



**Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ
ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ
ΜΑΡΙΑΝΝΑΣ ΠΑΛΑΤΣΙΔΟΥ**

Χανιά, Οκτώβριος 2020



**Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής
και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ
ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΗΣ

ΜΑΡΙΑΝΝΑΣ ΠΑΛΑΤΣΙΔΟΥ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής (επιβλέπων)
Ευαγγελία Γοντικάκη, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής
Ελευθερία Αντωνίου, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Ευχαριστίες

Με την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την άριστη συνεργασία αλλά και για την επιλογή του θέματός μου, καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Δρ. Ευαγγελία Γοντικάκη για την ουσιαστική καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για τις συμβουλές της τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες επίσης στην Δρ. Ελευθερία Αντωνίου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, για την συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή.

Επιπλέον, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για το άψογο πνεύμα συνεργασίας που διατηρούν εντός του εργαστηρίου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως το συμφοιτητή μου Κωνσταντίνο Τσαμουτσόγλου για την απεριόριστη συμπαράσταση, τη βοήθεια αλλά και τη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και από την αρχή των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στους γονείς μου και στον αδερφό μου και να τους ευχαριστήσω που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν ανελλιπώς σε όλες τις επιλογές και τις προσπάθειές μου.

Περίληψη

Το πετρέλαιο, αποτελεί μέχρι και σήμερα τη σπουδαιότερη φυσική πηγή ενέργειας και από την παραγωγή του εξαρτάται το παρόν και το μέλλον της παγκόσμιας οικονομίας. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταγραφεί χιλιάδες ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων που προκάλεσαν τεράστιες οικολογικές καταστροφές εξαιτίας των μεγάλων ποσοτήτων πετρελαίου που απελευθερώθηκαν.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης σε κοινότητες βαθιών και επιφανειακών νερών της Ανατολικής Μεσογείου κατά την αποικοδόμηση υδρογονανθράκων.

Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν δείγματα από βαθιά (1500m βάθος) και επιφανειακά νερά από το Κουφονήσι Λασιθίου και μελετήθηκαν 3 διαφορετικές περιπτώσεις, μια καλλιέργεια βαθιών νερών στους 25°C, μια καλλιέργεια βαθιών νερών στους 14°C και μια καλλιέργεια επιφανειακών νερών στους 25°C. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν συνολικά δυο εμπλουτισμοί για τις 3 αυτές περιπτώσεις κι έπειτα δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες πειράματος με θρεπτικό μέσο ONR7 και αργό πετρέλαιο (DEEP25, DEEP14 και SURF25). Η εξέλιξη τους παρακολουθούνταν για συνολικά 50 ημέρες και μετρούταν η τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 600nm, ώστε να καταγραφεί η καμπύλη ανάπτυξης για κάθε κοινότητα. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες με τους απομονωμένους μικροοργανισμούς Espa, Y, Yac, K και τη μικροβιακή κοινότητα E8, από περιοχή χρόνια ρυπασμένη με πετρελαιοειδή, ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τέλος, οι καλλιέργειες εξετάζονταν για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα με τρεις διαφορετικούς τρόπους, το oil spreading test, το emulsification test και το drop collapse test.

Βάσει των καμπυλών ανάπτυξης για τις μικροβιακές κοινότητες, διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια SURF25 δεν παρουσιάζει αύξηση της ανάπτυξής της και οι τιμές οπτικής απορρόφησης είναι σχετικά σταθερές και κυμαίνονται μεταξύ 0.3-0.5. Η καλλιέργεια DEEP25 εμφανίζει αυξομειώσεις και στις 18 μέρες σταθεροποιείται σε οπτική απορρόφηση περίπου 0.3. Τέλος, η καλλιέργεια DEEP14 παρουσιάζει χαμηλές τιμές οπτικής απορρόφησης και η καμπύλη ανάπτυξής της έχει μειωτικές τάσεις.

Τα αποτελέσματα των test για τις κοινότητες SURF25, DEEP14 και DEEP25 δεν έδειξαν ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών. Το oil spreading test και το drop collapse test παρουσίασαν αρνητικά αποτελέσματα, ενώ στο emulsification test παρατηρήθηκαν ενδείξεις ύπαρξης επιφανειοδραστικών ουσιών με την κοινότητα DEEP14 να παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα.

Οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί και η κοινότητα E8 παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις καλλιέργειες SURF25, DEEP14 και DEEP25 και οι καμπύλες ανάπτυξης τους ήταν αυξητικές με την κοινότητα E8 να έχει την καλύτερη εικόνα. Τέλος, όσον αφορά τα test, το emulsification test έδειξε ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς K και Espa, ο μικροοργανισμός Y παρουσίασε ενδείξεις ύπαρξης επιφανειοδραστικών ουσιών, ενώ ο μικροοργανισμός Yac είχε αρνητικά αποτελέσματα.

Abstract

Oil has become the world's most important source of energy and the present and future of the world economy depends on its production. However, in recent decades, thousands of oil spill accidents have been recorded that have caused huge ecological disasters due to the large amounts of oil released.

The scope of this thesis was the growth and biosurfactant production of hydrocarbon-degrading consortia of deep and surface water from the Eastern Mediterranean.

Specifically, were collected samples from depth (1500m depth) and surface water from Koufonisi Lassithi and 3 different cases were studied, consortia of deep water at 25°C, consortia of deep water at 14°C and consortia of surface water at 25°C. Initially, a total of two enrichments were performed for these 3 cases and then experimental cultures with nutrient ONR7 and crude oil were created (DEEP25, DEEP14 and SURF25). Their evolution was monitored for 50 days and the value of optical absorption was measured at 600nm so the growth curve for each community to be formed. At the same time, same cultures were developed with the isolated microorganisms Espa, Y, Yac, K and the microbial community E8, from a chronically polluted area with petroleum products, in order to compare the results. Finally, the cultures were tested for biosurfactants at specified intervals in three different ways, the oil spreading test, the emulsification test and the drop collapse test.

Based on the growth curves for microbial communities, it was found that the SURF25 consortia does not show an increase in its development and the values of optical absorption are relatively stable and range between 0.3-0.5. The DEEP25 consortia shows fluctuations and at 18 days stabilizes at optical absorption of approximately 0.3. Finally, the DEEP14 consortia has low optical absorption values and the growth curve has decreasing trends.

Test results for consortia of SURF25, DEEP14 and DEEP25 did not show presence of biosurfactants. The oil spreading test and the drop collapse test showed negative results, while the emulsification test showed evidence of biosurfactants with the DEEP14 consortia showing the best results.

