergamon Press, New York, 217-230.
- [40] Floodgate, G (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 355-398.
- [41] Karrick, N.L. (1977). Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. In Malins (Ed) *Effects of Petroleum on Arctic and Subartic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum*. Academic Press, Inc., New York, 225-299.
- [42] Cerniglia, C.E., (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368. [42] Watkinson, R.J., and Morgon, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbondegrading microorganisms, *Biodegradation*, 1, 79-
- [43] Atlas, R.M. and Bartha R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In K.C. Marshall (ed.), *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 12, Plenum Press, NY, 287-338.
- [44] Singer M.E. and Finnerty, W.R. (1984). Microbial metabolism of strat-chain and branched alkanes. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 1-60
- [45] Bossert, I. And Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas (Ed), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 435-476.
- [46] Head, I.M. and Swannell, R.P.J. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 234-239.
- [47] Krumholz, L.R., Caldwell, M.E., Suffita, J.M. (1996). Biodegradation of 'BTEx' hydrocarbons under anaerobic conditions. In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), *Bioremediation: principles and Applications*, Cambridge University Press, UK, 61-99.
- [48] Rosenberg, E. and Ron, E.Z (1996). Bioremediation of petroleum contamination, In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), *Bioremediation: principles and Applications*, Cambridge University Press, UK, 100-124.
- [49]Kingsley Urum, Turgay Pekdemir. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing *Chemosphere* 57, 1139–1150
- [50] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495– 508.

- [51] Moran, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., Sineriz, F. (2000). Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation* 11, 65–71.
- [52] Parra, J., Guinea, J., Manresa, M., Robert, M., Mercade, Comellas, F., Bosch, M., 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *JOACS* 66, 141–145.
- [53] Van Dyke MI, Couture P, Brauer M, Lee H, Trevors JT (1993a). *P. aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants. Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol* 39: 1071-1080
- [54] Gutnick DL, Rosenberg E (1977). Oil tankers and pollution. A microbiological approach. *Annu Rev Microbiol* 31: 379-396
- [55] Atlas RM (1991). Microbial hydrocarbon degradation. Bioremediation of oil spills. *J. Chem Tech Biotechnol* 52: 149-156

Παράρτημα

Πίνακας 3 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Oil Begone (ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	Oil	Begone		
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,034	0,054	0,048	2,85	5,70%
BCKG	0,035	0,055	0,049	2,91	5,82%
BCKG	0,034	0,055	0,048	2,88	5,76%
BCKG	0,035	0,055	0,048	2,90	5,79%
1	0,453	0,279	0,196	15,26	30,50%
2	0,626	0,374	0,259	21,59	21,58%
3	0,359	0,233	0,169	12,03	8,02%
4	0,685	0,403	0,276	23,61	11,80%
			Average	18,12	17,97%

Πίνακας 4 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Cherry (ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	Oil	New Cherry		
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	-0,001	0,009	0,004	0,32	0,63%
BCKG	-0,001	0,008	0,003	0,27	0,54%
BCKG	-0,002	0,006	0,002	0,18	0,36%
BCKG	-0,001	0,006	0,001	0,18	0,36%
1	0,152	0,088	0,054	5,42	10,83%
2	0,246	0,138	0,086	8,85	8,85%
3	0,156	0,088	0,053	5,60	3,73%
4	0,219	0,124	0,078	8,00	4,00%
			Average	6,96	6,85%

Πίνακας 5 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς BB-1000(ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	BB1000			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,034	0,047	0,044	2,58	5,16%
BCKG	0,033	0,048	0,044	2,60	5,19%
BCKG	0,033	0,049	0,045	2,64	5,28%
BCKG	0,033	0,050	0,046	2,69	5,37%
1	0,562	0,343	0,245	19,82	39,62%
2	0,549	0,330	0,234	19,05	19,04%
3	0,428	0,274	0,200	15,00	10,00%
4	0,492	0,300	0,212	16,88	8,43%
			Average	17,69	19,27%

Πίνακας 6 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Marichem (ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	MARICHEM			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,035	0,055	0,049	2,91	5,82%
BCKG	0,034	0,054	0,049	2,87	5,73%
BCKG	0,035	0,056	0,050	2,96	5,91%
BCKG	0,042	0,063	0,057	3,38	6,75%
1	0,405	0,253	0,179	13,44	26,87%
2	0,463	0,284	0,199	15,59	15,58%
3	0,706	0,413	0,284	24,29	16,18%

4	0,528	0,320	0,223	17,49	8,74%
			Average	17,70	16,84%

Πίνακας 7 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς *Experimental biosurfactant*(ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	Experimental Biosurf			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,034	0,050	0,046	2,70	5,40%
BCKG	0,033	0,051	0,046	2,72	5,43%
BCKG	0,033	0,051	0,046	2,72	5,43%
BCKG	0,033	0,051	0,046	2,72	5,43%
1	0,060	0,065	0,055	0,98	1,95%
2	0,057	0,064	0,055	0,89	0,88%
3	0,056	0,064	0,055	0,87	0,58%
4	0,062	0,068	0,057	1,11	0,55%
				0,96	0,99%

