



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

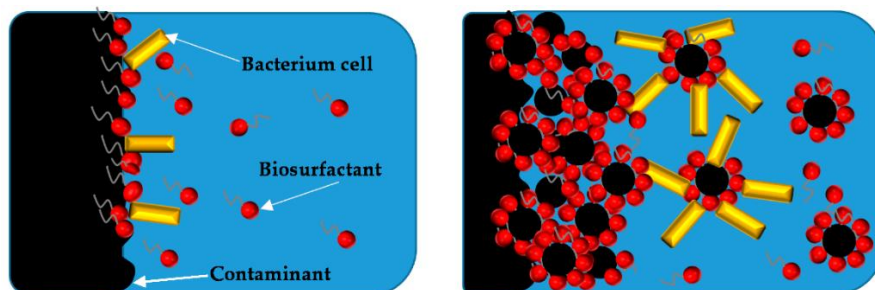
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Π.Μ.Σ. "ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΤΑΣΙΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΒΑΡΕΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΑΡΓΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΓΙΑ
ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΑΡΓΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ**



Εικόνα 1: Δράση βιοτασιενεργών ουσιών στο πετρέλαιο (1)

Αθηνά Μανδαλενάκη

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Δρ. Νικόλαος Πασαδάκης, Καθηγητής Π.Κ.

Δρ. Ελευθερία Αντωνίου, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής

ΧΑΝΙΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κύριο Νικόλαο Καλογεράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο. Επίσης ευχαριστώ θερμά την Δρ. Ελευθερία Αντωνίου για την εμπιστοσύνη, την ουσιαστική καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης των πειραμάτων και συγγραφής της παρούσας εργασίας. Να ευχαριστήσω ακόμα των κύριο Πασαδάκη για την παραχώρηση του εργαστηρίου του ώστε να διεκπεραιωθούν κάποια πειράματα και για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή. Τέλος, να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για το πνεύμα συνεργασίας που διατηρούν εντός του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοτασιενεργές ουσίες (Biosurfactants, BS) είναι αμφίφυλες βιολογικές ενώσεις που παράγονται εξωκυτταρικά ή ως τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης, από ποικιλία ζυμών, βακτηρίων και μυκήτων και χρησιμοποιούνται σε γκάμα εφαρμογών, μία εκ των οποίων είναι η βιοεξυγίανση. Κατά την βιοεξυγίανση θαλάσσιας ρύπανση από πετρελαιοειδή, οι BS χρησιμοποιούνται ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου και έτσι να αυξηθεί ο ρυθμός αποικοδόμησής του από τους γηγενείς μικροοργανισμούς.

Η επίδραση της πηγής άνθρακα στην ποιότητα και ποσότητα των BS μιας καλλιέργειας είναι πολύ μεγάλη. Η πηγή άνθρακα συχνά διαλυτοποιείται στην καλλιέργεια και το βιοτασιενεργό προϊόν έχει προσμίξεις από αυτήν. Το γεγονός αυτό δυσκολεύει την διαδικασία απομόνωσης των BS και αυξάνει το κόστος παραγωγής. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου ως πηγή άνθρακα στις καλλιέργειες. Στόχος ήταν οι BS να απομονώνονται με απλή εκχύλιση, δίχως προσμίξεις της πηγής άνθρακα.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα ήταν το βακτήριο *Alcanivorax borkumensis* SK2 το οποίο είχε απομονωθεί σε προγενέστερη έρευνα του εργαστηρίου, από το θαλάσσιο περιβάλλον της Ελευσίνας. Πρόκειται για ένα βακτήριο γνωστό για την παραγωγή γλυκολιπιδίων και ενεργό στην βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων. Βακτήριο το οποίο συναντάται σε θαλάσσιες περιοχές ρυπασμένες με πετρελαιοειδή.

Για την παραγωγή BS χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας της Bioengineering ώστε οι συνθήκες να είναι ελεγχόμενες και σταθερές, και ούτως ώστε το πείραμα να διεξαχθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα. Η μέγιστη συγκέντρωση BS στην καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα ήταν της τάξεως των 20 mg/L. Πρόκειται για μία μικρή συγκέντρωση σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, όμως προτέρημα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ήταν η μη ύπαρξη προσμίξεων από την πηγή άνθρακα στο τελικό προϊόν.

Για τον χαρακτηρισμό των BS που παράχθηκαν εργαστηριακά, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και το δείγμα μας συγκρίθηκε με πρότυπο δείγμα

ραμνολιπιδίων (R-95 RL95% της Aldrich Chemistry). Από το πείραμα αυτό διαπιστώθηκε ότι το δείγμα μας περιείχε μόνο- και δι- ραμνολιπίδια καθώς και δύο ακόμη μη ταυτοποιημένα λιπίδια.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε πείραμα για την εκτίμηση της διασποράς του πετρελαίου στην υδάτινη φάση με χρήση BS. Σε αυτό το πείραμα εφαρμόστηκε το Baffled Flask Test (BFT) του πρωτοκόλλου της EPA. Συγκρίθηκε η διασπορά του πετρελαίου με και χωρίς την χρήση BS. Ως διαλύτης για τις BS χρησιμοποιήθηκε σογιέλαιο και οι διάφορες συγκεντρώσεις BS που εξετάστηκαν ήταν 0%, 5%, 7,5% και 15% w/v. Η ποσοστιαία αύξηση της διασποράς του πετρελαίου σε κάθε περίπτωση ήταν 0%, 25,85%, 74,85% και 77,76% αντίστοιχα.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν BS ως βελτιωτικός παράγοντας για την βιοαποικοδόμηση αργού πετρελαίου. Ως διαλύτες για τις BS χρησιμοποιήθηκαν απιονισμένο νερό και σογιέλαιο. Η εκτίμηση της ποσότητας των πετρελαιοειδών που είχε αποικοδομηθεί έπειτα από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, έγινε με χρήση GC-MS. Ενδεικτικά, ο μέσος όρος μείωσης της μάζας των κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες, με διαλύτη το νερό (~ 2 mg δραστική ουσία / 10 ml seawater) και το σογιέλαιο (~ 5 mg δραστική ουσία / 10 ml seawater) ήταν 52,18% και 29,45% αντίστοιχα.

ABSTRACT

Biosurfactants (BS) are amphiphilic biological molecules produced extracellularly or as a part of the cell membrane, from a variety of yeasts, bacteria and fungi. They are used in a range of applications one of which is bioremediation. During bioremediation of crude oil in sea, BS increase the bioavailability of the pollutant and thus, the rate of degradation by the native microorganisms.

Biosurfactant production is highly dependent on the carbon source used in the culture. Most commonly, the carbon source is soluble and the biosurfactant product has substrate impurities. This fact makes the production of purified BS more difficult and expensive. During this experiment, heavy oil fractions (HOF) were used as carbon source. The aim of this investigation was to extract purified BS with a simple solvent extraction from the culture.

The microorganism used was *Alcanivorax borkumensis* SK2. This bacterium was isolated from Elefsina bay during previous investigation of our lab. This microorganism is known for its glycolipid production and its oil degradation ability. Furthermore, it is commonly found in oil polluted marine environments.

For the biosurfactant production, a Bioengineering bioreactor was used, as to have stable and controlled conditions in the culture but also a bigger scale. The maximum BS production in the bioreactor was 20 mg/L. According to other investigations and the bibliography, this concentration is quite low, but the main asset of the methodology used, is the fact that purified BS were isolated by a simple solvent extraction.

Thin layer chromatography was carried out to compare the BS produced in the lab with a pure rhamnolipid sample (R-95 RL95% της Aldrich Chemistry). The BS produced by *A. borkumensis* SK2 contains mono- and di- rhamnolipids, and two other non-detected biosurfactants.

Furthermore, the baffled flask test (BFT) protocol (according to the EPA) was implemented as to detect the dispersion of crude oil in water, by using BS. BS were previously diluted in soybean

oil and the different BS concentrations tested were 0%, 5%, 7,5% and 15% w/v. The percent increase of oil dispersion in each case was 0%, 25.85%, 74.85% and 77.76% respectively.

Last but not least, a bioremediation test was carried out as to test the effect of BS in the biodegradation of crude oil. BS were diluted in water and crude oil. GC-MS was used as to estimate the degradation of crude oil after specific time frames. Indicatively, the average mass reduction of saturated hydrocarbons, after 28 days of experiment, was 52,18% for BS diluted in water (2 mg active agent / 10 ml seawater) and 29,45% for BS diluted in soybean oil (5 mg active agent / 10 ml seawater).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT.....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Βιοτασιενεργές ουσίες BS.....	11
1.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα BS.....	13
1.2 Πετρέλαιο.....	14
1.3 Ρύπανση θαλάσσιου περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή.....	15
1.3.1 Φυσικές πηγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	15
1.3.2 Ανθρωπογενείς πηγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	16
1.3.2.1 Πορεία και γήρανση πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	18
1.3.2.2 Εξάπλωση πετρελαίου σε ακτές.....	21
1.3.2.3 Αντιμετώπιση θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή - Βιοεξυγίανση.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Υλικά Πειράματος.....	23
2.1.1 Βακτήριο <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2.....	23
2.1.2 Βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου HOF-1 και HOF-2.....	24
2.1.3 Τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7.....	25
2.1.4 Διάλυμα θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου (NP).....	26

2.1.5 Βιοαντιδραστήρας Bioengineering	27
2.2 Μέθοδοι Πειράματος	27
2.2.1 Μέθοδος οπτικής απορρόφησης	27
2.2.2 Καλλιεργητική μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων	27
2.2.3 Παραγωγή BS με HOF-1,-2.....	28
2.2.4 Απομόνωση BS με εκχύλιση	29
2.2.5 Ανάπτυξη βακτηρίου <i>A. borkumensis</i> SK2 σε ONR7 με HOF-2	30
2.2.6 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	30
2.2.7 Προετοιμασία και λειτουργία βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή BS	32
2.2.8 Εξέταση απόδοσης διασποράς πετρελαίου με χρήση BS (Baffled Flask Test, BFT).....	34
2.2.9 Εξέταση βελτίωσης βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου με χρήση BS.....	35
2.2.10 Εκχύλιση στέρεης φάσης (SPE).....	38
2.2.11 Αέρια χρωματογραφία και φασματοφωτομετρία μάζας (GS-MC)	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
3.1 Παραγωγή BS από το βακτήριο <i>A. borkumensis</i> SK2.....	40
3.2 Καμπύλη ανάπτυξης <i>A. borkumensis</i> SK2 σε ONR7 με HOF-2.....	42
3.3 Ανάλυση BS με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	43
3.4 Λειτουργία βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή BS.....	44
3.5 Προσδιορισμός βελτίωσης της διασποράς πετρελαίου με χρήση BS	45
3.6 Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας BS στην βιοαποικοδόμηση αργού πετρελαίου – Βιοεξυγίανση	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμένου αργού πετρελαίου σε saline water	35
Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση BS συναρτήσει χρόνου σε καλλιέργεια με HOF-1	41
Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση BS συναρτήσει χρόνου σε καλλιέργεια με HOF-2	41
Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση <i>A. borkumensis</i> SK2 σε ONR7 με HOF-2 ως προς τον χρόνο, συναρτήσει OD	42
Διάγραμμα 5: Σύγκριση συντελεστών RF του στάνταρ δείγματος Ραμνολιπιδίων και των BS του <i>A. borkumensis</i> SK2.....	43
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση BS στον αντιδραστήρα συναρτήσει χρόνου	45
Διάγραμμα 7: BFT με BS από τον <i>A. borkumensis</i> SK2 διαλυμένες σε σογιέλαιο	46
Διάγραμμα 8: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH ₂ O	47
Διάγραμμα 9: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH ₂ O	48
Διάγραμμα 10: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH ₂ O	48
Διάγραμμα 11: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH ₂ O	49
Διάγραμμα 12: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο	49
Διάγραμμα 13: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο	50

Διάγραμμα 14: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο	50
Διάγραμμα 15: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο	51
Διάγραμμα 16: Ποσοστιαία μείωση κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με BS διαλυμένες σε dH ₂ O και σογιέλαιο	51

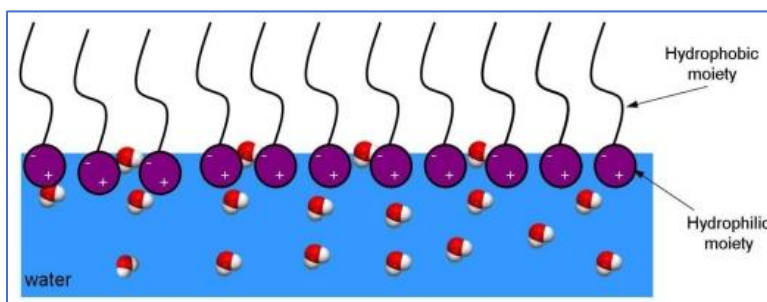
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δράση βιοτασιενεργών ουσιών στο πετρέλαιο	0
Εικόνα 2: Κατανομή BS μεταξύ διεπιφάνειας αέρα/νερού	11
Εικόνα 3: Σχέσεις συγκέντρωσης BS, σχηματισμού μικκυλίων και επιφανειακής τάσης.....	12
Εικόνα 4: Κλασματική απόσταξη αργού πετρελαίου	15
Εικόνα 5: Πορεία πετρελαίου φυσικής προέλευσης στο θαλάσσιο περιβάλλον (Illustration by Jack Cook, Woods Hole Oceanographic Institution).....	16
Εικόνα 6: Ποσοστιαία προέλευση θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή (Illustration by Jack Cook, Woods Hole Oceanographic Institution)	17
Εικόνα 7: Ποσότητες κηλίδων πετρελαίου σε τόνους, ανά έτος, 1970- 2016	17
Εικόνα 8: Διεργασίες γήρανσης πετρελαιοκηλίδας	18
Εικόνα 9: Πορεία πετρελαιοκηλίδας σε νερό.....	21
Εικόνα 10: Φυλογενετικό δέντρο της μικροβιακής κοινότητας που εμπεριέχει το βακτήριο A. borkumensis SK2.....	24
Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοτασιενεργές ουσίες BS

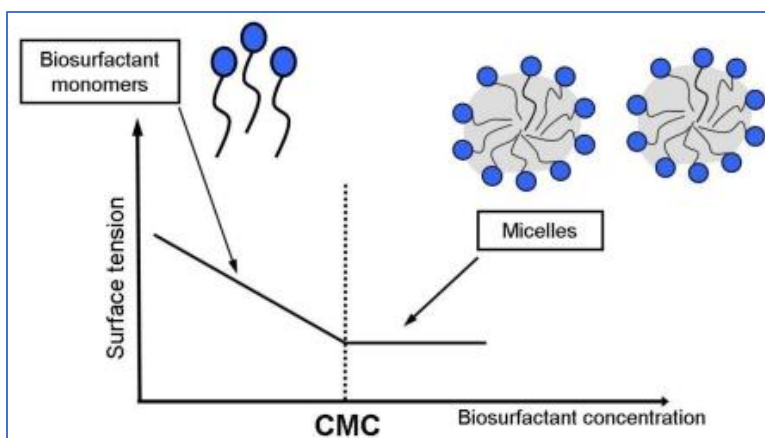
Οι βιοτασιενεργές ουσίες (Biosurfactants, BS) είναι αμφίφυλες βιολογικές ενώσεις που παράγονται εξωκυτταρικά ή ως τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης, από ποικιλία ζυμών, βακτηρίων και μυκήτων (1; 2). Όλες οι τασιενεργές ουσίες αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Η υδρόφιλη κεφαλή τους μπορεί να αποτελείται από υδατάνθρακες, αμινοξέα, κυκλικά πεπτίδια, φωσφορικό οξύ, καρβοξυλικό οξύ ή αλκοόλη. Η υδρόφοβη άκρη αποτελείται συνήθως από μία μακριά αλυσίδα λιπαρών οξέων. Οι BS κατηγοριοποιούνται με δύο τρόπους, είτε βάσει του φορτίου τους, είτε βάσει του μοριακού τους βάρους. Όσον αφορά στο φορτίο, υπάρχουν τρεις κατηγορίες BS. Οι ανιονικές έχουν αρνητικό φορτίο λόγω κάποιας σουλφονικής ή θειικής ομάδας, οι κατιονικές έχουν θετικό φορτίο λόγω μιας ομάδας τεταρτοταγούς αμμωνίου και οι ουδέτερες έχουν ανιονικά και κατιονικά τμήματα μέσα στο ίδιο μόριο. Όσον αφορά στο μοριακό βάρος, οι BS χωρίζονται σε χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους. Παραδείγματα BS χαμηλού μοριακού βάρους είναι τα Ραμνολιπίδια και τα σοφρολιπίδια (3).



Εικόνα 2: Κατανομή BS μεταξύ διεπιφάνειας αέρα/νερού (4)

Οι τασιενεργές ουσίες σχηματίζουν μικκύλια μόλις υπερβούν την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) και έχουν την ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση υδατικών

(νερό/αέρας) και υδρογονανθρακικών διαλυμάτων (έλαιο/νερό ή έλαιο/στερεό) (3), αυξάνοντας έτσι την βιοδιαθεσιμότητα οργανικών ρύπων σε νερό και έδαφος (5; 6). Τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 3. Επιπλέον, οι τασιενεργές ουσίες έχουν υψηλή διαλυτότητα και δρουν ως απορρυπαντικά προκαλώντας αφρίσμα (6; 7).