Isolated microorganisms and the E8 community showed better results than the SURF25, DEEP14 and DEEP25 consortia and their growth curves were increasing, with the E8 community having the best picture. Finally, as regards the tests, the emulsification test showed the presence of biosurfactants for the microorganisms K and Espa, the microorganism Y showed evidence of presence of biosurfactants, while the microorganism Yac had negative results.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	iv
Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα.....	vii
Κατάλογος εικόνων	ix
Κατάλογος Πινάκων	x
Κατάλογος Διαγραμμάτων	xi
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Υπόβαθρο	1
1.1 Πετρέλαιο	1
1.1.1 Η ιστορία του πετρελαίου	1
1.1.2 Ιδιότητες πετρελαιοκηλίδων	1
1.2 Ρύπανση περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή.....	2
1.2.1 Πηγές ρύπανσης.....	2
1.2.2 Ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων και μόλυνση θαλασσών από πετρελαιοειδή	3
1.2.3 Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου.....	6
1.2.4 Επιπτώσεις ρύπανσης περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή	9
1.2.5 Εξάπλωση πετρελαίου στις ακτές	11
1.3 Τεχνικές Απορρύπανσης.....	12
1.3.1 Προσθήκη χημικών διασκορπιστικών (Chemical dispersants).....	12
1.3.2 Περιορισμός και ανάκτηση επιπλέοντος πετρελαίου (booming and skimming).....	13
1.3.3 Ανάφλεξη στην ανοικτή θάλασσα (In situ burning).....	14
1.4 Η βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων	14
1.4.1 Μορφές Βιοεξυγίανσης.....	15
1.4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης ως μέθοδο απορρύπανσης	15
1.5 Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου.....	16

1.6 Επιφανειοδραστικές / Τασιενεργές Ενώσεις.....	16
1.6.1 Επιφανειοδραστικές/Τασιενεργές ενώσεις βιολογικής προέλευσης	17
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1 Δειγματοληψία	19
2.2 Εμπλουτισμός καλλιεργειών και φύλαξη σε γλυκερόλη.....	19
2.3 Πείραμα	21
2.3.1 Καλλιέργειες πειράματος.....	21
2.3.2 Μελέτη απομονωμένων μικροοργανισμών	21
2.3.3 Biosurfactant tests	24
Drop Collapse Test	24
Emulsification Test	24
Oil Spreading Test	24
2.4 Μέθοδος οπτικής πυκνότητας	25
2.4.1 Sonication	27
2.4.2 Φυγοκέντρωση (Centrifugation).....	27
2.5 Διαλύματα πειράματος.....	29
2.5.1 Αργό πετρελαίο	29
2.5.2 Παρασκευή διαλύματος ONR7.....	29
2.5.3 Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS).....	30
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	31
3.1 Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων	31
3.2 Καμπύλες ανάπτυξης απομονωμένων μικροοργανισμών.....	35
3.3 Biosurfactant tests	36
3.3.1 Drop Collapse Test	36
3.3.2 Emulsification test	37
3.3.3 Oil spreading test	44
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση- Συμπεράσματα	47
Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία	49
Κεφάλαιο 6: Παράρτημα - Πίνακες Μετρήσεων.....	53

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.1 - Ατύχημα Exxon Valdez (Modeva, 2016).	4
Εικόνα 1.2 - Ατύχημα Deepwater Horizon (Greenpeace, 2015).....	5
Εικόνα 1.3 - Γραφική αναπαράσταση του ατυχήματος Deepwater Horizon (Atlas & Hazen, 2011).	6
Εικόνα 1.4 - Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου (Daling, et al., 1997).	6
Εικόνα 1.5 - Η πορεία μιας μέσης πετρελαιοκηλίδας στο νερό (IPECA, 1991).	7
Εικόνα 1.6 - Επιπτώσεις πετρελαίου στα θαλαστικά (Μπορμπουδάκης, 2016).....	10
Εικόνα 1.7 - Θαλασσοπούλι καλυμμένο με πετρέλαιο (Κολοβού, 2015).	10
Εικόνα 1.8 - Σπρέι χημικών από πλοιάρια ή από αεροπλάνα/ελικόπτερα (Καλογεράκης, 2013).	12
Εικόνα 1.9 - Περιορισμός επιπλέοντος πετρελαίου αριστερά και δεξιά Booms για χρήση πλησίον των ακτών (Καλογεράκης, 2013).....	13
Εικόνα 1.10 - Ανάφλεξη στην ανοικτή θάλασσα (Καλογεράκης, 2013).....	14
Εικόνα 2.1 - Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτομέτρου ορατού και υπεριώδους (UV-VIS) (Ψυλλάκη , 2014).	26
Εικόνα 2.2 - Σχηματική αναπαράσταση μηχανικής ανάδευσης-sonication (Wen, et al., 2018).....	27
Εικόνα 2.3 - Επιτραπέζιος κάθετος φυγοκεντρητής.	28
Εικόνα 2.4 - Αναπαράσταση διαδικασίας φυγοκέντρωσης (Dwight Powell, 2016).	29
Εικόνα 3.1 – Drop collapse test για τη μικροβιακή κοινότητα E8 την 12η μέρα μαζί με θετικό και αρνητικό έλεγχο.....	37
Εικόνα 3.2 – Emulsification test στους απομονωμένους μικροοργανισμούς τη 12η μέρα.	39
Εικόνα 3.3 – Emulsification test στον απομονωμένο μικροοργανισμό Esra την 24η μέρα.	40
Εικόνα 3.4 – Emulsification test στον απομονωμένο μικροοργανισμό K την 24η μέρα.	40
Εικόνα 3.5 – Emulsification test στην καλλιέργεια επιφανειακών νερών την 7η μέρα (μετά από 24h).....	42
Εικόνα 3.6 – Emulsification test στην καλλιέργεια βαθιών νερών..... στους 25°C την 7η μέρα (μετά από 24h).	42
Εικόνα 3.7 – Emulsification test στην καλλιέργεια βαθιών νερών..... στους 14°C την 7η μέρα (μετά από 24h).	43
Εικόνα 3.8 – Oil Spreading Test για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού Triton-X.....	45

Εικόνα 3.9 – Oil spreading test για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone.....	46
---	----

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 - Τα μεγαλύτερα ατυχήματα πετρελαιοφόρων στον κόσμο (ITOPF, 2019).	3
Πίνακας 1.2 - Κατάταξη ακτών με βάση τις επιπτώσεις για τη χλωρίδα και την πανίδα των θαλάσσιων ακτών (NOAA & API, 1994).	11
Πίνακας 1.3 - Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα (Kosaric & Sukan, 2014).	18
Πίνακας 2.1 - Ημέρες πραγματοποίησης μετρήσεων για την κοινότητα E8 και τους απομονωμένους μικροοργανισμούς Esp, Y, Yac, K.	23
Πίνακας 2.2 – Ημέρες πραγματοποίησης μετρήσεων για τις καλλιέργειες βαθιών και επιφανειακών νερών, SURF25, DEEP14, DEEP25.	23
Πίνακας 3.1 – Υπόμνημα αποτύπωσης αποτελεσμάτων του Emulsification test.	40
Πίνακας 3.2 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για την κοινότητα E8.	41
Πίνακας 3.3 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για την κοινότητα E8.	41
Πίνακας 3.4 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Esp, Y, Yac.	41
Πίνακας 3.5 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Esp, Y, Yac.	41
Πίνακας 3.6 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για τις κοινότητες SURF25, DEEP25, DEEP 14.....	43
Πίνακας 3.7 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για τις κοινότητες SURF25, DEEP25, DEEP 14.....	44
Πίνακας 6.1-Απορρόφηση της μικροβιακής κοινότητας E8 και των απομονωμένων μικροοργανισμών K, Esp, Y, Yac.	53
Πίνακας 6.2 -Απορρόφηση (OD) των μικροβιακών κοινοτήτων από βαθιά και επιφανειακά νερά.....	53
Πίνακας 6.3 – Emulsification test after 1 min για την κοινότητα E8.....	54
Πίνακας 6.4 – Emulsification test after 24h για την κοινότητα E8.	54
Πίνακας 6.5 – Emulsification test after 1 min για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Esp, Y, Yac.....	54
Πίνακας 6.6 – Emulsification test after 24h για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Esp, Y, Yac.....	54
Πίνακας 6.7 – Emulsification test after 1 min για τις κοινότητες των βαθιών και επιφανειακών νερών.....	55