Πίνακας 8 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς *New Surfactant*(ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	New Surfactant			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,032	0,053	0,046	2,76	5,52%
BCKG	0,032	0,052	0,047	2,75	5,49%
BCKG	0,032	0,052	0,047	2,75	5,49%
BCKG	0,032	0,052	0,047	2,75	5,49%
1	0,139	0,112	0,880	15,89	31,76%
2	0,116	0,096	0,750	13,13	13,12%
3	0,086	0,080	0,650	10,70	7,13%
4	0,199	0,141	0,105	6,05	3,02%
				11,44	13,76%

Πίνακας 9 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς *Rhamnolipids Actygea*. (ατμοσφαιρική πίεση).

AP	Crude	Rhamnolipids Actygea			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,036	0,053	0,047	2,84	5,67%
BCKG	0,036	0,052	0,047	2,81	5,61%
BCKG	0,037	0,052	0,047	2,82	5,64%
BCKG	0,036	0,053	0,048	2,85	5,70%
1	0,273	0,182	0,135	8,75	17,48%
2	0,349	0,222	0,159	11,48	11,47%
3	0,305	0,197	0,142	9,80	6,53%
4	0,403	0,249	0,176	13,31	6,65%
				10,83	10,53%

Πίνακας 10 Τιμές συγκεντρώσεως αργού πετρελαίου καμπύλη βαθμονόμησης

Crude	Th. Conc g/l	340	370	400
0,55567	0,014	0,010	0,006	-0,021
1,11134	0,028	0,058	0,034	0,004
2,77455	0,07	0,180	0,104	0,043
5,5567	0,14	0,260	0,150	0,074
11,1134	0,28	0,602	0,328	0,189
111,134	2,8	4,000	1,905	1,230
			1,661	1,063

Πίνακας 11 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Oil begone(υψηλή πίεση).

Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,079	0,041	0,028	2,84	28,34%
0,10%	0,256	0,139	0,091	6,54	65,38%
0,20%	0,977	0,484	0,157	28,70	98,88%
0,30%	0,452	0,240	0,157	13,50	44,98%
0,40%	0,793	0,427	0,281	26,09	65,19%
				15,53	0,69

Πίνακας 12 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Experimental (υψηλή πίεση).

HP	Crude	Experimental Biosurf			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,159	0,085	0,056	5,78	57,73%
0,10%	0,296	0,158	0,102	4,94	49,33%
0,20%	0,741	0,393	0,255	20,96	104,74%
0,30%	0,650	0,345	0,224	17,69	58,93%
0,40%	0,484	0,257	0,166	11,69	29,20%
				12,21	0,61

Πίνακας 13 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Marichem (υψηλή πίεση).

HP	Crude	MARICHEM			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,064	0,034	0,022	2,31	23,09%
0,10%	0,198	0,106	0,069	4,88	48,73%
0,20%	0,636	0,342	0,225	20,87	104,29%
0,30%	0,344	0,183	0,120	10,14	33,79%
0,40%	0,312	0,172	0,114	9,24	23,09%
				9,49	0,52

Πίνακας 14 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Cherry(υψηλή πίεση).

HP	Crude	New chery			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	-0,002	0,01	0,003	0,32	3,15%
0,10%					0,00%
0,20%	0,248	0,147	0,094	9,23	46,11%
0,30%				-0,32	-1,05%
0,40%				-0,32	-0,79%
				2,23	0,11

Πίνακας 15 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς Rhamnolipids(υψηλή πίεση).

HP	Crude	Rhamnolipids			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,057	0,043	0,025	2,52	25,19%
0,10%					0,00%
0,20%	0,144	0,089	0,054	3,12	15,59%
0,30%				-2,52	-8,40%
0,40%				-2,52	-6,30%
				0,15	0,00

Πίνακας 16 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς New Surfactant(υψηλή πίεση).

HP	Crude	New Surfactant			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	-0,002	0,01	0,003	0,32	3,15%
0,10%					0,00%
0,20%	0,115	0,074	0,045	4,31	21,52%
0,30%				-0,32	-1,05%
0,40%				-0,32	-0,79%
				1,00	0,05

Πίνακας 17 Πίνακας απορρόφησης με μέσο διασποράς BB-1000(υψηλή πίεση).

HP	Crude	BB1000			
Oil conc	340	370	400	Area	Eff%
BCKG	0,056	0,042	0,024	2,46	24,59%
0,10%					0,00%
0,20%	0,127	0,085	0,056	2,84	14,17%
0,30%				-2,46	-8,20%
0,40%				-2,46	-6,15%
				AVG	0,09
					0,00