Εικόνα 3: Σχέσεις συγκέντρωσης BS, σχηματισμού μικκυλίων και επιφανειακής τάσης (4)

Η παραγωγή BS επηρεάζεται άμεσα από τις φυσικοχημικές συνθήκες της μικροβιακής καλλιέργειας (pH, αλατότητα, πίεση, διαλυμένο οξυγόνο, θερμοκρασία) και από την πηγή άνθρακα που έχει επιλεγεί. Πηγές άνθρακα αποτελούν συχνά διάφορα σάκχαρα, έλαια κ.ά. με συνηθέστερη την χρήση υδρογονανθράκων και φυτικών ελαίων. Η επίδραση της πηγής άνθρακα στην ποιότητα και ποσότητα των BS της καλλιέργειας είναι πολύ μεγάλη. Το πετρέλαιο Diesel και το αργό πετρέλαιο είναι από τις αποδοτικές πηγές άνθρακα γι' αυτόν τον σκοπό (3).

Οι ιδιότητες των τασιενεργών ουσιών βιολογικής προέλευσης επιτρέπουν την χρήση τους (και ίσως την αντικατάσταση των χημικά παραγόμενων τασιενεργών ουσιών) σε μία μεγάλη γκάμα δραστηριοτήτων όπως είναι η ιατρική, η παραγωγή προϊόντων προσωπικής φροντίδας, η παραγωγή απορρυπαντικών, η βιομηχανία τροφίμων και η βιοαποκατάσταση του περιβάλλοντος (3; 5). Η χρήση BS για την αποκατάσταση πετρελαιοκηλίδων σε θαλάσσια περιβάλλοντα αποτελεί μία 'πράσινη' και φιλική προς το περιβάλλον αντιμετώπιση της

ρύπανσης και μπορεί να εφαρμόζεται μετά τις μηχανικές τεχνικές αποκατάστασης όπως είναι τα πλωτά φράγματα, οι ελαιοσυλλέκτες κ.ά.. Το πετρέλαιο είναι βιοαποικοδομήσιμο από τους μικροοργανισμούς του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αποτελώντας πηγή άνθρακα και τροφή γι' αυτούς. Με την προσθήκη βιοτασιενεργών ουσιών σε ρυπασμένες περιοχές, αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων και συνεπώς ο ρυθμός αποικοδόμησής τους (5).

1.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα BS

Οι συμβατικές – χημικές τασιενεργές ουσίες έχουν πλήθος μειονεκτημάτων και έτσι επιδιώκεται η αντικατάστασή τους με BS. Τα κύρια μειονεκτήματά τους είναι η υψηλή τοξικότητα, η μη δυνατότητα βιοαποικοδόμησής και η πιθανότητα βιοσυσσώρευσής (3). Οι BS θεωρούνται ανώτερες ποιοτικά και περιβαλλοντικά από τις χημικά κατασκευασμένες τασιενεργές ουσίες. Τα πλεονεκτήματα των BS είναι τα ακόλουθα:

- Βιοαποικοδομήσιμότητα: Οι BS αποικοδομούνται εύκολα από βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς, δίχως να επιβαρύνουν το περιβάλλον (3) (6).
- Χαμηλή τοξικότητα: Σε γενικές γραμμές οι BS έχουν πολύ χαμηλότερη τοξικότητα από τις συμβατικές τασιενεργές ουσίες (3), (5).
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς κίνδυνο σε καλλυντικά, φαρμακευτικά είδη και σε τρόφιμα (3).
- Οι BS μπορούν να παραχθούν με χρήση οικονομικών και διαθέσιμων σε αφθονία πόρων, αλλά και με χρήση παραπροϊόντων βιομηχανίας ή αποβλήτων (3).
- Οι BS είναι αποτελεσματικές στην βιοαποκατάσταση πετρελαιοκηλίδων, ρυπασμένων εδαφών και βιομηχανικών εκροών (3).
- Οι BS είναι ανθεκτικές και λειτουργούν σε υψηλές θερμοκρασίες και σε ακραίες συνθήκες pH και αλατότητας (6).

Παρά την ευρεία γκάμα πλεονεκτημάτων των BS υπάρχουν και τα ακόλουθα μειονεκτήματα:

- Η παραγωγή BS σε μεγάλη κλίμακα μπορεί αν είναι ασύμφορη οικονομικά εκτός κι αν χρησιμοποιούνται παραπροϊόντα ή απόβλητα άλλων εφαρμογών.

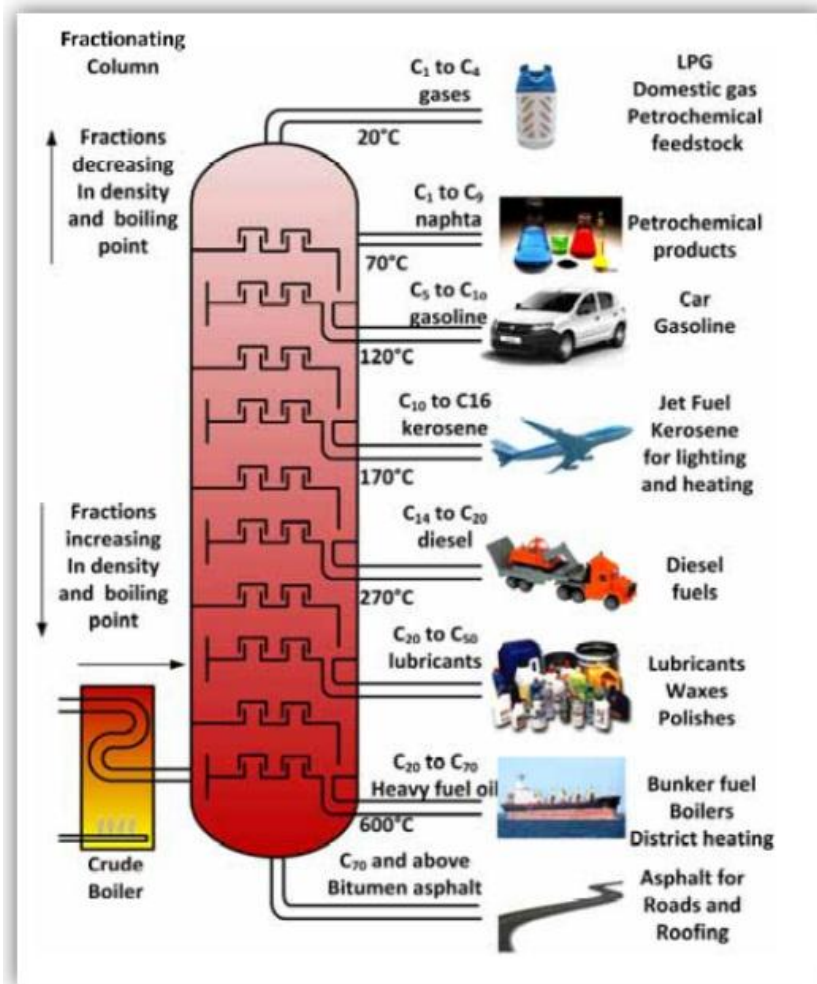
- Η απόδοση των συστημάτων παραγωγής BS είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη από τα συμβατικά συστήματα.
- Υπάρχει δυσκολία στην ανάκτηση των BS με υψηλό ποσοστό καθαρότητας και απαιτούνται συχνά πολλά βήματα και περίπλοκη επεξεργασία (3), (5).

1.2 Πετρέλαιο

Το αργό πετρέλαιο, όπως πηγάζει από την Γη, αποτελεί ένα σκούρο καφέ προς μαύρο παχύρρευστο υγρό. Η χημική του σύσταση αποτελείται από μόρια υδρογονανθράκων. Αναφορές για την χρήση πετρελαίου έχουν γίνει πολύ νωρίτερα από την βιομηχανική επανάσταση. Σύμφωνα με τον Marius S. Vassiliou, στα αρχεία του κράτους της Σουμερίας, υπάρχουν αναφορές σε εμπόριο πετρελαίου από το 1875 π.Χ. Επίσης, το 450 π.Χ. ο Ηρόδοτος αναφέρεται στην παραγωγή πετρελαίου από πηγές στην Περσία (8).

Σήμερα, το πετρέλαιο διυλίζεται σε περεταίρω κλάσματα και εν συνεχεία χρησιμοποιείται σε αμέτρητες εφαρμογές. Δυσκολίες κατά την επεξεργασία του αργού πετρελαίου σχετίζονται με την περιεκτικότητά του σε μέταλλα όπως το βανάδιο, το νικέλιο και τον σίδηρο. Τα μέταλλα αυτά δρουν δηλητηριάζοντας τους καταλύτες στα στάδια επεξεργασίας και διύλισης του αργού πετρελαίου. Επιπλέον, η παρουσία θειούχων και αζωτούχων ενώσεων μπορεί να δημιουργήσει αέριους ρύπους, διοξείδιο και τριοξείδιο του θείου και οξείδια του αζώτου, κατά την καύση του καυσίμου (9).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, κατά την κλασματική απόσταξη του πετρελαίου, το αρχικό παχύρρευστο υγρό διαχωρίζεται, ανάλογα με το σημείο ζέσεως, σε επιμέρους κλάσματα. Το αργό πετρέλαιο αποτελείται από ένα πλήθος ενώσεων που κυμαίνονται από αέρια έως και πιο βαριά κλάσματα που αποτελούνται κυρίως από ασφαλτένια (10). Το κλάσμα με το υψηλότερο σημείο ζέσεως και την υψηλότερη πυκνότητα, αποτελείται από μεγαλύτερου μήκους αλυσίδες υδρογονανθράκων, και στο εξής θα αναφέρεται ως βαρύ κλάσματα αργού πετρελαίου (Heavy Oil Fraction, HOF). Πρόκειται για μία στερεή φάση υδρογονανθράκων με δυσκολίες στην διαχείρισή. Το περιεχόμενο των HOF αποτελείται κυρίως από ασφαλτένια.



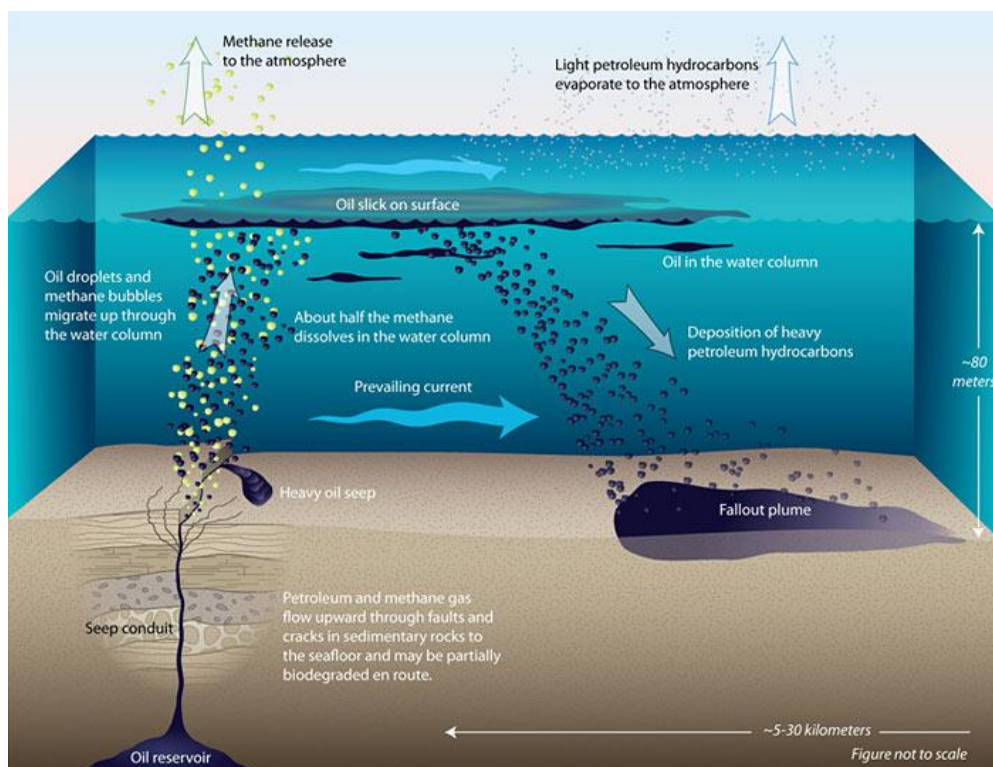
Εικόνα 4: Κλασματική απόσταξη αργού πετρελαίου (11)

1.3 Ρύπανση θαλάσσιου περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή

1.3.1 Φυσικές πηγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον

Το πετρέλαιο που καταλήγει ετησίως στο θαλάσσιο περιβάλλον προέρχεται σχεδόν κατά το ήμισυ από φυσικές πηγές. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, το πετρέλαιο διαρρέει μέσω ρωγμών στον πυθμένα της θάλασσας και τα ελαφριά τμήματά του ανεβαίνουν στην επιφάνεια, εξατμίζονται και παρασύρονται από το ρεύμα, ενώ τα βαριά κλάσματα καταβυθίζονται και συσσωρεύονται στον πυθμένα των ωκεανών (12). Οι φυσικές πηγές πετρελαίου δεν αποτελούν απειλή για το θαλάσσιο περιβάλλον, καθώς τα οικοσυστήματα γύρω από αυτές

είναι προσαρμοσμένα στις συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η εκροή πετρελαίου από το υπέδαφος γίνεται με αργό και σχετικά σταθερό ρυθμό επομένως κάποια ζώα και μικρόβια έχουν εξελιχθεί για να ευδοκιμήσουν με την παρουσία του (13).

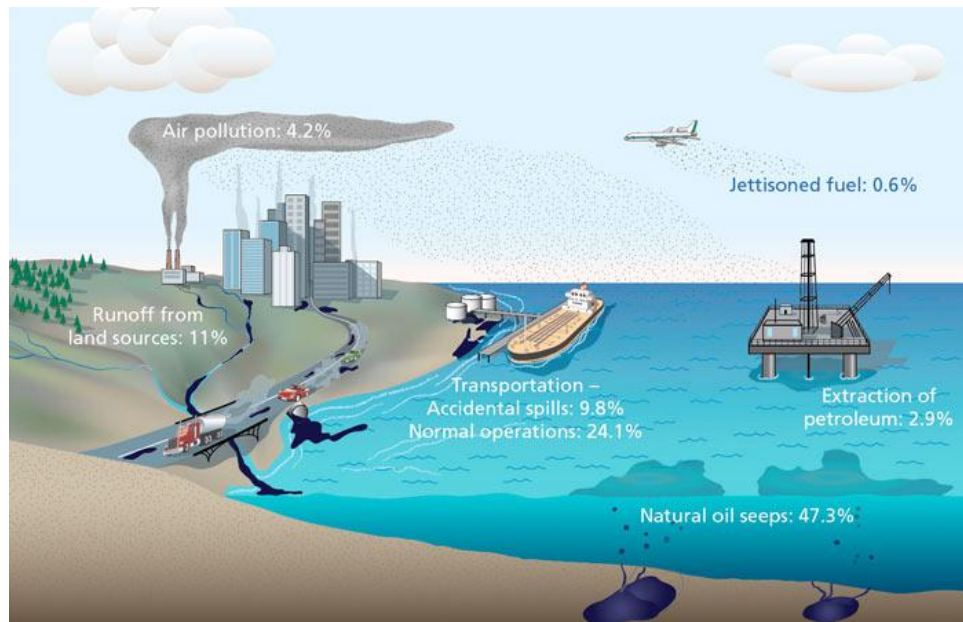


Εικόνα 5: Πορεία πετρελαίου φυσικής προέλευσης στο θαλάσσιο περιβάλλον (Illustration by Jack Cook, Woods Hole Oceanographic Institution) (12).

1.3.2 Ανθρωπογενείς πηγές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον

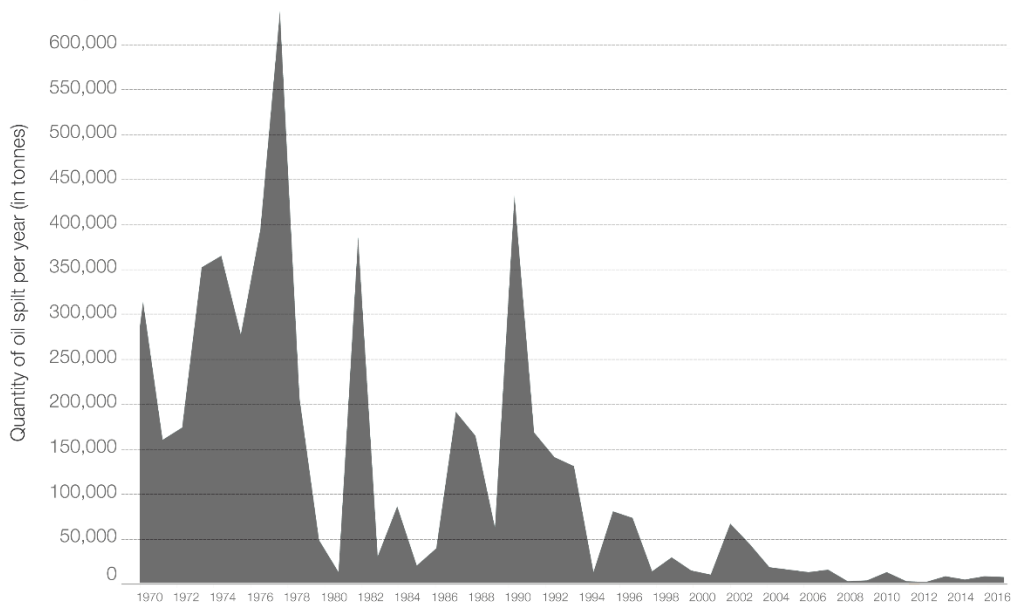
Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες συμβάλλουν στην εκροή μεγάλων ποσοτήτων πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον, και συχνά η εκροή είναι τοπική και απότομη (Εικόνα 6). Οι κυριότερες δραστηριότητες που συμβάλλουν σε αυτού του είδους ρύπανσης είναι οι διαρροές κατά την εξόρυξη και την μεταφορά του πετρελαίου (13), και κατά τις παράνομες εργασίες καθαρισμού δεξαμενών στη θάλασσα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, τα θαλάσσια ατυχήματα σε πλοία και τάνκερ που μεταφέρουν πετρελαιοειδή έχουν περιοριστεί πάρα πολύ από το

1970, λόγω της αυστηρής νομοθεσίας που έχει εφαρμοστεί (π.χ. διπλά τοιχώματα στις δεξαμενές).