Πίνακας 6.8 – Emulsification test after 24h για τις κοινότητες των βαθιών και επιφανειακών νερών.	55
Πίνακας 6.9 – Ύψος γαλακτώματος στο emulsification test για διαφορετικές αραιώσεις του oil begone.	55
Πίνακας 6.10 – Διάμετρος ζώνης χωρίς πετρέλαιο στο oil spreading test για διαφορετικές αραιώσεις του Triton-X.....	56

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1.1 - Πηγές θαλάσσιας ρύπανσης (Αλεξόπουλος, 2009).	3
Διάγραμμα 2.1 - Σύσταση μικροβιακής κοινότητας E8 (Antonίου, et al., 2015).	22
Διάγραμμα 3.1 - Καμπύλες ανάπτυξης καλλιιεργειών επιφανειακών νερών στους 25°C. .	32
Διάγραμμα 3.2 - Καμπύλες ανάπτυξης καλλιιεργειών βαθιών νερών.....	32
στοις 25°C.....	32
Διάγραμμα 3.3 - Καμπύλες ανάπτυξης καλλιιεργειών βαθιών νερών στουις 14°C.....	33
Διάγραμμα 3.4 – Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακής κοινότητας E8.	34
Διάγραμμα 3.5 - Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων επιφανειακών και βαθιών νερών και κοινότητας E8.	35
Διάγραμμα 3.6 - Καμπύλες ανάπτυξης απομονωμένων μικροοργανισμών Esra, K, Y, Yac.	36
Διάγραμμα 3.7 – Ύψος γαλακτώματος για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone.	38
Διάγραμμα 3.8 - Διάμετρος ζώνης χωρίς πετρέλαιο για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού Triton-X.....	45

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Υπόβαθρο

1.1 Πετρέλαιο

1.1.1 Η ιστορία του πετρελαίου

Το πετρέλαιο, που αποκαλείται στην καθημερινή γλώσσα και μαύρος χρυσός, είναι παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα, που αποτελεί μέχρι και σήμερα τη σπουδαιότερη φυσική πηγή ενέργειας. Η ονομασία του προέρχεται από τα ελληνικά πέτρα και έλαιο, «λάδι της πέτρας». Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο είναι υγρό πέτρωμα, μείγμα υδρογονανθράκων, δηλαδή ουσιών που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο, κατά ένα μεγάλο μέρος της σειράς των αλκανίων, που όμως περιέχει και αρκετούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, καθώς και άλλες οργανικές ενώσεις. Το αργό πετρέλαιο βρίσκεται μέσα σε πορώδη πετρώματα στα ανώτερα στρώματα μερικών περιοχών του φλοιού της Γης (Καρώνης, et al., 2007).

Μέχρι τις αρχές του 19^{ου} αιώνα η χρήση του φωτιστικού πετρελαίου στις ΗΠΑ βρισκόταν στο ίδιο επίπεδο που την είχαν αφήσει οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι. Η πρώτη γεώτρηση ειδικά για την αναζήτηση πετρελαίου έγινε από τον Έντγουιν Ντρέικ στην δυτική Πενσυλβάνια τον Αύγουστο του 1859 σε βάθος 21 μέτρων. Έτσι, άνοιξε τον δρόμο στη βιομηχανία του πετρελαίου ενώ την ίδια περίπου περίοδο πετρελαϊκά πεδία ανακαλύφθηκαν στην Ευρώπη και την Άπω Ανατολή. Με την αρχή του 20ου αιώνα η Βιομηχανική Επανάσταση είχε προχωρήσει τόσο πολύ που το επεξεργασμένο πετρέλαιο για φωτιστική χρήση έπαυε να έχει την πρώτη σημασία και η πετρελαϊκή βιομηχανία έγινε η πρώτη πηγή ενέργειας στον κόσμο. Έτσι, ενώ το 1870 η παγκόσμια παραγωγή πετρελαίου ήταν μικρότερη από 1 εκατομμύριο τόνους το χρόνο, τα επόμενα χρόνια ξεπέρασε τους 3 δισεκατομμύρια τόνους. Σήμερα το πετρέλαιο αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη στην βιομηχανία των πετροχημικών, αλλά την μεγαλύτερη εφαρμογή βρίσκει στην παραγωγή ενέργειας, από την οποία εξαρτάται το παρόν και το μέλλον της παγκόσμιας οικονομίας (Καζαντζής, 2017).

1.1.2 Ιδιότητες πετρελαιοκηλίδων

Η διαφορετικότητα της σύστασης του πετρελαίου επηρεάζει τις φυσικές του ιδιότητες, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα κάθε πετρέλαιο να είναι μοναδικό όσον αφορά τη σύσταση και τις ιδιότητές του. Για την εξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων οι πληροφορίες αυτές είναι καθοριστικές για τον τρόπο αντιμετώπισής τους και την επιλογή της κατάλληλης τεχνολογίας με στόχο τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα.

Τα διάφορα πετρελαιοειδή μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες ` σε αυτά που δε δημιουργούν επίμονες πετρελαιοκηλίδες στην θάλασσα και διασκορπίζονται ή εξαφανίζονται από την επιφάνειά της γρήγορα, και σε αυτά που δημιουργούν επίμονες πετρελαιοκηλίδες, διαχέονται αργά και συνήθως απαιτούν άμεση επέμβαση για αντιμετώπιση και καθαρισμό (Νικολοπούλου, 2005).

Οι βασικές ιδιότητες ενός πετρελαιοειδούς που επηρεάζουν την συμπεριφορά της πετρελαιοκηλίδας στην επιφάνεια της θάλασσας αναφέρονται παρακάτω:

- Πυκνότητα: Η τυπική πυκνότητα για ένα ελαφρύ αργό πετρέλαιο είναι περίπου 0.7 g/cm^3 , ενώ για ένα βαρύ πισσώδες πετρέλαιο λίγο μεγαλύτερη από 1 g/cm^3 . Επίσης, όσον αφορά το θαλασσινό νερό, η τυπική του πυκνότητα είναι 1.03 g/cm^3 , γεγονός που σημαίνει ότι το αργό πετρέλαιο είναι σε γενικές γραμμές αραιότερο από το θαλασσινό νερό (National Research Council, et al., 1985).
- Χαρακτηριστικά απόσταξης: Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνουν πληροφορίες σχετικά με την πτητικότητα των πετρελαιοειδών. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, διαφορετικά συστατικά του πετρελαίου φτάνουν στο σημείο βρασμού τους με αποτέλεσμα να και εξατμίζονται ένα-ένα το ένα μετά το άλλο.
- Ιξώδες: Το ιξώδες είναι η ιδιότητα του ρευστού να αντιστέκεται στη ροή. Πετρελαιοειδή με υψηλό ιξώδες ρέουν με δυσκολία, σε αντίθεση με τα χαμηλού ιξώδους που έχουν υψηλή κινητικότητα. Όλα γίνονται πιο ιξώδη με τη μείωση της θερμοκρασίας (National Research Council, et al., 1985).
- Σημείο ροής: Το σημείο ροής είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία υπό την οποία το πετρέλαιο εξακολουθεί να ρέει και εξαρτάται από το περιεχόμενό του σε ασφαλτένια και κηρούς.
- Διαλυτότητα στο νερό: Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι ιδιαίτερα χαμηλή, της τάξης των 8-70 ppm σε συνήθειες θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Hamam, et al., 1988). Εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη χημική του σύσταση την αλατότητα και από άλλες ιδιότητες του νερού (National Research Council, et al., 1985).

1.2 Ρύπανση περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή

1.2.1 Πηγές ρύπανσης

Κάθε χρόνο, τα ευαίσθητα παράκτια οικοσυστήματα σε πολλά μέρη της γης καταστρέφονται από πλοία και βιομηχανίες που εκλύουν πετρέλαιο ή άλλους ρύπους στα ποτάμια και τα παράκτια ύδατα. Αλλά και οι ανοιχτές θάλασσες μολύνονται από διάφορα ορυκτέλαια που απελευθερώνονται σε αυτές. Στο διάγραμμα 1.1 παρουσιάζεται μια ποσοστιαία ανάλυση των πηγών θαλάσσιας ρύπανσης.



Διάγραμμα 1.1 - Πηγές θαλάσσιας ρύπανσης (Αλεξόπουλος, 2009).

1.2.2 Ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων και μόλυνση θαλασσών από πετρελαιοειδή

Χιλιάδες είναι τα ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων που έχουν καταγραφεί τις τελευταίες δεκαετίες σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα ατυχήματα των πετρελαιοφόρων είναι μια σημαντική πηγή ρύπανσης, η συνεισφορά της οποίας όμως μειώνεται με τα χρόνια καθώς αυξάνονται τα πρότυπα ασφαλείας αλλά και οι έλεγχοι. Παρόλο που τα περισσότερα από αυτά δεν καταλήγουν σε θαλάσσια ρύπανση, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ατυχημάτων που προκάλεσαν τεράστιες οικολογικές καταστροφές μιας και απελευθερώθηκαν τεράστιες ποσότητες πετρελαίου. Στον πίνακα 1.1 αναφέρονται τα μεγαλύτερα ατυχήματα δεξαμενόπλοιων που έχουν συμβεί σε ολόκληρο τον κόσμο από το 1967 έως το 2018 με φθίνουσα σειρά της ποσότητας πετρελαίου που απελευθερώθηκε (ITOPF, 2019).

Πίνακας 1.1 - Τα μεγαλύτερα ατυχήματα πετρελαιοφόρων στον κόσμο (ITOPF, 2019).

Position	Shipname	Year	Location	Spill size (tonnes)
1	ATLANTIC EMPRESS	1979	Off Tobago, West Indies	287,000
2	ABT SUMMER	1991	700 nautical miles off Angola	260,000
3	CASTILLO DE BELLVER	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252,000
4	AMOCO CADIZ	1978	Off Brittany, France	223,000
5	HAVEN	1991	Genoa, Italy	144,000
6	ODYSSEY	1988	700 nautical miles off Nova Scotia, Canada	132,000
7	TORREY CANYON	1967	Scilly Isles, UK	119,000
8	SEA STAR	1972	Gulf of Oman	115,000
9	SANCHI*	2018	Off Shanghai, China	113,000
10	IRENES SERENADE	1980	Navarino Bay, Greece	100,000
11	URQUIOLA	1976	La Coruna, Spain	100,000
12	HAWAIIAN PATRIOT	1977	300 nautical miles off Honolulu	95,000
13	INDEPENDENTA	1979	Bosphorus, Turkey	95,000
14	JAKOB MAERSK	1975	Oporto, Portugal	88,000
15	BRAER	1993	Shetland Islands, UK	85,000
16	AEGEAN SEA	1992	La Coruna, Spain	74,000
17	SEA EMPRESS	1996	Milford Haven, UK	72,000
18	KHARK 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	70,000
19	NOVA	1985	Off Kharg Island, Gulf of Iran	70,000
20	KATINA P	1992	Off Maputo, Mozambique	67,000
21	PRESTIGE*	2002	Off Galicia, Spain	63,000
36	EXXON VALDEZ*	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37,000
132	HEBEI SPIRIT*	2007	South Korea	11,000

- * The only spill of non-persistent oil
- + Included for comparison

Ατύχημα Exxon Valdez

Στις 24 Μαρτίου 1989 το δεξαμενόπλοιο Exxon Valdez ταξιδεύοντας από το Βαλντέζ της Αλάσκα προς Καλιφόρνια προσάραξε στην τοποθεσία Prince William Sound (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 - Ατύχημα Exxon Valdez (Modeva, 2016).

Το δεξαμενόπλοιο μετέφερε συνολικά $210,000 \text{ m}^3$ αργού πετρελαίου, ενώ η συνολική διαρροή πετρελαίου υπολογίστηκε στα $40,000 \text{ m}^3$ αργού πετρελαίου. Θεωρείται μία από τις μεγαλύτερες περιβαλλοντικές καταστροφές, καθώς η πετρελαιοκηλίδα κάλυψε 1,300 μίλια ακτής και $11,000 \text{ m}^2$ θάλασσας (Συμεωνίδης, 2009). Επίσης, αποτέλεσε τη μεγαλύτερη έκχυση πετρελαίου σε ύδατα των ΗΠΑ καθώς η περιοχή που συνέβη το ατύχημα ήταν παρθένα και περιλάμβανε ένα μεγάλο αριθμό προστατευόμενων περιοχών όπως εθνικά πάρκα και καταφύγια άγριας ζωής.

Ατύχημα Deepwater Horizon

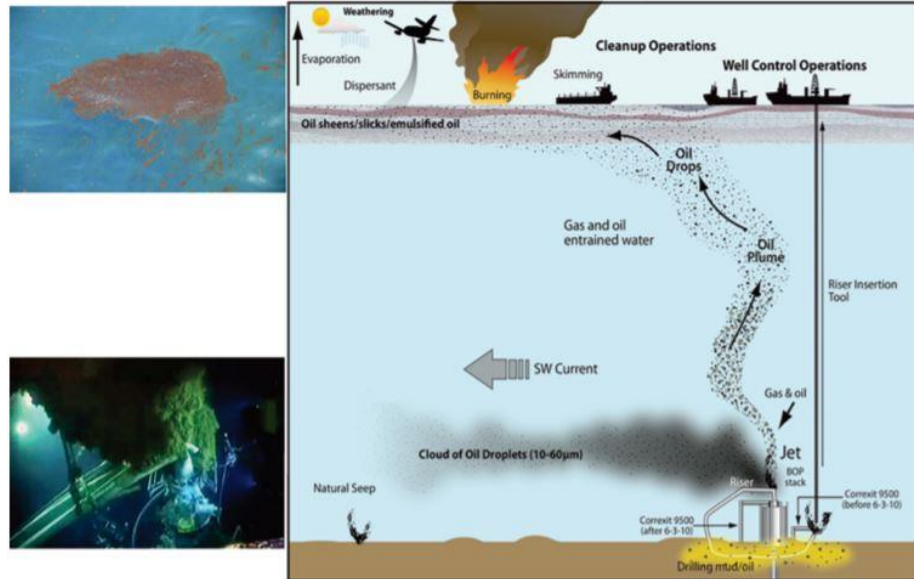
Το ατύχημα Deepwater Horizon (Εικόνα 1.2) ή αλλιώς πετρελαιοκηλίδα στον Κόλπο του Μεξικού, αποτελεί μία από τις πιο αξιοσημείωτες περιπτώσεις θαλάσσιας ρύπανσης. Προκλήθηκε από έκρηξη που έγινε στην πλατφόρμα Deepwater Horizon τον Απρίλιο του 2010 νοτιοδυτικά του ποταμού Μισισσιππή, η οποία κατέληξε σε βύθιση 1,500m δύο μέρες αργότερα. Το μεγάλο βάθος διαρροής αλλά και η συμπεριφορά του πετρελαίου υπό συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας βαθιάς θάλασσας, ήταν τα κυριότερα από τα μοναδικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου ατυχήματος. Το πιο εντυπωσιακό όμως, ήταν η δημιουργία ενός «σύννεφου υδρογονανθράκων» (hydrocarbon plume) σε βάθος 1,100m που παρέμεινε εκεί για εβδομάδες και ταξίδευε στον Κόλπο του Μεξικού ακολουθώντας θαλάσσια ρεύματα (Atlas & Hazen, 2011). Μέχρι και το 2010 που έγινε το ατύχημα, επικρατούσε η αντίληψη ότι το πετρέλαιο επιπλέει, πράγμα που όμως στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν ίσχυε. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να ξεκινήσει μια σειρά ερευνών που είχε ως στόχο να γίνει κατανοητό τι είναι αυτά τα «σύννεφα», από τι αποτελούνται, τι έκταση καταλαμβάνουν και πώς κινούνται. Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι οι ωκεανογράφοι του Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας Woods Hole (Woods Hole Oceanographic Institution, WHOI) μελετούσαν για χρόνια θερμές πηγές στο βυθό της θάλασσας, για τον