Εικόνα 6: Ποσοστιαία προέλευση θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή (Illustration by Jack Cook, Woods Hole Oceanographic Institution) (13).

Quantity of oil spilled from tankers worldwide, 1970–2016

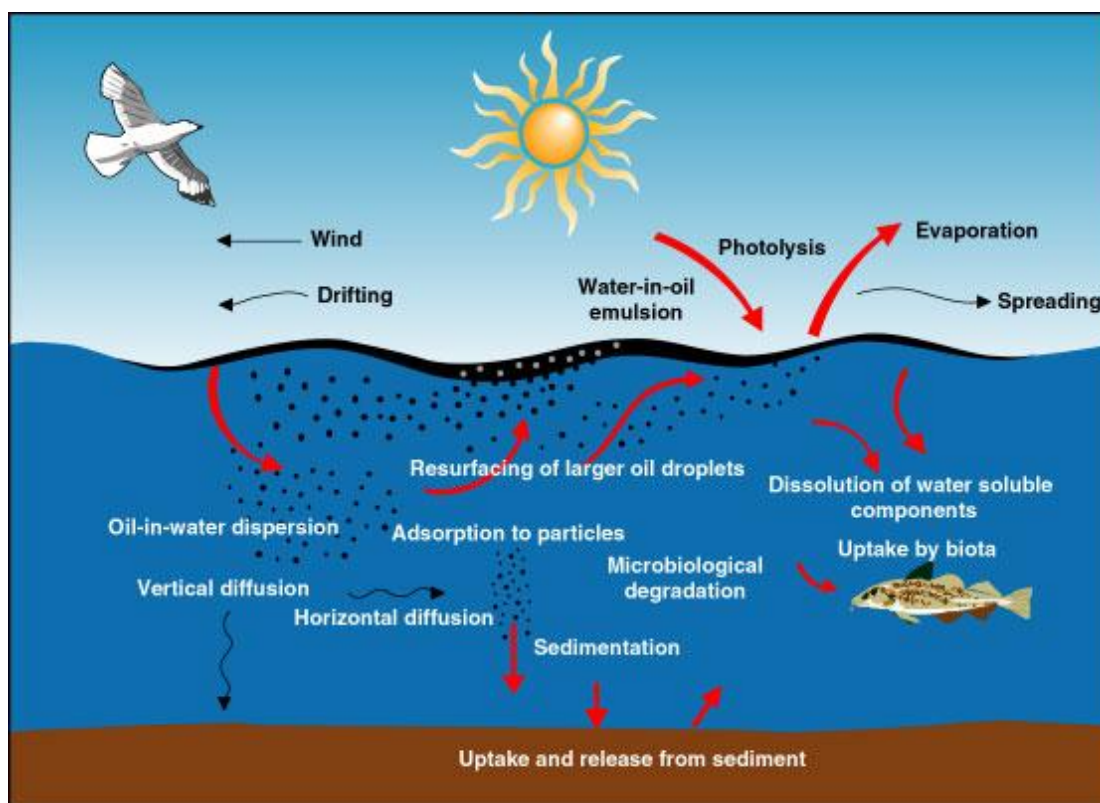


Data source: International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF) for the number of oil spills, United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD) for trade data. The interactive data visualization is available at [OurWorldinData.org](https://ourworldindata.org). There you find the raw data and more visualizations on this topic. Licensed under CC-BY-SA by the author Max Roser.

Εικόνα 7: Ποσότητες κηλίδων πετρελαίου σε τόνους, ανά έτος, 1970- 2016 (14)

1.3.2.1 Πορεία και γήρανση πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον

Ύστερα από την διαρροή του στην θάλασσα, το πετρέλαιο υπόκειται σε διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές, ανάλογα με τη φύση του και τις ωκεανολογικές συνθήκες. Αυτές οι μεταβολές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την επιλογή των τεχνικών καταπολέμησης πετρελαίου, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 8: Διεργασίες γήρανσης πετρελαιοκηλίδας (15)

Οι φυσικοχημικές μεταβολές των πετρελαιοειδών φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 8 και έχουν ως εξής:

Εξάπλωση (spreading): Το πετρέλαιο έχει την τάση να διασκορπίζεται οριζόντια πάνω στην επιφάνεια της θάλασσας, κάτω από την δράση της βαρύτητας, του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης. Τα περισσότερα είδη αργού πετρελαίου εξαπλώνονται σε στρώμα

πάχους περίπου 0,3 mm εντός 12 ωρών. Όταν δεν υπάρχουν άλλες επιδράσεις, η εξάπλωση συνεχίζεται μέχρις ότου σχηματιστεί ένα στρώμα πετρελαίου πάχους 0,5 μm (16).

Εξάτμιση (evaporation): Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα σε λίγες ώρες από την διαρροή και τα πλέον πτητικά κλάσματα μιας πετρελαιοκηλίδας χάνονται στην ατμόσφαιρα με ρυθμό που αυξάνεται με την αύξηση της ταχύτητας του ανέμου, του κυματισμού της θάλασσας και της θερμοκρασίας. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται επίσης από τον τύπο του πετρελαίου. Το πετρέλαιο που παραμένει στην θάλασσα έχει μεγαλύτερη πυκνότητα και ιξώδες από το αρχικό. Στις περισσότερες κηλίδες αργού πετρελαίου χάνεται μέχρι και το 40% του όγκου τους στις πρώτες 48 ώρες, ενώ το βαρύ πετρέλαιο που περιέχει λίγες πτητικές ενώσεις θα παρουσιάσει λίγη εξάτμιση ακόμη και μετά από αρκετές ημέρες. Τα ελαφριά προϊόντα διύλισης, όπως βενζίνη, κηροζίνη και πετρέλαιο ντίζελ εξατμίζονται σχεδόν στο σύνολό τους σε διάστημα μερικών ωρών, δημιουργώντας κίνδυνο πυρκαγιάς σε κλειστές περιοχές, όπως λιμάνια (16).

Διάλυση (dissolution): Οι απώλειες από διάλυση είναι σχετικά μικρές, αφού οι περισσότεροι υδρογονάνθρακες από τους οποίους αποτελείται το πετρέλαιο έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό της θάλασσας. Στην πραγματικότητα, όσο αλμυρότερη είναι η θάλασσα, τόσο ασθενέστερη είναι η διάλυση (16).

Βιοαποικοδόμηση (biodegradation): Η βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου από μικροοργανισμούς που ζουν στην θάλασσα, συμβάλει στη μετατροπή του σε οξειδωμένα προϊόντα. Ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, τις θρεπτικές ουσίες, το διαλυμένο οξυγόνο και τον τύπο του πετρελαίου. Επειδή τα βακτήρια είναι ενεργά στη διαχωριστική επιφάνεια πετρελαίου/νερού, ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξάνεται όταν σχηματίζονται λεπτές μεμβράνες ή σταγονίδια διασκορπισμένου πετρελαίου με μεγάλη επιφάνεια, όταν δηλαδή αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου (16).

Φωτο-οξείδωση (oxidation): Η φωτο-οξείδωση μπορεί να έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες. Παρουσία οξυγόνου, το φυσικό φως του ηλίου έχει ικανή ενέργεια για να μετασχηματίσει πολλές σύνθετες πετρελαϊκές ενώσεις, όπως είναι οι αρωματικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους και οι πολικές ενώσεις, σε απλούστερες ενώσεις μέσω μιας σειράς

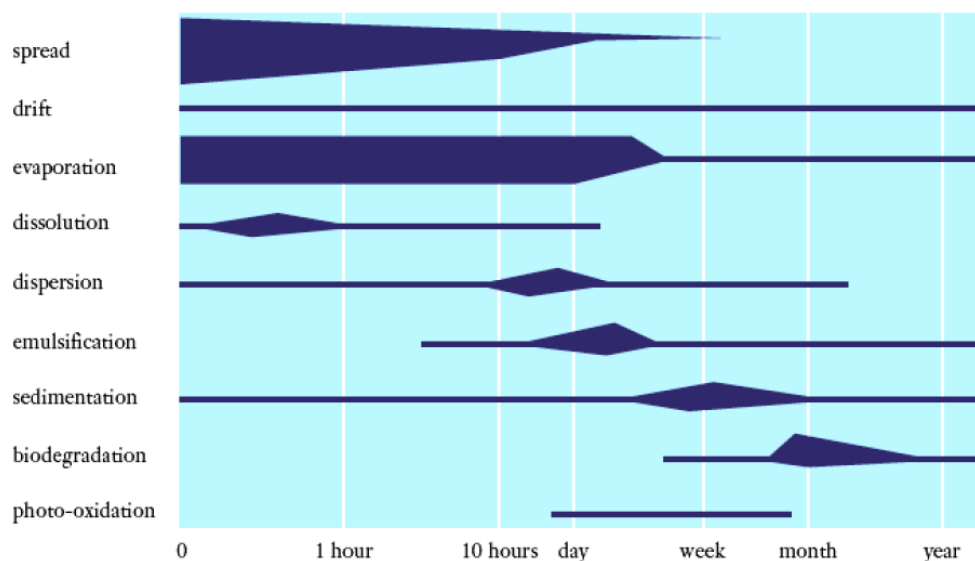
αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Αυτή η διεργασία μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό, λόγω του σχηματισμού πολικών ενώσεων (υδροπεροξειδία, αλδεΐδες, κετόνες, φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα). Οι πολικές ενώσεις που προκύπτουν αποτελούν τοξικά προϊόντα φωτο-οξειδωση (17). Από την άλλη, η αυξημένη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό σημαίνει αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του ρύπου.

Γαλακτωματοποίηση (emulsification): Υπάρχουν δύο ειδών γαλακτωματοποιήσεις.

1. **Πετρέλαιο σε νερό:** Αν η ροή στην επιφάνεια του νερού είναι τυρβώδης, το πετρέλαιο είναι δυνατόν να διασπαστεί σε σταγονίδια που αιωρούνται στο νερό. Τότε η κηλίδα δεν επηρεάζεται από τον άνεμο και μπορεί να ξανασχηματιστεί σε κάποια απόσταση από την περιοχή που έγινε η αρχική διαρροή.
2. **Νερό σε πετρέλαιο:** Αυτός ο τύπος γαλακτώματος μπορεί να σχηματισθεί εντός ολίγων ωρών και περιέχει μέχρι 80-90% νερό. Συνεπώς η πυκνότητα και το ειδικό βάρος αυξάνουν καθώς επίσης και οι όγκοι που θα πρέπει να καταπολεμηθούν. Ο σχηματισμός των γαλακτωμάτων μεγαλώνει μέχρι και στο δεκαπλάσιο τον όγκο του ρύπου, επιβραδύνει τις υπόλοιπες διαδικασίες γήρανσης και μετασχηματίζει τον ρύπο σε μορφή που μοιάζει να είναι περισσότερο στερεή παρά υγρή (16; 17). Τα επιφανειοδραστικά υλικά, ή αλλιώς τασιενεργά υλικά, που παράγονται μέσω των φωτοχημικών και βιολογικών διεργασιών περιλαμβάνονται επίσης στο σχηματισμό των γαλακτωμάτων (17).

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

Στην Εικόνα 9 φαίνεται η πορεία μιας πετρελαιοκηλίδας στο νερό. Το μήκος της γραμμής δείχνει την διάρκεια του κάθε σταδίου και το πάχος της δείχνει την πιο κρίσιμη φάση κάθε σταδίου.



Εικόνα 9: Πορεία πετρελαιοκηλίδας σε νερό (17)

1.3.2.2 Εξάπλωση πετρελαίου σε ακτές

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

καθαρισμό των ακτών διαδραματίζουν επίσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πετρελαίου και των λεπτών ανόργανων σωματιδίων καθώς μειώνεται η προσκόλληση του πετρελαίου στα υποστρώματα των ακτών, μέσω του σχηματισμού λεπτών συσσωματωμάτων πετρελαίου–ανόργανων σωματιδίων, που διασκορπίζονται εύκολα από την παλιρροιακή δράση και τα ρεύματα. Αυτά τα συσσωματώματα ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα του πετρελαίου για βιοδιάσπαση και έτσι οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου επιταχύνονται με αυτήν την διαδικασία (17).

1.3.2.3 Αντιμετώπιση θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή - Βιοεξυγίανση

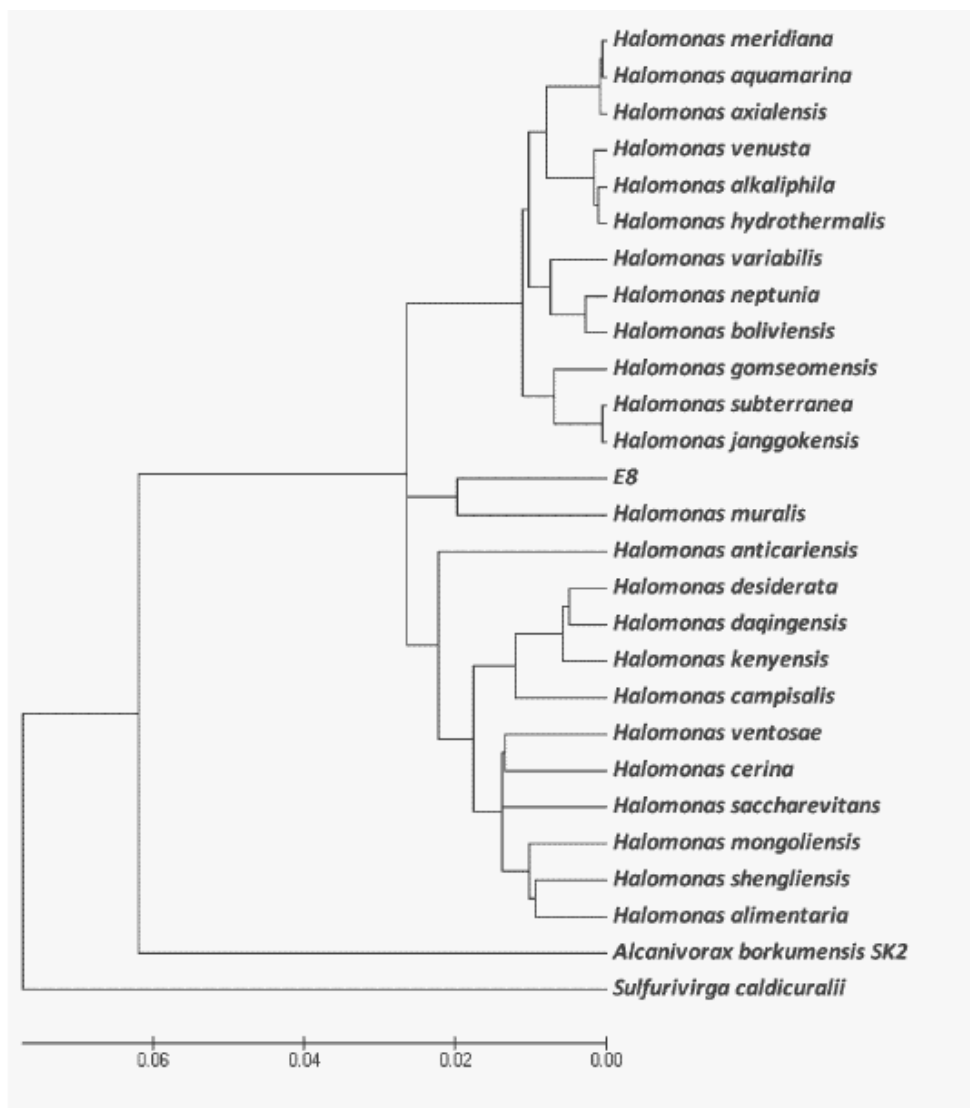
Η βιοεξυγίανση περιλαμβάνει την επιτάχυνση των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης ρυπασμένων περιβάλλοντων βελτιώνοντας την διαθεσιμότητά σημαντικών συστατικών (όπως θρεπτικών και οξυγόνου), τις περιβαλλοντικές συνθήκες (όπως pH και υγρασία) και την ύπαρξη μικροοργανισμών. Έτσι, η βιοεξυγίανση συνήθως περιλαμβάνει την εφαρμογή αζωτούχων και φωσφορούχων λιπασμάτων, την ρύθμιση του pH και της υγρασίας, την προσθήκη αέρα και βακτηρίων. Η προσθήκη BS βελτιώνει την διαδικασία εξυγίανσης ειδικά όταν η βακτηριακή ανάπτυξη είναι αργή (λόγω χαμηλών θερμοκρασιών), όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση ρύπων ή όταν ο ρύπος αποτελείται από δύσκολα αποικοδομήσιμες ουσίες όπως είναι οι PAHs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά Πειράματος

2.1.1 Βακτήριο *Alcanivorax borkumensis* SK2

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου [Antoniou et al. 2015] είχαν απομονωθεί και μελετηθεί πλήθος μικροβιακών κοινοτήτων και απομονωμένων μικροοργανισμών για την δυνατότητα τους να παράγουν BS. Το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 ήταν ένα από αυτά. Πρόκειται για ένα βακτήριο γνωστό για την παραγωγή γλυκολιπιδίων και ενεργό στην βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων, το οποίο συναντάται σε θαλάσσιες περιοχές ρυπασμένες με πετρελαιοειδή. Το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 είχε δείξει στα πλαίσια παλαιότερης έρευνας του εργαστηρίου, να παράγει BS έχοντας ως πηγή άνθρακα HOF, δίχως να διαλυτοποιεί την πηγή άνθρακα στην υδάτινη φάση. Με αυτόν τον τρόπο η απομόνωση των BS γίνεται πολύ πιο απλή και οικονομικά συμφέρουσα, καθώς αποφεύγεται το τελευταίο βήμα απομάκρυνσης πετρελαιοειδών από το τελικό προϊόν με χρωματογραφία στήλης (5). Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο της κοινότητας από την οποία απομονώθηκε το βακτήριο *A. borkumensis* SK2. Στα πλαίσια αυτού του πειράματος, επιλέχθηκε να μελετηθεί περεταίρω ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός και να δοκιμαστεί για την παραγωγή BS σε βιοαντιδραστήρα.