εντοπισμό των οποίων κυνηγούσαν τα ίχνη των εκλύσεων από τις πηγές που σχηματίζουν παρόμοια «σύννεφα» υγρών ουδέτερης πλευστότητας. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκαν και για τον εντοπισμό του σύννεφου των υδρογονανθράκων (WHOI, 2014).



Εικόνα 1.2 - Ατύχημα Deepwater Horizon (Greenpeace, 2015).

Το συμπέρασμα που κατέληξαν, ήταν ότι το «σύννεφο» αυτό δημιουργήθηκε λόγω της τεράστιας διαφοράς πίεσης και θερμοκρασίας μεταξύ του κοιτάσματος και του πυθμένα στα 1,500m (από 676 bars και 200°C στο κοιτάσμα στα 152 bars και <5°C στο σημείο διαρροής), που είχε σαν αποτέλεσμα την ανάβλυση του πετρελαίου υπό τη μορφή σταγονιδίων. Σταγονίδια μεγέθους >300μm είχαν θετική πλευστότητα και ανέβαιναν στην επιφάνεια, ενώ μικρότερα σταγονίδια της τάξεως μεγέθους 10–60μm είχαν ουδέτερη πλευστότητα και «παγιδεύτηκαν» στα 1,100m βάθος σχηματίζοντας το «σύννεφο». Στην Εικόνα 1.3 φαίνεται η γραφική αναπαράσταση του ατυχήματος και διακρίνεται το «σύννεφο» υδρογονανθράκων, αλλά και η άνοδος των μεγαλύτερων σταγονιδίων του πετρελαίου στην επιφάνεια όπου σχηματίστηκε η πετρελαιοκηλίδα. Με τη βοήθεια των τεχνικών που προαναφέρθηκαν, κατέστη δυνατό μέσα σε λίγες μέρες να γίνει η ακριβή οριοθέτηση του «σύννεφου», το οποίο εκτεινόταν σε μήκος 35km, πλάτος 1,6km και ύψος 180m ενώ κινούταν με ταχύτητα 6,5km/d (Atlas & Hazen, 2011) (WHOI, 2014).

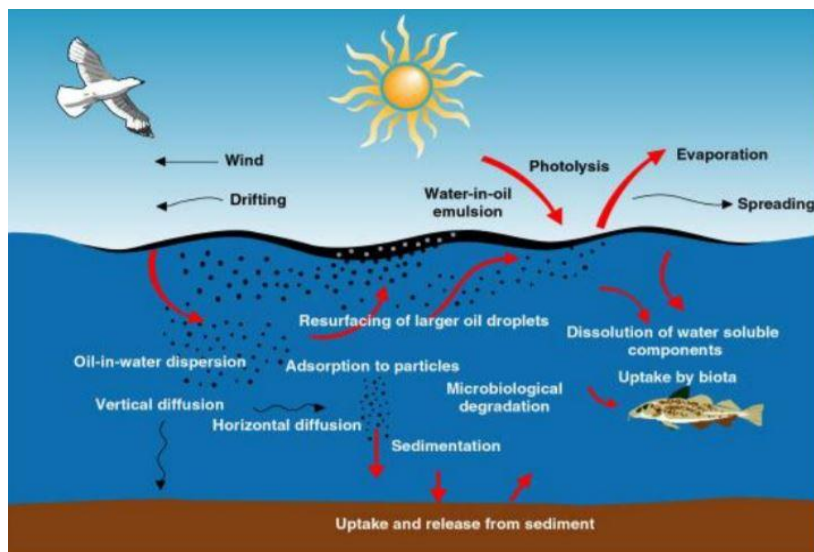


Εικόνα 1.3 - Γραφική αναπαράσταση του ατυχήματος Deepwater Horizon (Atlas & Hazen, 2011).

1.2.3 Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου

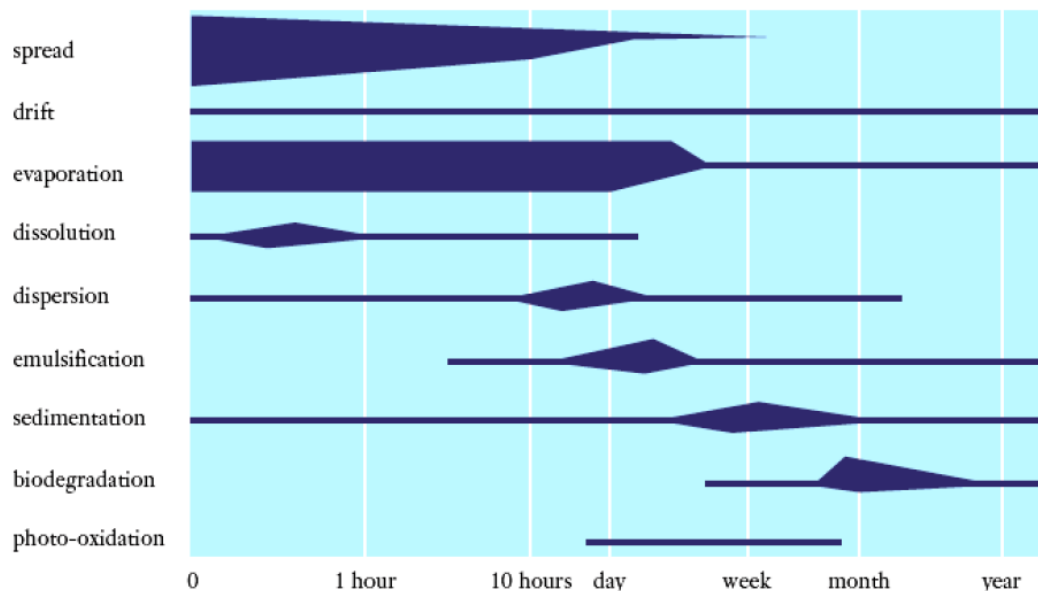
Μετά από μία διαρροή πετρελαίου τα κύρια ζητούμενα είναι η απόκτηση μιας συνολικής εικόνας της πληγείσας περιοχής, η απόκτηση σαφούς γνώσης της έκτασης που καταλαμβάνει η πετρελαιοκηλίδα και ο προσδιορισμός της διεύθυνσης στην οποία θα κινηθεί η πετρελαιοκηλίδα εφόσον είναι δυνατόν (ESA, 2020).

Αμέσως μετά τη διαρροή του αργού πετρελαίου ή προϊόντων του στο θαλάσσιο περιβάλλον ξεκινούν διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες μετασχηματισμού του, που ονομάζονται διεργασίες γήρανσης (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 - Διεργασίες γήρανσης πετρελαίου (Daling, et al., 1997).

Αυτές οι διεργασίες είναι υπεύθυνες για τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου και η δράση τους ξεκινά αμέσως μόλις το πετρέλαιο εισέλθει στο θαλάσσιο περιβάλλον (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 - Η πορεία μιας μέσης πετρελαιοκηλίδας στο νερό (IPECA, 1991).

Παρακάτω, αναλύονται οι σημαντικότερες διεργασίες γήρανσης μιας πετρελαιοκηλίδας.

- **Εξάπλωση (Spreading):** Το πετρέλαιο έχει μικρότερη πυκνότητα από το νερό και είναι δυσδιάλυτο στο νερό. Έτσι, αμέσως μόλις εκχυθεί στη θάλασσα εξαπλώνεται (spreading) στην επιφάνεια του νερού και δημιουργεί ένα λεπτό υμένιο, δηλαδή μια πετρελαιοκηλίδα. Ο ρυθμός εξάπλωσης και το πάχος της πετρελαιοκηλίδας εξαρτώνται από τη θερμοκρασία της θάλασσας και τη φύση του πετρελαίου. Ένα ελαφρύ πετρέλαιο θα εξαπλωθεί γρηγορότερα και θα σχηματίσει λεπτότερο στρώμα σε σύγκριση με ένα βαρύ πετρέλαιο. Η αύξηση της θερμοκρασίας της θάλασσας έχει ως αποτέλεσμα τη γρηγορότερη εξάπλωση και τον σχηματισμό λεπτότερου υμενίου. Υπολογίζεται ότι 1tn περσικού αργού πετρελαίου σχηματίζει μέσα σε 10min κηλίδα πάχους 0,1mm και διαμέτρου 48m (Κότρικλα, 2015).
- **Εξάτμιση (Evaporation):** Η σύσταση της πετρελαιοκηλίδας αλλάζει συνεχώς από τη στιγμή της διαρροής. Τα ελαφρά (μικρού μοριακού βάρους) κλάσματα εξατμίζονται γρήγορα και συγκεκριμένα τις πρώτες ώρες ή μέρες ενός ατυχήματος. Οι ρυθμοί εξάτμισης εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, την ταχύτητα του ανέμου, την ηλιακή ακτινοβολία, το πάχος της κηλίδας και τη φύση του πετρελαίου. Έτσι, οι υψηλές θερμοκρασίες και ο δυνατός άνεμος ευνοούν την εξάτμιση. Επίσης, όσο μικρότερο είναι το πάχος της πετρελαιοκηλίδας τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η εξάτμιση, καθώς είναι επιφανειακό φαινόμενο. Τέλος ο ρυθμός εξάτμισης αυξάνεται επίσης και από την

ύπαρξη ισχυρών ανέμων και κυματισμών (Clark, et al., 2002).

- Διάλυση (Dissolution): Η διαλυτότητα των συστατικών του πετρελαίου στο νερό είναι πολύ μικρή κι επομένως μόνο ένα μικρό ποσοστό του πετρελαίου, κυρίως των συστατικών με μικρό μοριακό βάρος, διαλύεται στο θαλασσινό νερό. Επειδή τα κλάσματα του πετρελαίου με μικρό μοριακό βάρος είναι παράλληλα πτητικές ενώσεις, η εξάτμιση και η διάλυση είναι ανταγωνιστικές διαδικασίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις η εξάτμιση είναι πολύ σημαντικότερη της διάλυσης. Η διάλυση γίνεται σημαντική σε περιπτώσεις χαμηλών θερμοκρασιών και ανατάραξης των νερών με δημιουργία τύρβης (Clark, et al., 2002).
- Γαλακτωματοποίηση (Emulsification): Πολλά πετρέλαια απορροφούν νερό και σχηματίζουν γαλακτώματα νερού σε πετρέλαιο, με αποτέλεσμα να έχουμε αύξηση του όγκου της πετρελαιοκηλίδας κατά πέντε φορές. Τα γαλακτώματα σχηματίζονται ευκολότερα όταν η συγκέντρωση νικελίου/βαναδίου στο πετρέλαιο ξεπερνά συνδυαστικά τα 15 ppm ή όταν το πετρέλαιο περιέχει ασφαλένια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 0,5%. Η παρουσία των συστατικών αυτών σε συνδυασμό με ανέμους μεγαλύτερους των 3 μποφόρ καθορίζουν τον ρυθμό δημιουργίας του γαλακτώματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το γαλάκτωμα που σχηματίζεται είναι πολύ πιο επίμονο από το αρχικό πετρέλαιο και έχει μεγαλύτερο ιξώδες. Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων νερού σε πετρέλαιο επιβραδύνει άλλες διεργασίες μετασχηματισμού του πετρελαίου και αποτελεί τον κύριο λόγο παραμονής των ελαφριών και μεσαίων πετρελαίων ανέπαφων στη θάλασσα και στις ακτές (ITOPF, 2011a).
- Διασπορά (Dispersion): Τα κύματα και οι διάφοροι στροβιλισμοί στην επιφάνεια της θάλασσας παρέχουν την απαιτούμενη μηχανική ενέργεια ώστε να σπάσει η πετρελαιοκηλίδα σε μικρά σταγονίδια πετρελαίου. Τα μεγάλα σταγονίδια επανέρχονται στην επιφάνεια της θάλασσας όπου είτε συσσωματώνονται με άλλα και δημιουργούν ξανά πετρελαιοκηλίδες, είτε εξαπλώνονται δημιουργώντας φιλμ. Από την άλλη τα μικρά σταγονίδια, που έχουν διάμετρο μικρότερη από 70 μm περίπου, παραμένουν ευκολότερα σε αιώρηση στη στήλη του νερού και ξεκινά η βιοδιάσπαση και η καθίζηση. Τέλος, η διασπορά εξαρτάται κυρίως από τη φύση του πετρελαίου και την κατάσταση της θάλασσας και ευνοείται από το σχετικά μικρό ιξώδες του πετρελαίου αλλά και από τη θραύση κυμάτων. Υπό κατάλληλες συνθήκες, μια πετρελαιοκηλίδα μπορεί να διασπαρεί τελείως μέσα σε λίγες μέρες (ITOPF, 2011a).
- Φωτοοξειδωση (Photooxidation): Πρόκειται για τη χημική αντίδραση του οξυγόνου με τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας. Λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια της θάλασσας και επιταχύνεται μετά την εξάπλωση του πετρελαίου και την δημιουργία λεπτών στρωμάτων (films) κηλίδων. Επίσης, εξαρτάται από τη χημική σύσταση των υδρογονανθράκων, τη θερμοκρασία, το ηλιακό φως και το πάχος των φιλμ. Θεωρείται ότι ο ρυθμός της διάσπασης των λεπτών φιλμ λόγω φωτοοξειδωσης, σε ιδανικές συνθήκες θάλασσας και υπό την επίδραση ισχυρού

ηλιακού φωτός μπορεί να ανέλθει στο 0,1% ανά ημέρα (Μπορμπουδάκης, 2016).