Εικόνα 10: Φυλογενετικό δέντρο της μικροβιακής κοινότητας που εμπεριέχει το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 (5)

2.1.2 Βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου HOF-1 και HOF-2

Τα βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου αποτελούν το υπόλειμμά από την κλασματική απόσταξη του αργού πετρελαίου και είναι πλούσια σε ασφαλτένια. Λόγω του χαμηλού τους κόστους, μιας και μπορούν να θεωρηθούν παραπροϊόντα άλλων εφαρμογών, και λόγω της αδυναμίας τους να διαλυθούν στην υδάτινη φάση, επιλέξαμε να τα χρησιμοποιήσουμε ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή BS.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη βαρέων κλασμάτων αργού πετρελαίου, τα HOF-1 (sample name SRAR U-2000, Sarir, Sample B, Date 26/04//2010) από τα διωλιστήρια της ΕΛΠΕ στον Ασπρόπυργο και τα HOF-2 (sample name U31, S-007, Date 27/01/2014) από τα διωλιστήρια της ΕΛΠΕ στην Ελευσίνα. Τα HOF-1 είναι κλάσματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο ενώ τα HOF-2 είναι ακόμα πιο βαριά και πιο δυσδιάλυτα κλάσματα από τα HOF-1. Πριν την χρήση τους, οι πηγές άνθρακα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο, σε θερμοκρασία 120°C και σε πίεση 1 bar για 20 λεπτά.

Για την ευκολότερη διαχείριση των πηγών άνθρακα, χρειάστηκε να θερμανθούν ώστε να μειωθεί το ιξώδες τους και να είναι δυνατή η ροή τους από το σκεύος φύλαξης στην καλλιέργεια. Μάλιστα στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα η πηγή HOF-2 έπειτα από την θέρμανση της, επιστρώθηκε πάνω σε αποστειρωμένη σίτα.

Στόχος του πειράματος, και κύρια ερωτήματα ήταν αν όντως η πηγή άνθρακα θα παραμείνει σε στέρεη φάση μέσα στην καλλιέργειας χωρίς να εισχωρήσει το τελικό προϊόν BS. Επίσης, αν οι παραγόμενες BS θα μπορούσαν να ενισχύσουν την διαλυτοποίηση του αργού πετρελαίου στην υδάτινη φάση και την φυσική αποικοδόμηση του.

2.1.3 Τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7

Το τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7 χρησιμοποιήθηκε αντί θαλασσινού νερού, ως το μέσω όλων των μικροβιακών καλλιιεργειών. Για την παρασκευή ONR7 παρασκευάστηκαν αρχικά τρία πυκνά διαλύματα (5x). Όλα τα διαλύματα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο, σε θερμοκρασία 120°C και σε πίεση 1 bar για 20 λεπτά.

Διάλυμα 1 (σε 1L H₂O)

- NaCl	113,95g
- Na ₂ SO ₄	19,9g
- KCl	3,6g
- NaBr	415mg
- NaHCO ₃	155mg
- H ₃ BO ₃	135mg

- NaF 13mg
- NH₄Cl 0,35g
- Na₂HPO₄ x 7H₂O 445mg
- TAPSO 6,5g

Διάλυμα 2 (σε 500ml H₂O)

- MgCl₂ x 6H₂O 55,9g
- CaCl₂ x 2H₂O 7,3g
- SrCl₂ x 6H₂O 120mg

Διάλυμα 3 (σε 100ml H₂O)

- FeC₂ x 4H₂O 10mg

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

1. Ανάμειξη 200ml από το διάλυμα 1 με 133ml απιονισμένου νερού και ρύθμιση του pH στο 7,6 με χρήση διαλύματος NaOH (2M).
2. Προσθήκη 100ml από το διάλυμα 2.
3. Προσθήκη 20ml από το διάλυμα 3.
4. Προσθήκη 547ml απιονισμένου νερού.

Το τελικό διάλυμα ONR7 αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο, σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1 bar για 20 λεπτά.

2.1.4 Διάλυμα θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου (NP)

Το διάλυμα θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου (NP) ενισχύει την δράση των μικροοργανισμών. Η συγκέντρωση των θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου στις καλλιέργειες ήταν 0,05 και 0,005% αντίστοιχα. Σε κάθε 1 λίτρο ONR7, προσθέταμε 50 ml διαλύματος NP. Η Παρασκευή του διαλύματος NP είχε ως εξής.

Σε 1L απιονισμένου νερού (dH₂O) προσθέτουμε 72,48g KNO₃ (SIGMA-ALDRICH) και 5,64g KH₂PO₄ (SIGMA-ALDRICH). Το διάλυμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο, σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1 bar για 20 λεπτά.

2.1.5 Βιοαντιδραστήρας Bioengineering

Για την παραγωγή BS χρησιμοποιήθηκε ο βιοαντιδραστήρας της Bioengineering AG (CH 8636 Wald από την Ελβετία). Ο βιοαντιδραστήρας αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1 bar για 20 λεπτά πριν την χρήση του. Κατά την λειτουργία του, ο αντιδραστήρας είχε θερμοκρασία 20 °C, ανάδευση 150 rpm, ροή αέρα 50 L/hr και 35% διαλυμένο οξυγόνο. Ο όγκος της καλλιέργειας ήταν 3,3 L.

2.2 Μέθοδοι Πειράματος

2.2.1 Μέθοδος οπτικής απορρόφησης

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

2.2.2 Καλλιεργητική μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Η καλλιεργητική μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν στην καλλιέργεια, όταν επιστρωθούν σε κατάλληλο στέρεο θρεπτικό μέσο, σχηματίζουν ορατές και ξεχωριστές αποικίες. Μονάδα μέτρησης των αποικιών

είναι το CFU (colony forming units). Λόγω της συνήθους υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στα δείγματα, για την εφαρμογή της μεθόδου θα πρέπει να γίνουν κατάλληλες αραιώσεις (17). Κατά τα πειράματα, έγιναν αραιώσεις σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (Buffer NaCl 8,5 g NaCl/L dH₂O). Σε περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στον όγκο του δείγματος που πρόκειται να επιστρωθεί στο στέρεο υπόστρωμα, οι αποικίες που θα σχηματιστούν θα επικαλύπτονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατο το μέτρημά τους. Σκοπός των αραιώσεων είναι οι αριθμός των αποικιών σε κάθε τρυβλίο Πετρί να είναι από 30 έως 300. Για λόγους μεγαλύτερης ακρίβειας, γίνεται εις διπλούν επίστρωση τριών συνεχόμενων αραιώσεων. Οι αραιώσεις αυτές, διαφέρουν συνήθως κατά μία τάξη μεγέθους η μία από την άλλη. Έτσι για παράδειγμα, θα αναμενόταν στο πιο πυκνό διάλυμα να μετρηθούν 220 αποικίες, στο αμέσως πιο αραιό 22 και στο αραιότερο 2 με 3 (18). Τα τρυβλία Πετρί που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια σε στέρεο υπόστρωμα, είχαν ως θρεπτικό ZOBELL MARINE και AGAR (40,25g ZOBELL MARINE BROTH 2216 και 15g Agar σε 1L dH₂O) και παρέμεναν για επώαση 144 ώρες στους 20°C.

2.2.3 Παραγωγή BS με HOF-1,-2

Τα αρχικά πειράματα για την παραγωγή BS έγιναν σε ποτήρια ζέσεως. Σκοπός ήταν να ελεγχθούν και να συγκριθούν οι δύο πηγές HOF. Ακολουθούν οι αναλογίες των διαφόρων υλικών στις καλλιέργειες.

Πείραμα με HOF-1

- 200 ml ONR7
- 10 ml NP
- 1 g HOF-1
- *A. borkumensis* SK2, αρχική συγκέντρωση: $\sim 1 \cdot 10^7$ CFU/ml

Πείραμα με HOF-2

- 300 ml ONR7
- 15 ml NP
- 1,5 g HOF-2

- *A. borkumensis* SK2, αρχική συγκέντρωση: $\sim 1 \cdot 10^7$ CFU/ml

Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 20°C και αναδευόταν συνεχόμενα στις 120rpm. Το πείραμα με το HOF-1 διήρκησε 22 ημέρες και η δειγματοληψία όγκου 20ml από την καλλιέργεια γινόταν κάθε 4 μέρες. Το πείραμα με το HOF-2 διήρκησε 20 μέρες και η δειγματοληψία όγκου 20ml από την καλλιέργεια γινόταν κάθε 5 μέρες.

Στα δείγματα γινόταν εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα σύμφωνα με τους Smyth, T. J. P., et al. για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των BS μέσα στην καλλιέργεια (19). Η μέθοδος αυτή παρουσιάζεται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

2.2.4 Απομόνωση BS με εκχύλιση

Για την απομόνωση των BS από το κάθε δείγμα έπρεπε να διαχωριστούν αρχικά τα μικροβιακά κύτταρα από την υγρή φάση. Οι πηγές άνθρακα, όντως μη διαλύσιμες στην υδατινή φάση, παραμέναν μέσα στην καλλιέργεια κατά την δειγματοληψία. Σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη στο εργαστήριο, το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 παράγει κατά κύριο λόγο Ραμνολιπίδια (5). Έτσι για την απομόνωση των BS χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ειδική για την απομόνωση Ραμνολιπιδίων.

Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Απομάκρυνση κυττάρων με φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά.
2. Μείωση του pH στο 3 με διάλυμα HCl 2M και μεταφορά του δείγματος σε διαχωριστική χοάνη των 100ml.
3. Τριπλή εκχύλιση του δείγματος με ίσου όγκου ποσότητας οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate). Σε αυτό το στάδιο απαιτείται καλή ανάμιξη του διαλύτη με το δείγμα και έπειτα αναμονή για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων.
4. Μεταφορά της ανώτερης στιβάδας (στιβάδας οξικού αιθυλεστέρα) σε κωνική φιάλη με θειικό μαγνήσιο (0,5g ανά 100ml οξικού αιθυλεστέρα) για την απορρόφηση, από το αλάτι, τυχόν υγρασίας.
5. Φιλτράρισμα της ανώτερης στιβάδας από φίλτρο Whatman nr 125.
6. Επανάληψη της εκχύλισης της κατώτερης στιβάδας άλλες δύο φορές. (19)

Μέσω της εκχύλισης, τα Ραμνολιπίδια μεταφέρονται στον διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας). Έπειτα ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, στους 60 °C με χρήση αντλίας κενού. Για την μέτρηση της μάζας των Ραμνολιπιδίων ζυγίζεται άδειο μπουκαλάκι των 2ml και έπειτα μεταφέρονται σε αυτό, με την χρήση οξικού αιθυλεστέρα, τα Ραμνολιπίδια. Στην συνέχεια εξατμίζεται ο νέος διαλύτης κάτω από ροή αζώτου και ζυγίζεται ξανά το μπουκαλάκι. Η διαφορά μάζας των δύο ζυγισμάτων αποτελεί την μάζα των Ραμνολιπιδίων. Τέλος, ακολουθεί αναγωγή αυτής της μάζας ανά λίτρο καλλιέργειας.

2.2.5 Ανάπτυξη βακτηρίου *A. borkumensis* SK2 σε ONR7 με HOF-2

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων δοκιμής και σύγκρισης των δύο πηγών άνθρακα (HOF-1 και HOF-2), αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η πηγή HOF-2 περεταίρω. Έτσι πραγματοποιήθηκε πείραμα για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του βακτηρίου *A. borkumensis* SK2 σε ONR7 με χρήση HOF-2. Ακολουθούν οι αναλογίες των διαφόρων υλικών στις καλλιέργειες.

- 200 ml ONR7
- 10 ml NP
- 1 g HOF-2
- *A. borkumensis* SK2, αρχική συγκέντρωση: $\sim 1 \cdot 10^5$ CFU/ml

Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 20°C και αναδευόταν συνεχόμενα στις 120rpm.

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στην καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν η καλλιεργητική μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και η μέθοδος της οπτικής απορρόφησης. Οι δύο αυτές μέθοδοι συγκρίθηκαν και εκτιμήθηκε η μέση συγκέντρωση του *A. borkumensis* SK2 στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

2.2.6 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μία χρήσιμη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ουσιών. Πρόκειται ουσιαστικά για τον διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ δύο

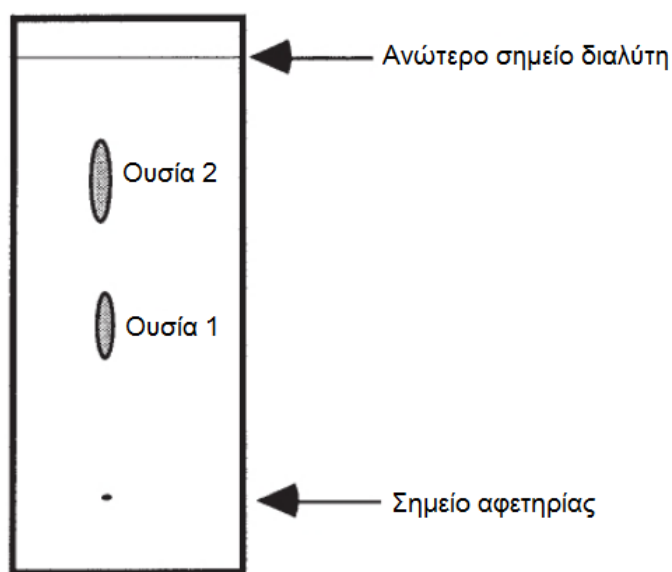
φάσεων, της κινητής υγρής φάσης και της στατικής στερεής φάσης μεγάλης επιφάνειας. Η στατική φάση, συνήθως, αποτελείται από γέλη πυριτίου (silica gel, SiO₂) ή λιγότερο συχνά από οξείδιο αργιλίου και είναι τοποθετημένη σε γυαλί ή μέταλλο. Η κινητή φάση αποτελείται από κάποιο πτητικό οργανικό διάλυμα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σύμφωνα με παλαιότερη δημοσίευση, ο μικροοργανισμός *A. borkumensis* έχει την τάση να παράγει Ραμνολιπίδια (5). Για τον χαρακτηρισμό των Ραμνολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Διαλυτοποίηση μικρής ποσότητας δείγματος σε χλωροφόρμιο και τοποθέτηση μιας σταγόνας 10 μl κοντά στο κάτω άκρο πλάκας (περίπου 2 cm από το κάτω άκρο) επιστρωμένης με γέλη πυριτίου. Το σημείο τοποθέτησης θεωρείται ως το σημείο αφετηρίας.
2. Για την εξακρίβωση του είδους του Ραμνολιπιδίου, θα πρέπει να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της λεπτής χρωματογραφίας στήλης με αποτελέσματα από τυποποιημένα Ραμνολιπίδια. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο δείγμα Ραμνολιπιδίων, μίγμα Rha-C10-C10 και Rha-Rha-C10-C10 της Aldrich Chemistry (R-95 RL95%).
3. Όταν στεγνώσει η σταγόνα πάνω στο υλικό, η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό δοχείο με σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου:μεθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (6,5:1,5:0,2, v/v/v). Οι διαλύτες θα πρέπει να έχουν παραμείνει τουλάχιστον 10 λεπτά στο δοχείο προκειμένου ο υπερκείμενος αέρας μέσα στο δοχείο να είναι κορεσμένος από αυτούς. Επιπλέον, η στάθμη των διαλυτών μέσα στο δοχείο θα πρέπει να είναι μικρότερου ύψους από το ύψος τοποθέτησης του δείγματος πάνω στην πλάκα (από το σημείο αφετηρίας).
4. Η πλάκα αφήνεται μέσα στο δοχείο έως οι διαλύτες την εμποτίσουν μέχρι σχεδόν το πάνω άκρο της. Η εμποτίση λαμβάνει χώρα χάρη στα τριχοειδή φαινόμενα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της πλάκας. Η ταχύτητα αυτή είναι ανάλογη της πολικότητας της κάθε ουσίας. Μετά την αφαίρεση της πλάκας από το δοχείο ακολουθεί το στέγνωμά της κάτω από ρεύμα αέρος.
5. Δημιουργία αντιδραστηρίου anthrone reagent με την μίξη 63ml θεικού οξέος, 25ml απιονισμένου νερού και 0,125g anthrone. Πρόκειται για μία έντονα εξώθερμη αντίδραση

άρα θα πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες ψύχους. Το αντιδραστήριο αυτό είναι απαραίτητο για την εμφάνιση των κηλίδων πάνω στην πλάκα.

6. Ψεκασμός της πλάκας με anthrone reagent και τοποθέτησή της μέσα σε αναμμένο φούρνο στους 70°C για περίπου 20min.
7. Η πλησιέστερη στο σημείο αφετηρίας κηλίδα που θα εμφανιστεί, αντιπροσωπεύει τα Διραμνολιπίδια (Dirhamnolipids) ενώ η κηλίδα σε μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο αφετηρίας αντιπροσωπεύει τα Μονοραμνολιπίδια (Monorhamnolipid).
8. Για την σύγκριση των δειγμάτων υπολογίζονται οι συντελεστές RF για κάθε δείγμα. Ο συντελεστής αυτός ισούται με την απόσταση από το σημείο αφετηρίας έως την κηλίδα, προς την απόσταση από το σημείο αφετηρίας έως το σημείο που έφτασε ο διαλύτης (19).



Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)

2.2.7 Προετοιμασία και λειτουργία βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή BS

Για την παραγωγή BS κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας της Bioengineering AG (CH 3636 Wald Switzerland). Οι φυσικοχημικές παράμετροι και η συνθήκες λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην

παραγωγή BS. Τέτοιες είναι το pH, η θερμοκρασία, η ανάδευση, το είδος της πηγής άνθρακα και η συγκέντρωση των θρεπτικών (20).

Ως μέσον της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε ONR7 συνολικού όγκου 3,3 L. Έγινε προσθήκη διαλύματος NP ώστε η συγκέντρωση του αζώτου και του φωσφόρου να είναι 0,05% και 0,005% αντίστοιχα. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε HOF-2 επιστρωμένο πάνω σε αποστειρωμένα δίχτυα. Λόγω της δυσκολίας στην διαχείριση της πηγής άνθρακα HOF-2, επιλέχθηκε η επάλειψη της σε δίχτυα. Η πηγή HOF-2 και τα δίχτυα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο σε πίεση 1 bar και θερμοκρασία 120 °C για 20 λεπτά. Τα δίχτυα είχαν μέγεθος 2x2 cm² και συνολική επιφάνεια τους ήταν 160 cm². Λόγω της δράσης των μικροοργανισμών και στις δύο πλευρές των δικτύων θεωρούμε την επιφάνεια επαφής περίπου 320 cm². Τέλος, στον βιοαντιδραστήρα προστέθηκε το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 σε αρχική συγκέντρωση 7,6*10⁷CFU/ml. Το βακτήριο είχε καλλιεργηθεί ξεχωριστά σε θρεπτικό Zobell Marine 2216 (40,25g/L) σε ποτήρι ζέσεως για 6 ημέρες. Από την καλλιέργεια αυτήν (με αρχική συγκέντρωση 2,52*10¹¹ CFU), 50 ml χρησιμοποιήθηκαν για τον βιοαντιδραστήρα. Τα 50 ml φυγοκεντρήθηκαν στις 7000 rpm για 20 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε ώστε να γίνει ξέπλυμα των βακτηρίων με καθαρό ONR7. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και του ξεπλύματος των βακτηρίων επαναλήφθηκε 3 φορές και έπειτα προστέθηκαν τα βακτήρια, διαλυμένα σε μικρή ποσότητα ONR7 στον βιοαντιδραστήρα.

Όσον αφορά στις φυσικές παραμέτρους της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, η θερμοκρασία ήταν 20°C, η παροχή αέρα ήταν 50L/hr, το διαλυμένο οξυγόνο ήταν 35% και η ανάδευση είχε ταχύτητα 150 rpm.

Λειτουργία βιοαντιδραστήρα:

Το πρώτο στάδιο λειτουργίας του αντιδραστήρα διήρκεσε 10 ημέρες. Το διάστημα αυτό επιλέχθηκε βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων που έλαβαν χώρα σε ποτήρια ζέσεως. Σύμφωνα με αυτά την ημέρα 10 η συγκέντρωση των BS φτάνει την μέγιστη τιμή της. Στην πρώτη αυτή περίοδο λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα το βακτήριο έχει την δυνατότητα να εγκλιματιστεί στο νέο περιβάλλον.

Την ημέρα 10 ξεκίνησε η δεύτερη φάση λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, όπου γινόταν απομάκρυνση μέρους της καλλιέργειας για την απομόνωση BS. Ο όγκος που αφαιρούνταν ισούταν με το 60% της συνολικής καλλιέργειας και στην θέση του αμέσως προσθέταμε νέο ONR7 με θρεπτικά NP. Η πηγή άνθρακα όντας ακινητοποιημένη στα δίκτυα δεν εξερχόταν του βιοαντιδραστήρα κατά την διαδικασία αυτή. Με την αφαίρεση αυτού του μέρους από την καλλιέργεια, αφαιρούσαμε το 60% των βακτηρίων και των 60% της ποσότητας BS. Θεωρούμε την μείωση της συγκέντρωσης των βακτηρίων αμελητέα καθώς η τάξη μεγέθους δεν άλλαζε. Όσον αφορά στην συγκέντρωση των BS, η μείωση της ήταν σημαντική και ο στόχος μας ήταν να βρεθεί το απαιτούμενο χρονικό διάστημα στο οποίο θα επανερχόταν στην μέγιστη τιμή της. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες μετά από 1, 3, 5, 6 και 7 ημέρες λειτουργίας του αντιδραστήρα. Διαπιστώθηκε ότι μέχρι την ημέρα 6 η συγκέντρωση των BS στον αντιδραστήρα αυξάνεται και την ημέρα 7 αρχίζει να μειώνεται ξανά.

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των BS στον αντιδραστήρα, 3 δείγματα των 35 ml εκχυλιζόταν σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.2.4 Απομόνωση BS με εκχύλιση).

2.2.8 Εξέταση απόδοσης διασποράς πετρελαίου με χρήση BS (Baffled Flask Test, BFT)

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των BS, που παράχθηκαν στον βιοαντιδραστήρα, όσον αφορά στην διάλυση του αργού πετρελαίου στην υδάτινη φάση. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA) της Αμερικής, για την καταπολέμηση πετρελαιοκηλίδων σε θαλάσσιο περιβάλλον.

Οι BS που παράγονται από τους μικροοργανισμούς δεν είναι εύκολα διαχειρίσιμες λόγω της παχύρρευστης φύσης τους. Για τον λόγο αυτό, οι BS διαλύθηκαν πρώτα σε σογιέλαιο. Μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 0%, 5%, 7,5% και 15% BS σε σογιέλαιο (w/v).

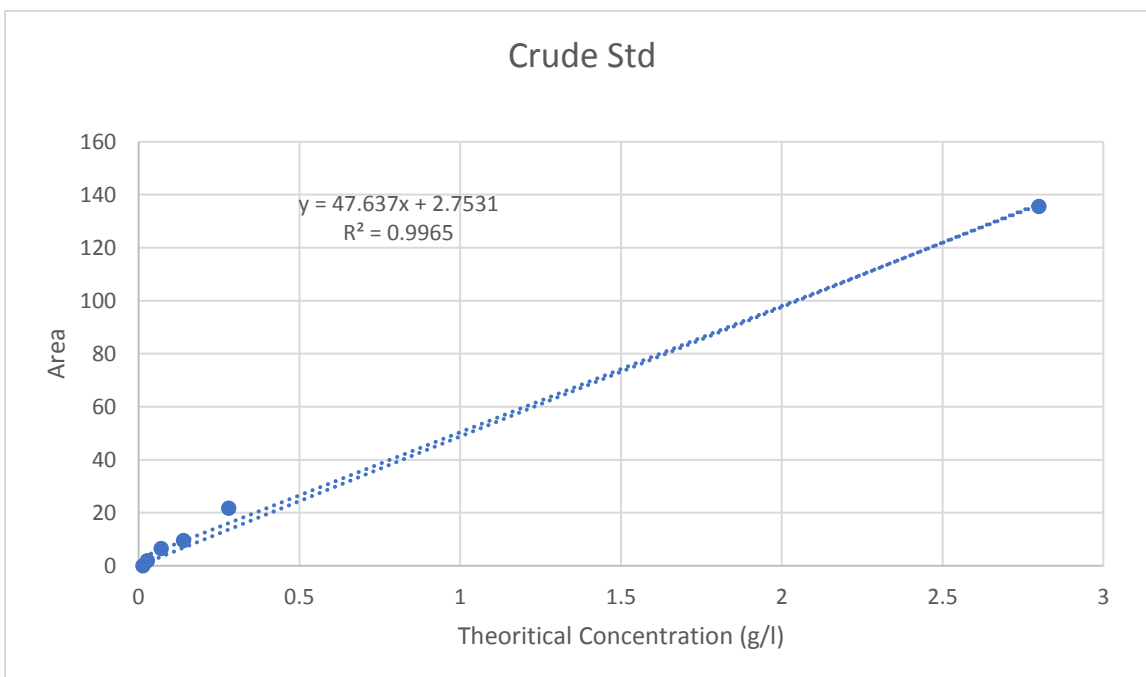
Σε ειδικά σχεδιασμένη φλάσκα για την προσομοίωση του κυματισμού της θάλασσας (baffled flask), προστέθηκαν τα ακόλουθα:

- 120 ml saline water (34g salinity/L dH₂O)
- 100 μl αργό πετρέλαιο (Iranian light crude oil)

- 4 μl BS διαλυμένο σε σογιέλαιο στις διάφορες συγκεντρώσεις

Η φιάσκα τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα στις 200 rpm για 10 λεπτά. Ακολούθησε μια περίοδος ηρεμίας για άλλα 10 λεπτά. Έπειτα έλαβε χώρα η δειγματοληψία. Κατά την δειγματοληψία, τα πρώτα 2 ml απομακρύνονται και λαμβάνονται 30 ml για ανάλυση. Το δείγμα εκχυλίζεται 3 φορές σε διαχωριστική χοάνη με 5 ml DCM suprasoln κάθε φορά. Έπειτα το εκχύλισμα συμπληρώνεται με DCM suprasoln έως τα 20 ml και φωτομετράται στα 340, 370 και 400 nm. Για κάθε δείγμα γίνονται 4 επαναλήψεις.

Οι τιμές που λαμβάνουμε από το φωτόμετρο συγκρίνονται με την καμπύλη βαθμονόμησης του Διαγράμματος 1.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμένου αργού πετρελαίου σε saline water (21)

2.2.9 Εξέταση βελτίωσης βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου με χρήση BS

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε η ποιότητα των BS, που είχαν παραχθεί στον βιοαντιδραστήρα, όσον αφορά στην απόδοση τους ως μέσω βελτίωσης της αποικοδόμησης του αργού

πετρελαίου από τους γηγενής μικροοργανισμούς της θάλασσας. Για να μπορούμε να διαχειριστούμε τις BS χρειάστηκε πρώτα να τις διαλυτοποιήσουμε σε κάποιο μέσον. Σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί διαλύτες, αυτοί ήταν απιονισμένο νερό και σογιέλαιο. Η διαλυτότητα των BS στο νερό ήταν αρκετά χαμηλή (0,384% w/v), ενώ στο σογιέλαιο διαλυόταν πιο εύκολα (15% w/v). Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα vials των 20 ml, θαλασσινό νερό από τον Άγιο Ονούφριο, αργό πετρέλαιο (Iranian light crude oil) και διάλυμα θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου (NP). Σε κάθε πείραμα, για κάθε δείγμα και για κάθε ημέρα δειγματοληψίας, έγινε τριπλή επανάληψη της όλης διαδικασίας. Οι ημέρες δειγματοληψίας ήταν έπειτα από 0, 7 και 28 ημέρες επώασης των vial στους 20 °C και στις 120rpm. Για την απομόνωση του υπολειπόμενου αργού πετρελαίου από τις καλλιέργειες έγινε τριπλή εκχύλιση των καλλιεργειών με ίσου όγκου προς την καλλιέργεια DCM suprasoln. Έπειτα, τα δείγματα πετρελαίου διαλυμένα σε αυτόν τον διαλύτη εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 60 °C και μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα vials των 4 ml. Έγινε εκτίμηση του βάρους των δειγμάτων και ακολούθησε ανάλυσή τους με εκχύλιση στέρεας φάσης SPE και αέρια χρωματογραφία GC-MS. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αναλογίες των διαφόρων υλικών μέσα στις καλλιέργειες αυτού του πειράματος.

Αναλογίες 1^{ου} πειράματος βιοαποικοδόμησης (BS in dH₂O):

Τυφλά δείγματα (1): SW_CO

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου

Τυφλά δείγματα (2): SW_CO_NP

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 0,5 ml διαλύματος NP

Πειραματικά δείγματα: SW_CO_NP_BS

- 10 ml θαλασσινό νερό

- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 0,5 ml διαλύματος NP
- 0,5 ml BS σε νερό (1,92 mg \approx 2 mg δραστικής ουσίας)

Αναλογίες 2^{ου} πειράματος βιοαποικοδόμησης (BS in soybeanoil):

Τυφλά δείγματα (1): SW_CO

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου

Τυφλά δείγματα (2): SW_CO_SOY

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 33,3 μ L σογιέλαιο

Τυφλά δείγματα (3): SW_CO_NP

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 0,5 ml διαλύματος NP

Τυφλά δείγματα (4): SW_CO_NP_SOY

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 0,5 ml διαλύματος NP
- 33,3 μ L σογιέλαιο

Πειραματικά δείγματα: SW_CO_NP_BS.IN.SOY

- 10 ml θαλασσινό νερό
- 0,05 g αργού πετρελαίου
- 0,5 ml διαλύματος NP
- 33,3 μ L BS σε σογιέλαιο (4,995 mg \approx 5 mg δραστικής ουσίας)

2.2.10 Εκχύλιση στέρεης φάσης (SPE)

Η εκχύλιση στέρεας φάσης χρησιμοποιείται από πλήθος εφαρμογών, διότι καταφέρνει τον διαχωρισμών διαφόρων ουσιών που βρίσκονται διαλυμένες σε ένα διαλύτη, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε συσκευή SPE, αντλία κενού, στήλες πληρωμένες με σωματίδια πυριτικής γέλης (Agilent Technologies) και ως διαλύτες εξάνιο (C6 Suprasolv, Merck) για του κορεσμένους υδρογονάνθρακες και διχλωρομεθάνιο (DCM Suprasolv, Merck) για τους αρωματικούς. Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Πλήρωση των στηλών με 2 ml C6
- Απομάκρυνση δείγματος από το vial με 0,5 ml C6 και προσθήκη αυτού στην στήλη
- Απομάκρυνση υπολειπόμενου δείγματος από το vial με 0,5 ml C6 και προσθήκη αυτού στην στήλη
- Προσθήκη 3 ml C6 στην στήλη
- Απομάκρυνση δείγματος από το vial με 0,5 ml DCM και προσθήκη αυτού στην στήλη
- Προσθήκη 3,5 ml DCM στην στήλη

Τα δείγματα που προέκυψαν από την SPE μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα vials των 2 ml. Στα δείγματα προστέθηκε διαλύτης DCM:C6 (9:1) και 5μL internal standard¹.

2.2.11 Αέρια χρωματογραφία και φασματοφωτομετρία μάζας (GS-MC)

Χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία και φασματοφωτομετρία μάζας (GC-MS) για την εκτίμηση της μάζας των υδρογονανθράκων στα δείγματα του πειράματος βιοεξυγίανσης. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος σύμφωνα με τους Fodelianakis, Stylianos, et al. 2015.

Χρησιμοποιήθηκε μηχανήμα GC-MS HP 7890/5975C της Agilent με στήλη HP-5 5% phenyl methyl siloxane. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 60 °C και ακολουθούσε αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 300 °C με ρυθμό 6 °C/min. Η δειγματοληψία γινόταν με αυτόματο δειγματολήπτη (pulsed-splitless mode, at 250 °C) και το δείγμα διαλυόταν σε εξάνιο

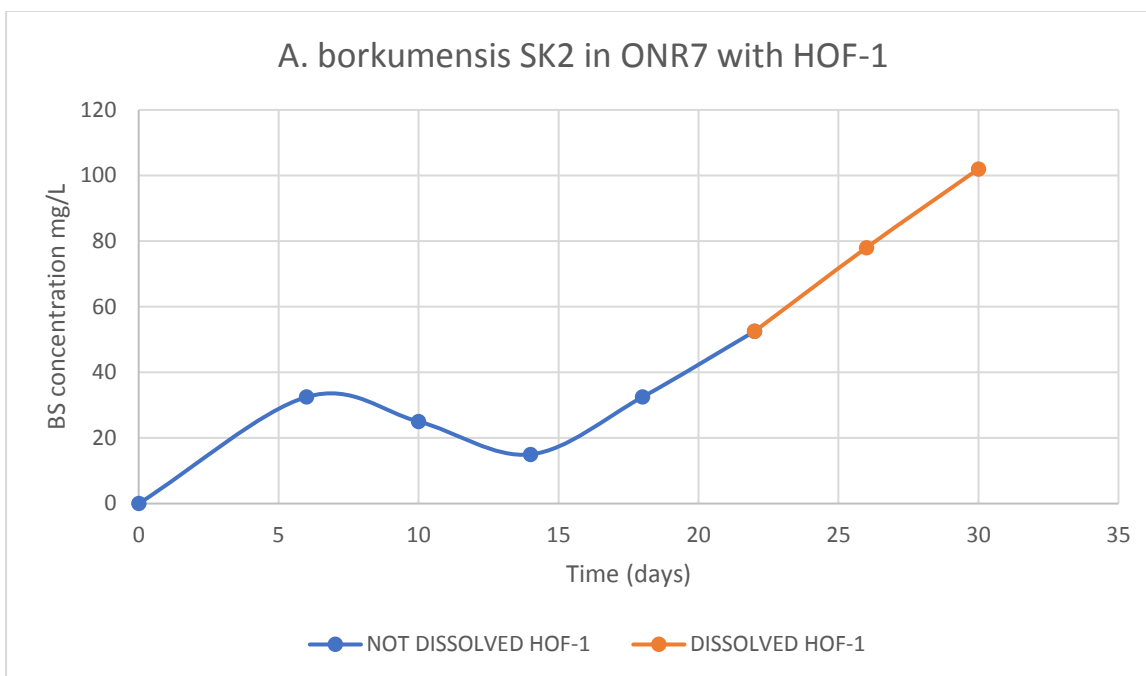
¹ Ένα μίγμα εξανίου με 200ppm δευτεριομένων ενώσεων (d₈-naphthalene, d₁₀-phenanthrene d₁₂-chrysene, d₁₂-perylene) κάθε μία εκ των οποίων ποσοτικοποιεί διαφορετική ομάδα υδρογονανθράκων.