- Βιοδιάσπαση (Biodegradation): Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου αποτελεί μια βιολογική διεργασία γήρανσης πετρελαίου. Στηρίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα κ.ά.), που περιέχονται στο θαλασσινό νερό, να χρησιμοποιούν τους υδρογονάνθρακες του πετρελαίου δίνοντας ως τελικά προϊόντα οξείδια του άνθρακα και νερό. Στον ρυθμό και την έκταση της βιοδιάσπασης σημαντικό ρόλο παίζουν τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου, η διαθεσιμότητα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών αλλά και η θερμοκρασία. Το οξυγόνο επιδρά σημαντικά στη διεργασία αυτή καθώς χωρίς αυτό είναι αδύνατη η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συνεπώς και η βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Όλα τα συστατικά του αργού πετρελαίου διασπώνται με διαφορετικούς ρυθμούς, ανάλογα με τη χημική τους δομή. Οι ενώσεις με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα διασπώνται γρηγορότερα από όλες σε αντίθεση με αυτές με μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα, όπως το ασφαλτικό υπόλειμμα, οι οποίες διασπώνται εξαιρετικά αργά. Επίσης, οι κυκλικές ενώσεις διασπώνται με πιο αργούς ρυθμούς σε σύγκριση με αυτές που έχουν ευθεία ή διακλαδισμένη αλυσίδα (Μπορμπουδάκης, 2016).
- Ιζηματοποίηση/Καταβύθιση (Sedimentation/Sinking): Τα περισσότερα πετρέλαια έχουν χαμηλή πυκνότητα και επιπλέουν στο θαλασσινό νερό, εκτός και αν αλληλοεπιδράσουν με πυκνότερα υλικά. Τα σταγονίδια του πετρελαίου μπορεί να προσκολληθούν σε αιωρούμενα σωμάτια ιζήματος, άλλων οργανικών ουσιών ή και άμμου και σταδιακά να βυθιστούν (ITOPF, 2011a).

1.2.4 Επιπτώσεις ρύπανσης περιβάλλοντος από πετρελαιοειδή

Η απελευθέρωση πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι μία από τις χειρότερες μορφές ρύπανσης των θαλάσσιων υδάτων. Ο σχηματισμός πετρελαιοκηλίδων προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις τόσο στα παράκτια και θαλάσσια οικοσυστήματα, όσο επίσης και στον άνθρωπο και τη δημόσια υγεία.

Η επίδραση του πετρελαίου στους οργανισμούς είναι ιδιαίτερα σημαντική στους τομείς της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και της συμπεριφοράς τους. Πιο συγκεκριμένα, οι επιδράσεις του είναι μεγαλύτερες στους οργανισμούς που ζουν σε διαπαλιρροιακά ή ρηχά νερά με κινητά (αμμώδη) υποστρώματα. Αυτό συμβαίνει γιατί το πετρέλαιο εισέρχεται στο ίζημα και παραμένει εκεί ανέπαφο, λόγω της απουσίας οξυγόνου και φωτός. Σε τέτοιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση των πληθυσμών βενθικών ειδών (καβουριών, στρειδιών μυδιών) με διάρκεια έως και έξι χρόνια μετά την εισροή πετρελαίου (Clark, et al., 2002).

Η πιο εμφανής επίδραση ατυχημάτων ρύπανσης από πετρέλαιο στο οικοσύστημα σχετίζεται με τους θανάτους των θαλάσσιων θηλαστικών (Εικόνα 1.6) και των θαλάσσιων πτηνών καθώς κάθε χρόνο βλάπτονται δεκάδες ή εκατοντάδες χιλιάδες πτηνά βλάπτονται λόγω της πετρελαϊκής ρύπανσης. Ειδικότερα, σημαντικές είναι οι επιπτώσεις στα θαλασσοπούλια (Εικόνα 1.7), τα οποία επηρεάζονται άμεσα, καθώς τα φτερά τους καλύπτονται με πετρέλαιο και συγκολλούνται, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να απωθήσουν πλέον το νερό και να πνίγονται. Ακόμη όμως κι αν δεν πνιγούν, μειώνεται η θερμική μόνωση του σώματός τους στο

ψυχρό νερό και δυσκολεύονται στην πλεύση και το πέταγμά τους. Συνέπεια αυτού είναι ο θάνατός τους, ιδιαίτερα αν δεν μπορούν να πετάξουν για να βρουν τροφή (Clark, et al., 2002).



Εικόνα 1.6 - Επιπτώσεις πετρελαίου στα θηλαστικά (Μπορμπουδάκης, 2016).



Εικόνα 1.7 - Θαλασσοπούλι καλυμμένο με πετρέλαιο (Κολοβού, 2015).

Πολύ σημαντικές είναι οι επιπτώσεις και στα υποθαλάσσια φυτά και φύκια. Εξαιτίας της ύπαρξης του πετρελαίου μειώνεται η διαπερατότητα του φωτός και του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης και να προκαλούνται σημαντικές επιδράσεις στη θαλάσσια οικολογία. Είναι επομένως αντιληπτό ότι η καταστροφή των υποθαλάσσιων φυτών είναι βέβαιη, είτε άμεσα είτε έμμεσα (Τσακίρογλου , 2014).

Όσον αφορά τη δημόσια υγεία και τον άνθρωπο, ορισμένες ενώσεις πετρελαίου έχουν τοξική δράση και κάποιες είναι γνωστές καρκινογόνες ουσίες (PAHs). Παλιότερα υπήρχαν φόβοι ότι οι ουσίες αυτές συσσωρεύονται σε ανώτερους ζωικούς οργανισμούς και βιομεγεθύνονται μέσω της τροφικής αλυσίδας. Σήμερα, έχει αποδειχτεί ότι η κατανάλωση θαλασσινών αποτελεί το 2-3% της λήψης των PAHs μέσω μιας κανονικής δίαιτας (Clark, et al., 2002).

1.2.5 Εξάπλωση πετρελαίου στις ακτές

Τα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα έχουν ένα ευρύ φάσμα ευαισθησιών στο πετρέλαιο και τις διαδικασίες καθαρισμού. Η National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) και το American Petroleum Institute (API) έχουν αναπτύξει τον Περιβαλλοντικό Δείκτη Ευαισθησίας (Environmental Sensitivity Index, ESI) για να ταξινομήσουν τους τύπους ακτών για τις τεχνικές αντιμετώπισης τους (NOAA & API, 1994) (NOAA & Whitney, 1994). Σημαντικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στην ταξινόμηση της ευαισθησίας του φυσικού περιβάλλοντος είναι ο τύπος των ακτών (υπόστρωμα, μέγεθος κόκκων, παλιρροιακή ανύψωση), η έκθεση στο κύμα και η παλιρροιακή δράση, η βιολογική παραγωγικότητα και η ευαισθησία και η ευκολία του καθαρισμού. Ο συγκεκριμένος τρόπος ταξινόμησης (Πίνακας 1.2) έχει χρησιμοποιηθεί σε στρατηγικές σχεδιασμού αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων αλλά και σε επιχειρήσεις μεθόδων αντιμετώπισής τους (Hayes, et al., 1995). Από τις τεχνικές απορρύπανσης, η βιοεξυγίανση μπορεί να είναι αποτελεσματική και να προκαλέσει τη λιγότερη ζημία στους σχετικά ευαίσθητους και στους πιο ευαίσθητους τύπους ακτών.

Πίνακας 1.2 - Κατάταξη ακτών με βάση τις επιπτώσεις για τη χλωρίδα και την πανίδα των θαλάσσιων ακτών (NOAA & API, 1994).