(SupraSolv, Merck) σε συγκέντρωση 1/200 v/v. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο. Η γραμμή μεταφοράς, η πηγή MS και οι θερμοκρασίες κβαντοπλοΐας ρυθμίστηκαν στους 280 °C, 230 °C και 150 °C αντίστοιχα. Η ανάλυση έλαβε χώρα με μονή ανίχνευση ιόντων (Singel Ion Detection, SIM). Η μέθοδος είχε βαθμονομηθεί ποσοτικά με χρήση μίγματος υδρογονανθράκων κανονικών αλκανίων n-C10_n-C35 και 16 αρωματικούς υδρογονάνθρακες (EPA priority aromatic hydrocarbons) (naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluorene, dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene, perylene, indeno(g,h,i)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(1,2,3-cd)perylene) και dibenzothiophene) (Absolute Standards). Για την ακρίβεια των μετρήσεων έγινε κανονικοποίηση τους ως προς την μείωση της μάζας του 17a21b_horane, καθώς η συγκεκριμένη ουσία μειώνεται λόγω οποιουδήποτε παράγοντα πέραν της βιοαποικοδόμησης (22).

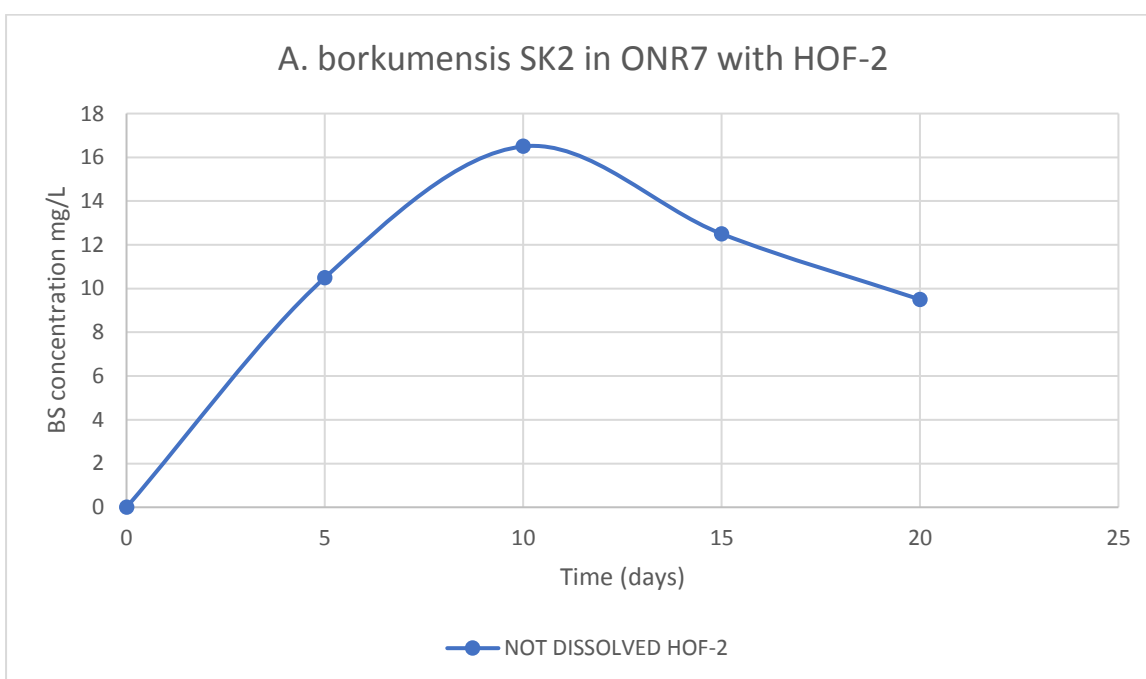
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Παραγωγή BS από το βακτήριο *A. borkumensis* SK2

Το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 είναι γνωστό για την παραγωγή γλυκολιπιδίων και για την δυνατότητα του να αποικοδομεί υδρογονάνθρακες (5). Η παραγωγή BS από το βακτήριο αυτό εξετάστηκε με δύο διαφορετικές πηγές βαρέων κλασμάτων αργού πετρελαίου (HOF-1 και HOF-2). Στα Διαγράμματα Διάγραμμα 2 και Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των BS συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιεργειών. Στην περίπτωση της πηγής HOF-1, παρατηρείται υψηλή παραγωγή BS (52,5 mg/L) έπειτα από 22 ημέρες επώασης, όμως η πηγή αυτή διαλύεται και εισχωρεί στην υδάτινη φάση έπειτα από 26 ημέρες επώασης (Διάγραμμα 2). Έτσι, για την απομόνωση των BS θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες διαδικασίες, ώστε να απομακρυνθούν οι προσμίξεις της πηγής άνθρακα από αυτές. Στην περίπτωση της πηγής HOF-2, η συγκέντρωση των BS φτάνει την μέγιστη τιμή της (16 mg/L) έπειτα από 10 ημέρες επώασης και η πηγή αυτή δεν διαλύεται στην υδάτινη φάση ακόμα και μετά το πέρας μεγάλων χρονικών διαστημάτων (Διάγραμμα 3). Στόχος μας ήταν η παραγωγή BS χωρίς προσμίξεις από την πηγή άνθρακα και για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η πηγή HOF-2 στα υπόλοιπα πειράματα.



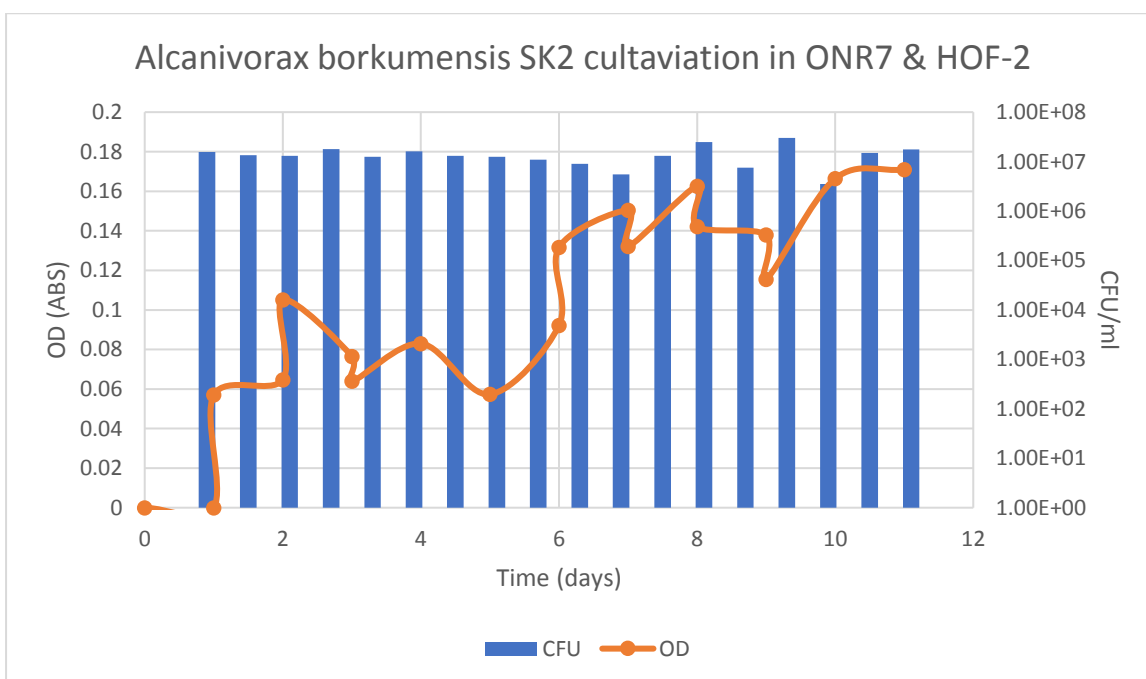
Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση BS συναρτήσει χρόνου σε καλλιέργεια με HOF-1



Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση BS συναρτήσει χρόνου σε καλλιέργεια με HOF-2

3.2 Καμπύλη ανάπτυξης *A. borkumensis* SK2 σε ONR7 με HOF-2

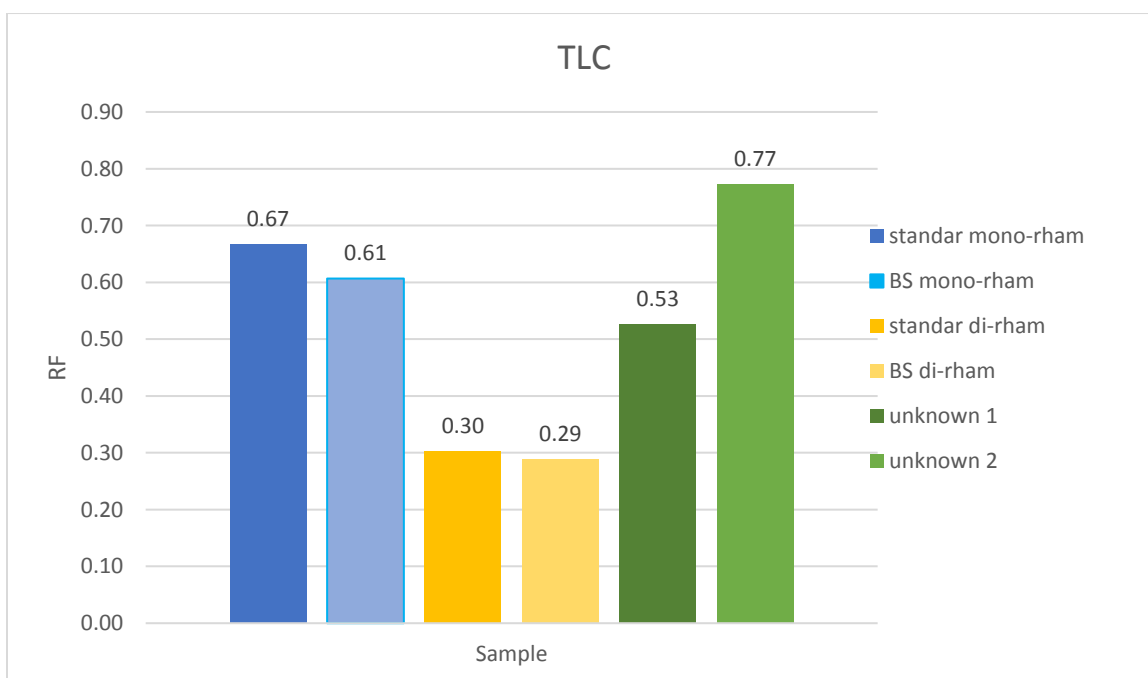
Το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 καλλιεργήθηκε σε ONR7 με χρήση της πηγής HOF-2 προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του συναρτήσει του χρόνου και συναρτήσει της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και στόχος ήταν να προσομοιωθούν σε αυτό, όσο το δυνατόν καλύτερα, οι συνθήκες που θα επικρατούσαν και στον βιοαντιδραστήρα. Οι αναλογίες ONR7:C:N:P ήταν 100:0,5:0,05:0,005. Από το Διάγραμμα 4 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η σταθερή συγκέντρωση του βακτηρίου μας, στο συγκεκριμένο περιβάλλον είναι 10^6 CFU/ml (σύμφωνα με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία Πετρί με κατάλληλο θρεπτικό υλικό). Όσον αφορά στην οπτική απορρόφηση, αυτή αυξάνεται με το πέρασ των ημερών, χωρίς όμως να υπάρχει περεταίρω αύξηση της καλλιέργειας. Οπότε η οπτική απορρόφηση δεν σχετίζεται με την συγκέντρωση των μικροοργανισμών στην συγκεκριμένη καλλιέργεια.



Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση *A. borkumensis* SK2 σε ONR7 με HOF-2 ως προς τον χρόνο, συναρτήσει OD

3.3 Ανάλυση BS με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Στο πείραμα αυτό, οι BS που είχαν παραχθεί από το βακτήριο *A. borkumensis* SK2 έχοντας ως πηγή άνθρακα HOF-2 και σε καλλιέργεια με αναλογίες ONR7:C:N:P ίσες με 100:0,5:0,05:0,005, συγκρίθηκαν με σάνταρ ραμνολιπίδιο καθαρότητας 95%. Στο σάνταρ δείγμα, κατά την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, εμφανίστηκαν 2 κηλίδες που αντιπροσώπευαν τα μονο- και δι-ραμνολιπίδια. Στα δείγματα των BS του βακτηρίου *A. borkumensis* SK2 εμφανίστηκαν 4 κηλίδες, εκ των οποίων οι 2 ήταν σε παρόμοια θέση με τις κηλίδες στο σάνταρ δείγμα. Για την σύγκριση των δειγμάτων υπολογίστηκε κάθε φορά ο συντελεστής RF που ισούται με την απόσταση από το σημείο αφετηρίας έως το σημείο εμφάνισης της κηλίδας, προς την συνολική απόσταση που είχε διανύσει ο διαλύτης πάνω στην επιφάνεια επικαλυμμένη με γέλη πυριτίου.



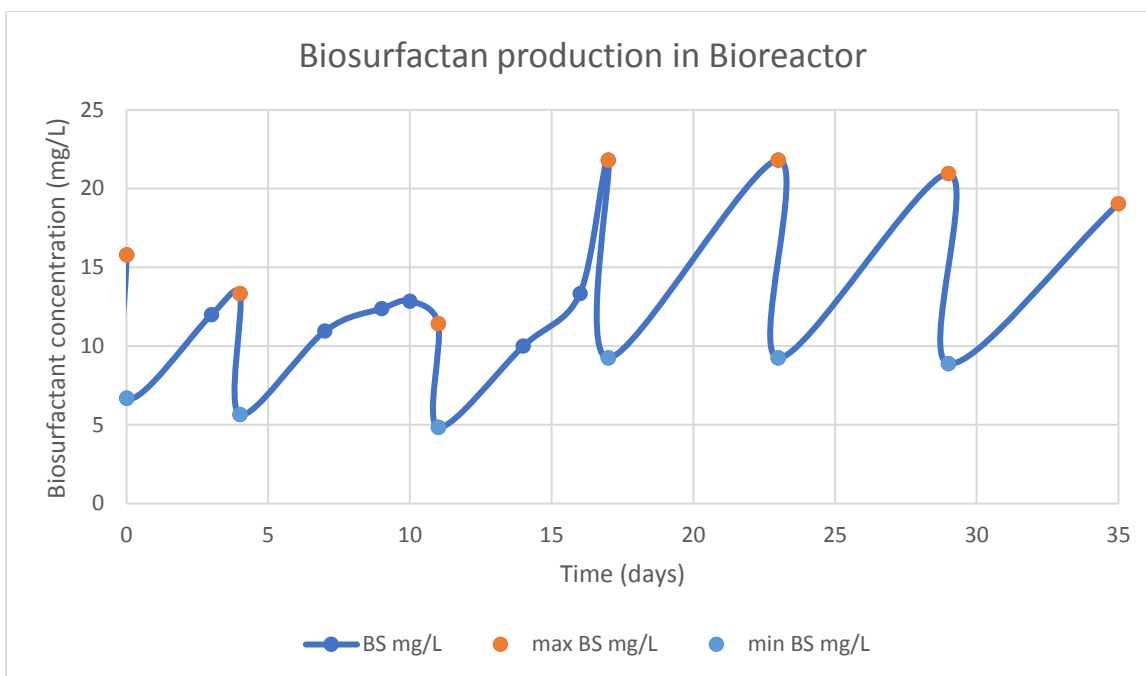
Διάγραμμα 5: Σύγκριση συντελεστών RF του σάνταρ δείγματος Ραμνολιπιδίων και των BS του *A. borkumensis* SK2

Από τους συντελεστές RF, όπως φαίνονται στο Διάγραμμα 5, συμπεραίνουμε ότι το δείγμα μας περιέχει μονο- και δι-ραμνολιπίδια αλλά και 2 άλλες βιοτασιενεργές ουσίες. Υπολογίστηκε η

απόκλιση του συντελεστή RF των μονο- και δι-ραμνολιπιδίων του στάνταρ δείγματος με τους αντίστοιχους συντελεστές του δείγματος BS που παράχθηκαν εργαστηριακά. Οι αποκλίσεις για τους RF των μονο- και δι-ραμνολιπιδίων του δείγματος BS ήταν 9,03% και 4,65% αντίστοιχα.

3.4 Λειτουργία βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή BS

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας της Bioengineering AG από την Ελβετία για την παραγωγή BS από το βακτήριο *A. borkumensis* SK2. Ως μέσον της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε τεχνητό θαλασσινό νερό ONR7 στο οποίο προστέθηκε θρεπτικό διάλυμα NP και ως πηγή άνθρακα HOF-2. Η πρώτη περίοδος λειτουργίας του αντιδραστήρα ήταν μία περίοδος τύπου BATCH και διήρκησε 10 ημέρες. Η διάρκεια της πρώτης περιόδου προσδιορίστηκε από το Διάγραμμα 3 από όπου προκύπτει ότι έπειτα από 10 ημέρες επώασης της καλλιέργειας επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση BS. Την ημέρα 10 αφαιρέθηκε το 60% του όγκου της καλλιέργειας από τον αντιδραστήρα και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των BS. Ο όγκος που αφαιρέθηκε αναπληρώθηκε με νέο ONR7 και θρεπτικά NP. Σκοπός του πειράματος ήταν να προσδιοριστεί ο απαιτούμενος χρόνος στον οποίο το βακτήριο θα έφτανε και πάλι την συγκέντρωση των BS στην μέγιστη τιμή. Όταν συνέβαινε αυτό, στόχος ήταν να γίνεται και πάλι εξαγωγή του 60% του όγκου της καλλιέργειας και αναπλήρωση με νέο ONR7 και NP. Έπειτα από αρκετές δειγματοληψίες, και σύμφωνα με το Διάγραμμα 6, ο χρόνος στον οποίο πρέπει να γίνεται η διαδικασία αφαίρεσης του 60% της καλλιέργειας είναι οι 6 ημέρες και η μέγιστη συγκέντρωση BS είναι 20 mg/L. Πολύ σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι μετά το πέρας των 6 ημερών, εάν δε γίνει αφαίρεση του 60% του όγκου της καλλιέργειας, η συγκέντρωση των BS μειώνεται. Σκοπός είναι λοιπόν, οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται σε συνθήκες τέτοιες που να ευνοούν την παραγωγή BS.



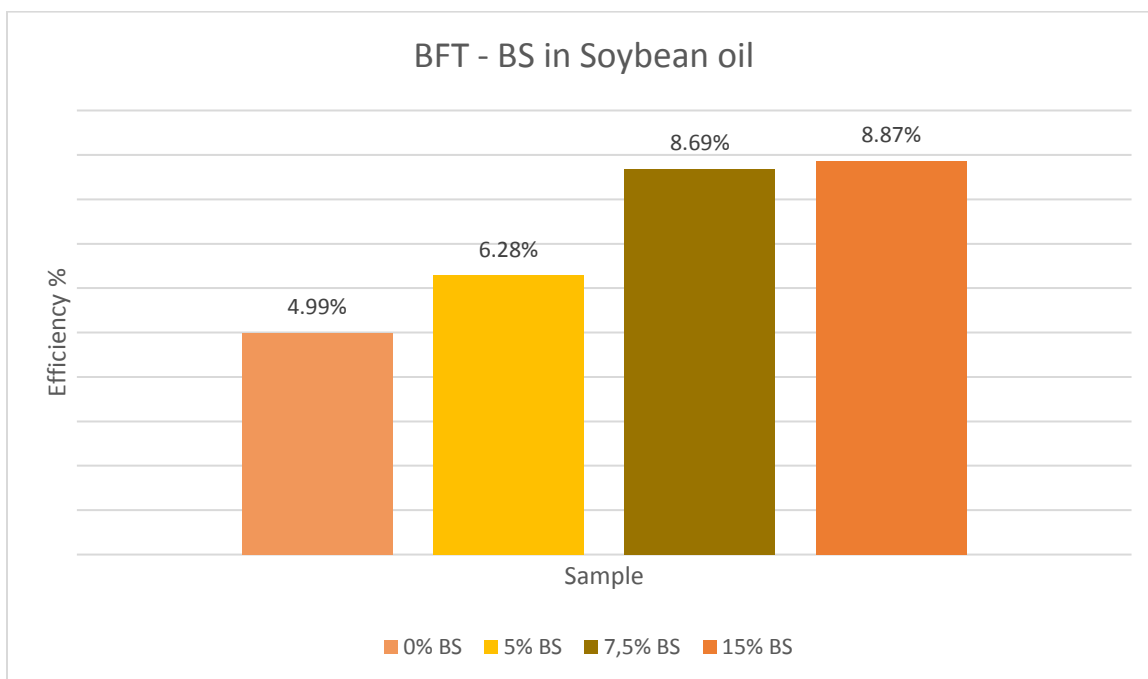
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση BS στον αντιδραστήρα συναρτήσει χρόνου¹²

3.5 Προσδιορισμός βελτίωσης της διασποράς πετρελαίου με χρήση BS

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εκτίμηση της διασποράς του αργού πετρελαίου στην υδάτινη φάση, με ή χωρίς την χρήση BS. Οι BS είχαν διαλυθεί σε σογιέλαιο για να διευκολύνεται η χρήση τους. Οι διάφορες συγκεντρώσεις BS σε σογιέλαιο που εξετάστηκαν ήταν 0%, 5%, 7,5% και 15% w/v και η ποσοστιαία αύξηση της διασποράς του πετρελαίου σε κάθε περίπτωση ήταν 0%, 25,85%, 74,85% και 77,76% αντίστοιχα (Διάγραμμα 7). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των BS αυξάνεται και η διασπορά του αργού πετρελαίου στην υδάτινη φάση.

¹ Το διάγραμμα ξεκινάει έπειτα από 10 ημέρες λειτουργίας τύπου BATCH.

² Στο διάγραμμα η καμπύλη BS mg/L αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση BS την στιγμή της κάθε δειγματοληψίας, τα σημεία Max BS mg/L αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση BS την στιγμή πριν την αφαίρεση του 60% του όγκου της καλλιέργειας στον βιοαντιδραστήρα (προσδιορίζονται αναλυτικά) και τα σημεία Min BS mg/L αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση στον βιοαντιδραστήρα ακριβώς την στιγμή μετά την προσθήκη του νέου ONR7 με NP στον βιοαντιδραστήρα (προσδιορίζεται από τον νόμο της αραιώσης).

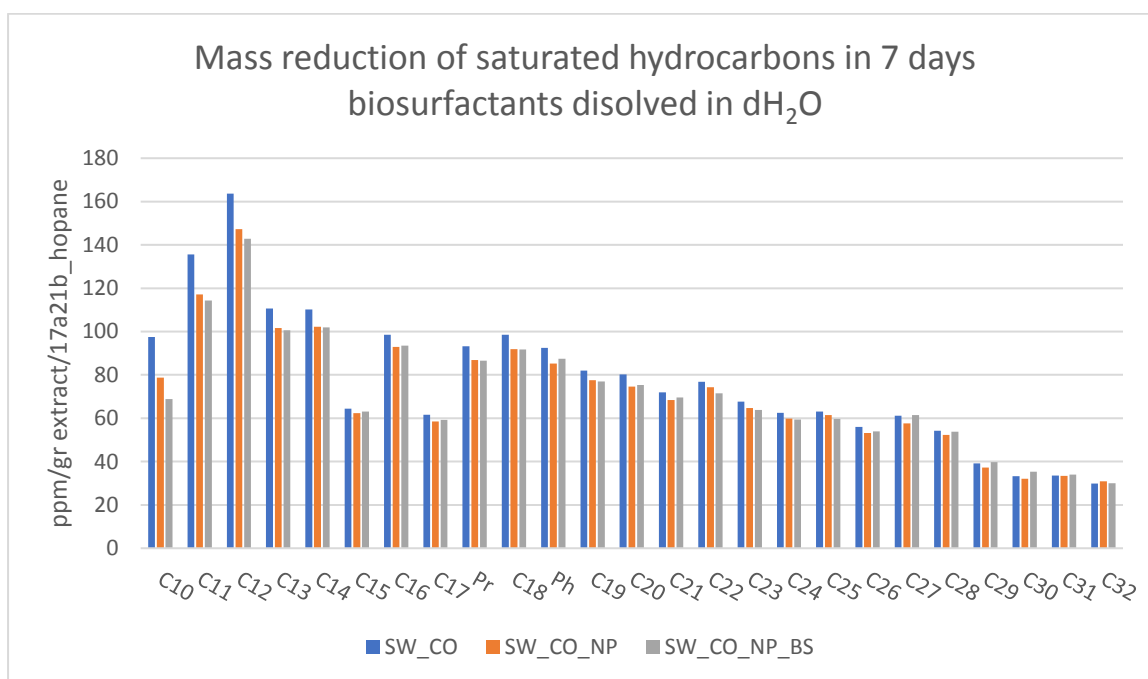


Διάγραμμα 7: BFT με BS από τον *A. borkumensis* SK2 διαλυμένες σε σογιέλαιο

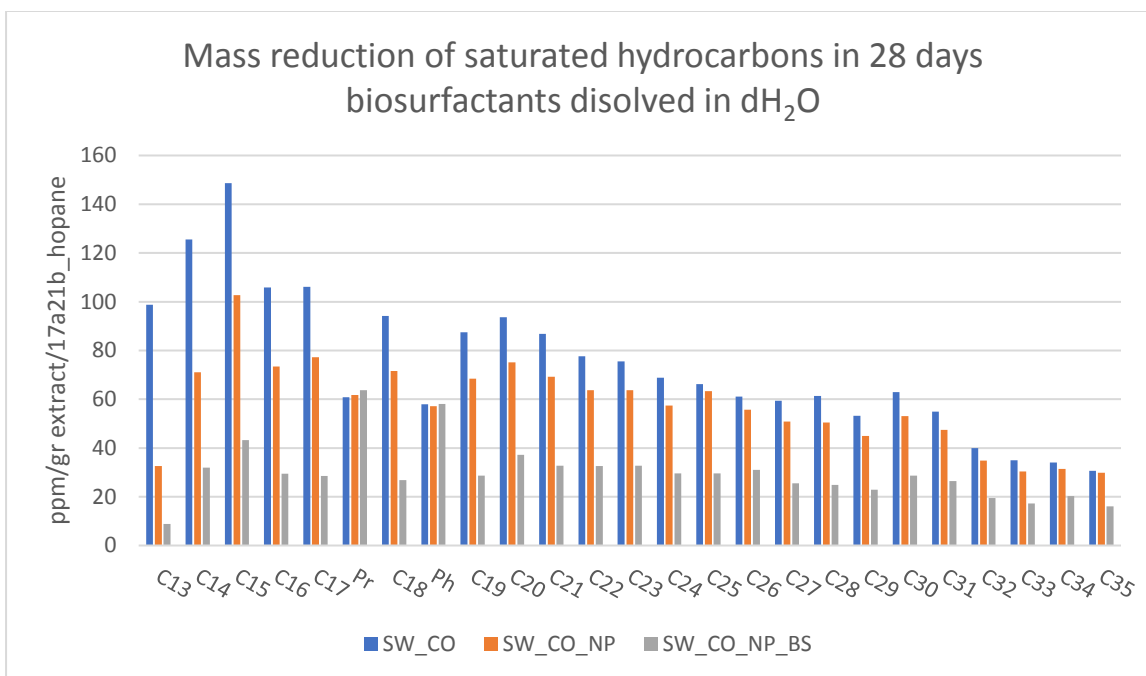
3.6 Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας BS στην βιοαποικοδόμηση αργού πετρελαίου – Βιοεξυγίανση

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε αν οι BS που παράχθηκαν στον βιοαντιδραστήρα θα ήταν αποτελεσματικές στην επιτάχυνση της αποικοδόμησης αργού πετρελαίου από γηγενής θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Για να είναι δυνατή η διαχείριση των BS, αυτές διαλυτοποιήθηκαν σε απιονισμένο νερό (0,384% w/v) και σε σογιέλαιο (15% w/v). Όπως φαίνεται στα Διάγραμμα 8 και Διάγραμμα 12, έπειτα από 7 ημέρες, η μάζα των κορεσμένων υδρογονανθράκων (είτε οι BS ήταν διαλυμένες σε νερό, είτε σε σογιέλαιο) δεν μειώθηκε, ενώ στα Διαγράμματα Διάγραμμα 9 και Διάγραμμα 13, βλέπουμε μία αισθητή μείωση της μάζας των κορεσμένων υδρογονανθράκων με το πέρας 28 ημερών και στις δύο περιπτώσεις. Όσον αφορά στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως φαίνεται στα Διαγράμματα Διάγραμμα 10, Διάγραμμα 11, Διάγραμμα 14 και Διάγραμμα 15, αυτοί δεν μειώθηκαν καθόλου καθ' όλη

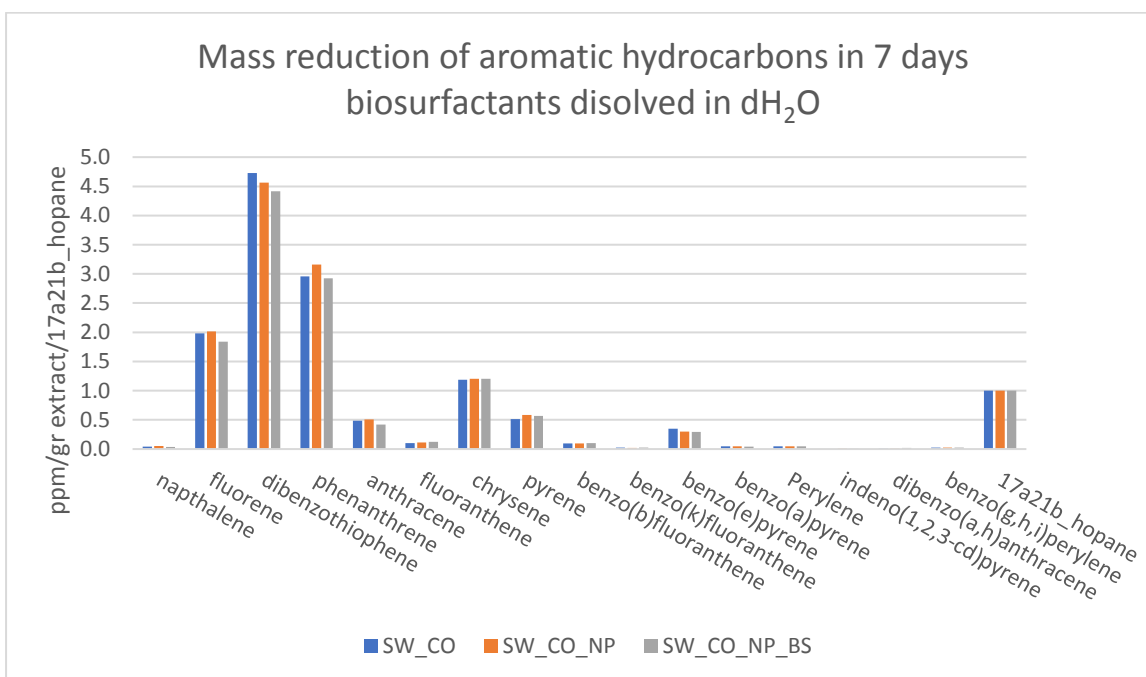
την διάρκεια του πειράματος. Τέλος, στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η σύγκριση της απόδοσης της βιοαποικοδόμησης των υδρογονανθράκων, σε σχέση με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την διαλυτοποίηση των BS. Ο μέσος όρος μείωσης της μάζας των κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες, με διαλύτη το νερό (~ 2 mg δραστική ουσία / 10 ml seawater) και το σογιέλαιο (~ 5 mg δραστική ουσία / 10 ml seawater) ήταν 52,18% και 29,45% αντίστοιχα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το σογιέλαιο, όντας μια λιπαρή ουσία, λειτουργεί ως κατασταλτικός παράγοντας στην βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων.



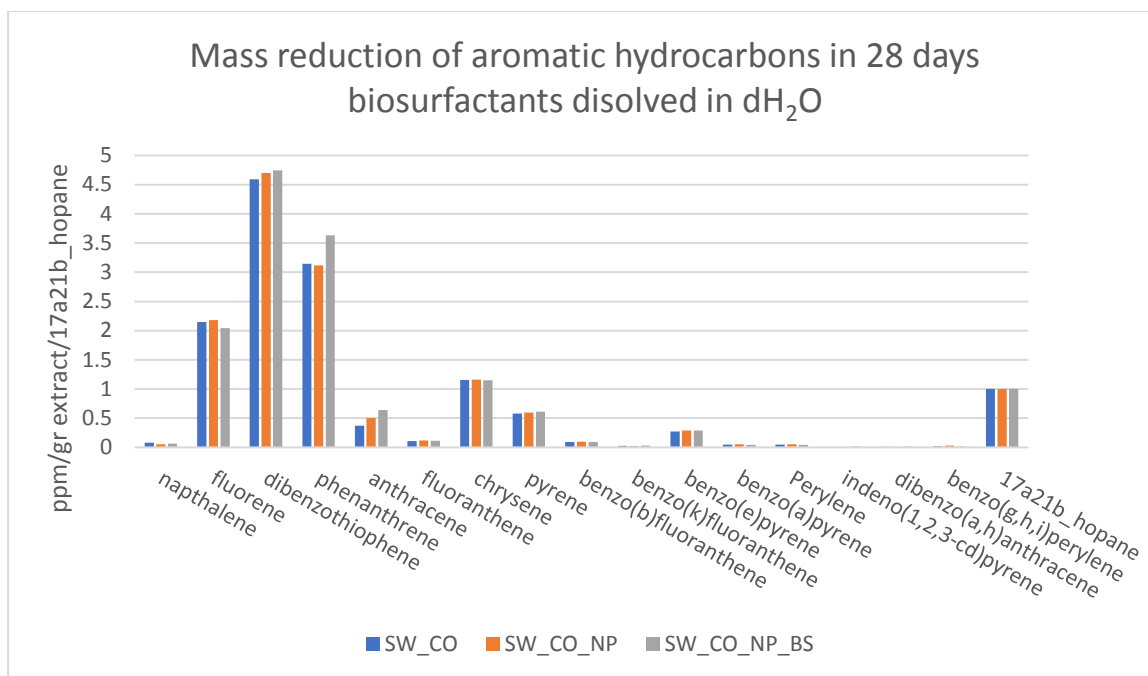
Διάγραμμα 8: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH₂O



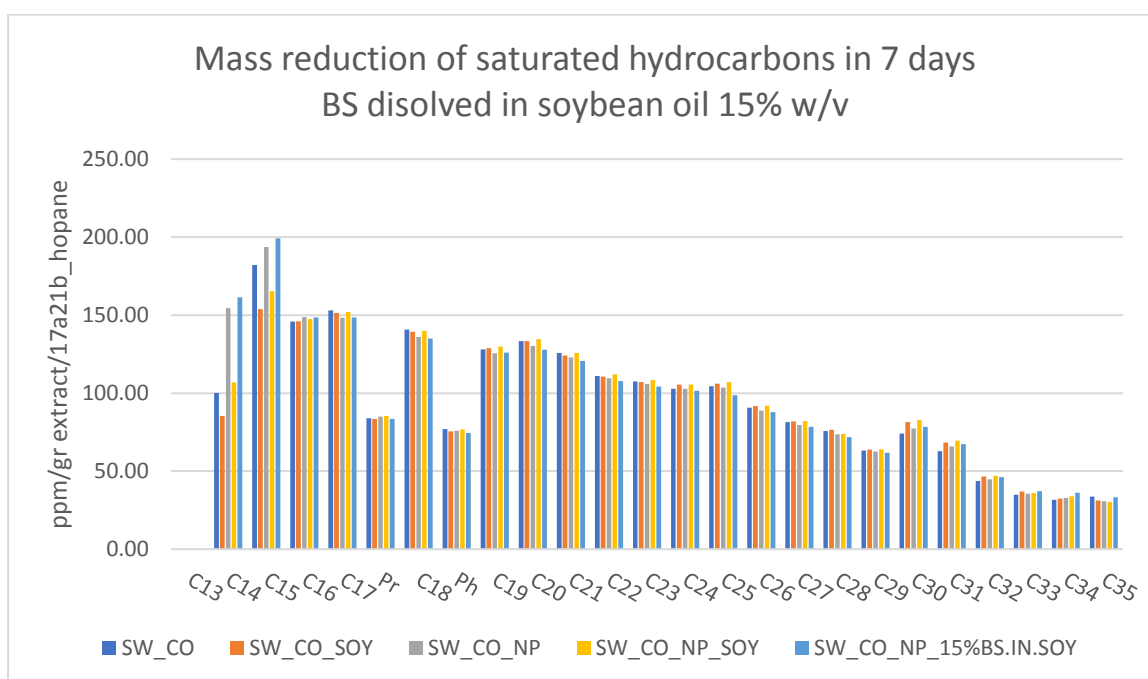
Διάγραμμα 9: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH₂O



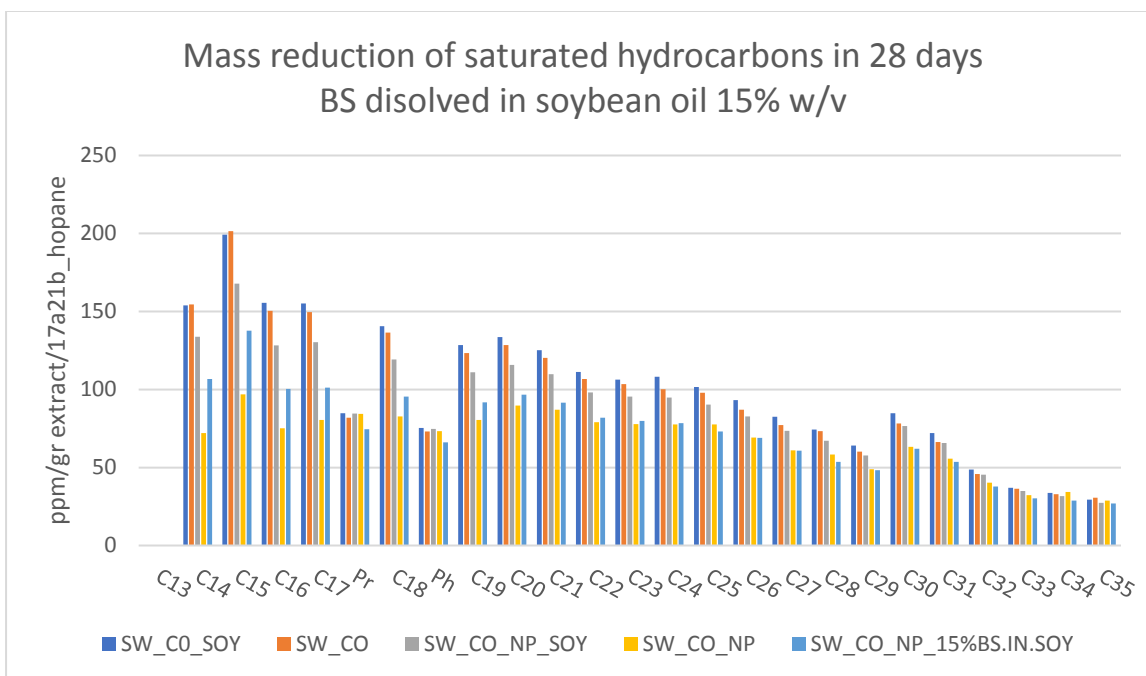
Διάγραμμα 10: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH₂O



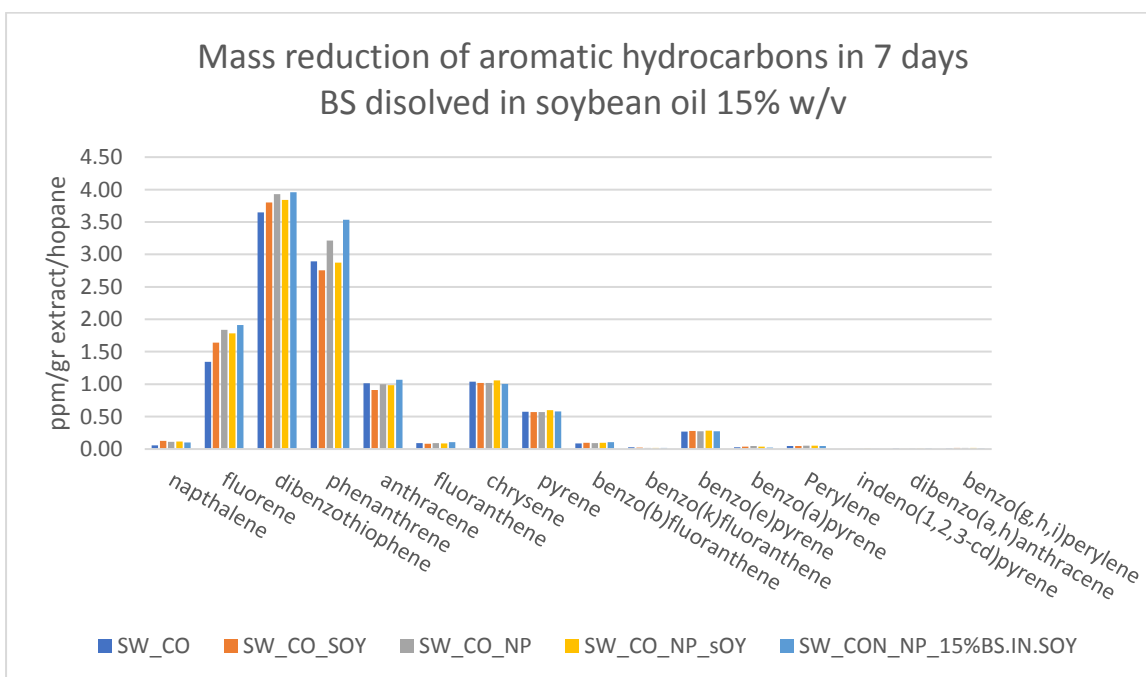
Διάγραμμα 11: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε dH₂O



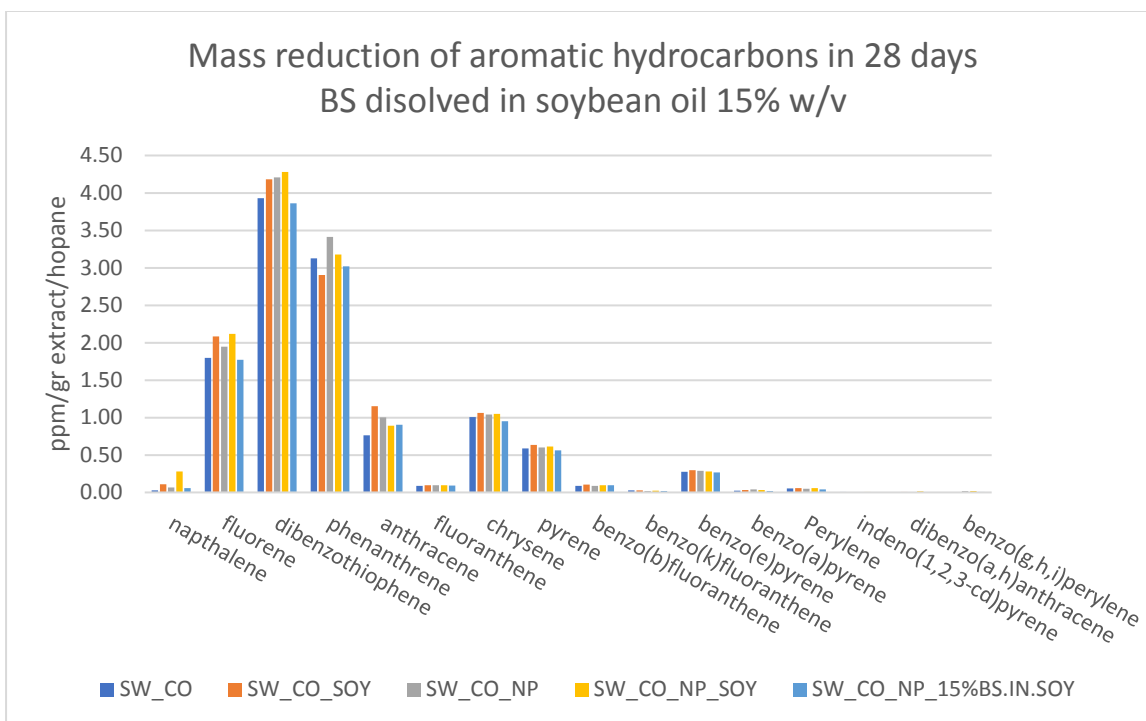
Διάγραμμα 12: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο



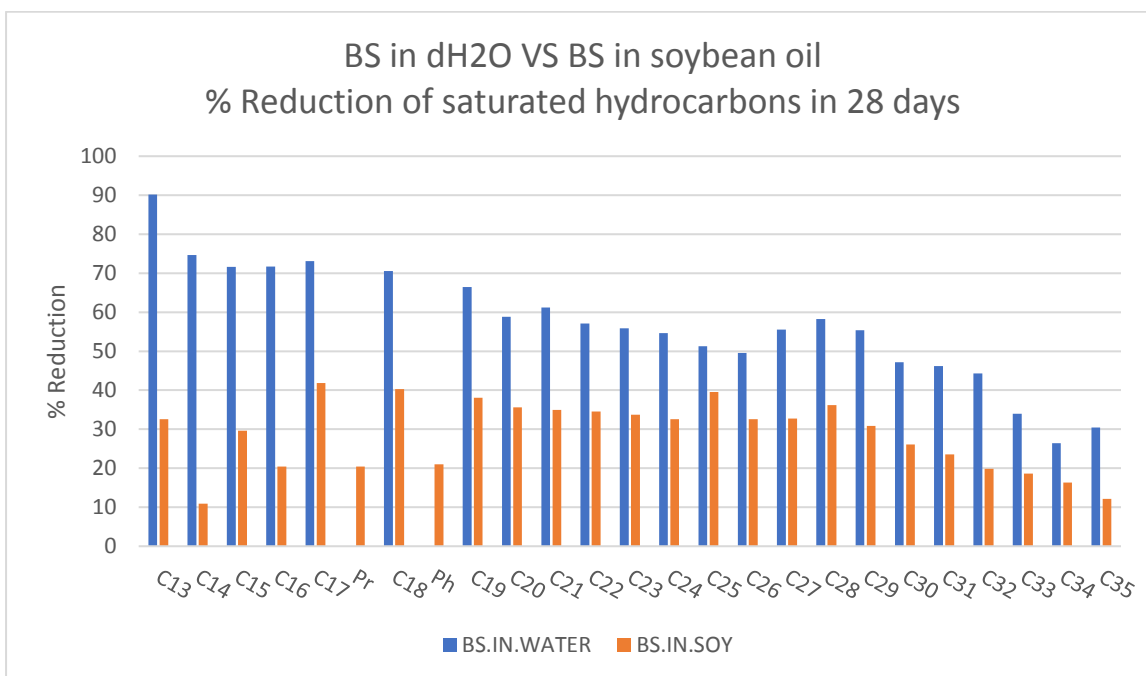
Διάγραμμα 13: Μείωση μάζας κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο



Διάγραμμα 14: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 7 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο



Διάγραμμα 15: Μείωση μάζας αρωματικών υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με διαλυμένες BS σε σογιέλαιο



Διάγραμμα 16: Ποσοστιαία μείωση κορεσμένων υδρογονανθράκων σε 28 ημέρες με BS διαλυμένες σε dH₂O και σογιέλαιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μικροοργανισμός *A. borkumensis* SK2, ως προς την δυνατότητα του να παράγει βιοτασιενεργές ουσίες με βαρέα κλάσματα αργού πετρελαίου ως πηγή άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας ώστε οι συνθήκες στην καλλιέργεια να είναι σταθερές και ώστε η κλίμακα του πειράματος να είναι μεγαλύτερη. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε δεν διαλύεται στο νερό και έτσι οι βιοτασιενεργές ουσίες απομονώνονται από την καλλιέργεια με απλή εκχύλιση. Η μέγιστη συγκέντρωση βιοτασιενεργών ουσιών στον αντιδραστήρα ήταν 20 mg/L ενώ στα προκαταρκτικά πειράματα σε ποτήρια ζέσεως ήταν 16 mg/L. Παρατηρούμε λοιπόν ότι οι συνθήκες στον αντιδραστήρα (σταθερή ροή αέρα, ανάδευση κ.ά.) αυξάνουν την παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών κατά 25%. Παρόλα αυτά, η παραγωγή που πέτυχαμε, συγκριτικά με την βιβλιογραφία, θα μπορούσε να θεωρηθεί χαμηλή. Σύμφωνα με τους Kosaric, N. et al. η *P. aeruginosa* παράγει 46 g/L ραμνολιπίδια με καλαμποκέλαιο ως πηγή άνθρακα και 122 g/L με σογιέλαιο ως πηγή άνθρακα (23). Θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι οι βιοτασιενεργές ουσίες στο πείραμά μας απομονώνονταν απευθείας από την καλλιέργεια χωρίς να υπάρχουν προσμίξεις από την πηγή άνθρακα. Αυτό έχει ως πλεονέκτημα την μείωση του χρόνου και του κόστους επεξεργασίας του προϊόντος.

Οι βιοτασιενεργές ουσίες που παράχθηκαν στο πείραμα περιείχαν μονο- και δι- ραμνολιπίδια και δύο άλλες βιοτασιενεργές ουσίες. Έγιναν κάποιες δοκιμές όσον αφορά στην ποιότητα και χρησιμότητα των βιοτασιενεργών αυτών ουσιών στην διασπορά και αποικοδόμηση αργού πετρελαίου. Για την χρήση των βιοτασιενεργών ουσιών αυτές διαλύθηκαν πρώτα σε νερό και σογιέλαιο. Οι βιοτασιενεργές ουσίες παρούσες σε νερό, ρυπασμένο από αργό πετρέλαιο, αυξάνουν την διασπορά του ρύπου στην υδάτινη φάση κατά 74,85% και 77,76% όντας διαλυμένες σε σογιέλαιο σε συγκεντρώσεις 7,5% και 15% w/v αντίστοιχα. Από τα πειράματα βιοεξυγίανσης, συμπεραίνουμε ότι οι βιοτασιενεργές ουσίες μπορούν να βελτιώσουν την αποικοδόμηση των κορεσμένων υδρογονανθράκων κατά 52,18% και 29,45% μέσα σε 28 ημέρες όταν είναι διαλυμένες σε νερό και σογιέλαιο αντίστοιχα. Σε αυτό το πείραμα

διαπιστώθηκε επίσης ότι το σογιέλαιο σε αντίθεση με το νερό, δρα ανασταλτικά στην διεργασία της βιοεξυγίανσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. SANTOS, Danyelle Khadydja F., et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. International journal of molecular sciences, 2016, 17.3: 401.
2. LIU, Guansheng, et al. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. Biotechnology and bioengineering, 2018, 115.4: 796-814.
3. RAHMAN, Pattanathu KSM; GAKPE, Edward. Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. Biotechnology, 2008.
4. PACWA-PŁOCINICZAK, Magdalena, et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. International journal of molecular sciences, 2011, 12.1: 633-654.
5. ANTONIOU, Eleftheria, et al. Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. Frontiers in microbiology, 2015, 6: 274.
6. SHETE, A. M., et al. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. 2006.
7. SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2011, 2011.1: 1-14.
8. VASSILIOU, Marius S. Historical dictionary of the petroleum industry. Scarecrow Press, 2009.
9. MONTGOMERY, Dean P.; GALL, James W.; DAVIS, Ed D. Crude oil refining. U.S. Patent No 4,565,620, 1986.
10. WAUQUIER, Jean-Pierre. Petroleum refining: crude oil, petroleum products, process flowsheets. Editions Technip, 1995.
11. Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος ΜΗΠΕΡ Βιοδιύλιστήρια-Αξιοποίηση Αποβλήτων.

12. WOODS HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTION, Natural Oil Seeps.
13. WOODS HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTION, Oil in the Ocean: A Complex Mix.
14. ITOFF, International Tanker Owners Pollution Federation.
15. CHEN, Jeff; DENISON, Michael S. The Deepwater Horizon oil spill: environmental fate of the oil and the toxicological effects on marine organisms. Horizon (indicated in red), 2011.
16. ΡΙΖΟΥ, Ευαγγελία. Προσομοίωση πετρελαιοκηλίδας στο βόρειο Αιγαίο. 2016.
17. ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ, Μαρία. Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδιασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων. Χανιά 2005.
18. ΚΟΡΚΑΚΑΚΗ Εμμανουέλα, Απομονωση μικροβιακών κοινοτήτων που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή και παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, Χανιά 2012.
19. SMYTH, T. J. P., et al. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 3705-3723.
20. BERTRAND, Brandt, et al. Statistical Design, a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production: A Review. Colloids and Interfaces, 2018, 2.3: 36.
21. ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ Μάριος, Απόδοση διασποράς του πετρελαίου σε υψηλές συνθήκες, Χανιά 2018.
22. FODELIANAKIS, S, et al. "Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome." Journal of hazardous materials 287 (2015): 78-86.
23. KOSARIC, Naim; SUKAN, Fazilet Vardar. Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics. CRC Press, 2014.