Environmental Sensitivity Index (ESI)	Είδος Ακτής
1	Exposed rocky shores Sea walls and piers
2	Exposed wave-cut platforms
3	Fine-grained sand beaches
4	Coarse-grained sand beaches
5	Mixed sand and gravel beaches
6	Gravel beaches and riprap
7	Exposed tidal flats
8	Sheltered rocky shores
9	Sheltered tidal flats
10	Salt marshes and Mangroves

*1 είναι η λιγότερο ευαίσθητη και 10 η πιο ευαίσθητη σε ό,τι αφορά τη ρύπανση με πετρέλαιο και τις μεθόδους αντιμετώπισης αυτής.

1.3 Τεχνικές Απορρύπανσης

Οι συνέπειες της θαλάσσιας ρύπανσης από πετρελαιοειδή (όπως αναφέρθηκαν παραπάνω) και ιδιαίτερα αυτές που σχετίζονται με μεγάλες διαρροές πετρελαίου δημιουργούν την επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών για την αντιμετώπισή τους. Οι διάφορες τεχνικές απορρύπανσης των πετρελαιοκηλίδων, που εφαρμόζονται σε κάθε περίπτωση, εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως την περιοχή της ρύπανσης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πετρελαίου. Τα τελευταία χρόνια οι τεχνολογίες αντιμετώπισης που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση του πετρελαίου παρουσιάζουν σημαντική πρόοδο, στηριζόμενες σε μηχανικές, χημικές και άλλες εναλλακτικές μεθόδους συμπληρωματικού χαρακτήρα. Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι αντιμετώπισης πετρελαϊκής ρύπανσης που έχουν ως απώτερο στόχο την άμεση προστασία και αποκατάσταση του περιβάλλοντος.

1.3.1 Προσθήκη χημικών διασκορπιστικών (Chemical dispersants)

Μια από τις κλασικές μεθόδους αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων είναι η προσθήκη χημικών ουσιών, συνήθως από αέρος με γεωργικά αεροπλάνα ή πλοιάρια (Εικόνα 1.8), με στόχο την ενίσχυση της φυσικής διασποράς του πετρελαίου. Οι χημικές αυτές ουσίες αποτελούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα, που έλκεται από τα μόρια του πετρελαίου κι από ένα υδρόφιλο, που έλκεται από το νερό. Η δομή αυτή συμβάλλει στη μείωση της επιφανειακής τάσης του πετρελαίου και του νερού, και επιτρέπει το σχηματισμό μικροσκοπικών σταγονιδίων πετρελαίου, που περιβάλλονται από μόρια διασκορπιστικού και αιωρούνται στη στήλη του νερού. Ο σκοπός της χρήσης τους είναι να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια και να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη πριν προλάβει να φτάσει το πετρέλαιο στην ακτή και την μολύνει. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει επιτυχία μόνο όταν το ιξώδες του πετρελαίου δεν είναι πολύ υψηλό, αλλιώς τα τασιενεργά διαλύονται στην υδατική φάση προτού προλάβει ο διαλύτης να εισέλθει στην οργανική φάση (Καλογεράκης, 2013).



Εικόνα 1.8 - Σπρέι χημικών από πλοιάρια ή από αεροπλάνα/ελικόπτερα (Καλογεράκης, 2013).

1.3.2 Περιορισμός και ανάκτηση επιπλέοντος πετρελαίου (booming and skimming)

Ο περιορισμός της πετρελαιοκηλίδας και η ανάκτηση του επιπλέοντος πετρελαίου γίνεται με την χρήση φραγμάτων (booms) και πετρελαιοσυλλεκτών (skimmers), τα οποία είναι ειδικά σχεδιασμένα για εφαρμογή στην ανοικτή θάλασσα ή πλησίον ακτών, λιμένων κτλ.

Φράγματα (Booms)

Τα φράγματα είναι διατάξεις περιορισμού του πετρελαίου και χρησιμοποιούνται για να προστατεύσουν τις ακτές, τις ιχθυοκαλλιέργειες και άλλους πόρους από τη ρύπανση, αλλά και για να περιορίσουν μια πετρελαιοκηλίδα ώστε να είναι ευκολότερη η περισυλλογή του πετρελαίου από το νερό (Εικόνα 1.9). Τα φράγματα έχουν εφαρμογή μόνο υπό την προϋπόθεση ότι το πετρέλαιο επιπλέει ακόμα και δεν έχει εξαπλωθεί. Αυτό σημαίνει ότι η εφαρμογή τους πρέπει να είναι άμεση (Μπορμπουδάκης, 2016).



Εικόνα 1.9 - Περιορισμός επιπλέοντος πετρελαίου αριστερά και δεξιά Booms για χρήση πλησίον των ακτών (Καλογεράκης, 2013).

Πετρελαιοσυλλέκτες (skimmers)

Ο πετρελαιοσυλλέκτης είναι μια διάταξη ανάκτησης πετρελαίου ή μίγματος πετρελαίου και νερού από την επιφάνεια της θάλασσας. Η χρήση τέτοιων συλλεκτών τις περισσότερες φορές συνδυάζεται με την εφαρμογή φραγμάτων, τα οποία περικλείουν το πετρέλαιο αυξάνοντας τη συγκέντρωσή του. Ένας συλλέκτης πετρελαίου αποτελείται από μία συσκευή ανάκτησης πετρελαίου, μια αντλία για τη μεταφορά του πετρελαίου σε βυτίο και μία συσκευή για να διατηρεί σταθερό το επίπεδο σε σχέση με τη θάλασσα. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, οι μηχανικοί και οι ελαιοφιλικόι συλλέκτες (Μπορμπουδάκης, 2016).

Ο συνδυασμός των φραγμάτων και των πετρελαιοσυλλεκτών, θεωρείται ως η φιλικότερη προς το περιβάλλον μέθοδος αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων. Ωστόσο, οι ποσότητες του πετρελαίου που μπορούν να ανακτηθούν ακόμα και σε πολύ ευνοϊκές συνθήκες είναι μικρές (Κότρικλα, 2015).

1.3.3 Ανάφλεξη στην ανοικτή θάλασσα (In situ burning)

Η επί τόπου καύση είναι μια ελεγχόμενη καύση του πετρελαίου στο σημείο της εκροής του στη θάλασσα (Εικόνα 1.10). Η μέθοδος αυτή, παρόλο που φαίνεται απλή στην εφαρμογή της, έχει πολλά προβλήματα. Ωστόσο, θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος απορρύπανσης πετρελαιοκηλίδων στη βιομηχανία. Τα προβλήματα της επιτόπιας ανάφλεξης του πετρελαίου είναι τα εξής (Καλογεράκης, 2013):

- Αδυναμία ανάφλεξης ή διατήρησης της καύσης (πάχος πετρελαιοκηλίδας τουλάχιστον 2-3mm για να υπερισχύσει της ψύξης λόγω του νερού και των ανέμων).
- Η εξάτμιση των ελαφριών συστατικών του πετρελαίου κάνει την ανάφλεξη πολύ πιο δύσκολη.
- Πετρέλαιο που έχει υποστεί σημαντική γήρανση (weathered oil) είναι δύσκολο να αναφλεχθεί. Γενικά αν εξατμιστεί το 20% κατά βάρος είναι πρακτικά ανεφάρμοστη αυτή η τεχνική.



Εικόνα 1.10 - Ανάφλεξη στην ανοικτή θάλασσα (Καλογεράκης, 2013).

Επιπλέον, η μέθοδος αυτή δημιουργεί σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως η παραγωγή μαύρου καπνού που μπορεί να επικαθήσει σε περιοχές μέχρι και 100 km μακριά και δεύτερον τα επιπλέοντα υπολείμματα της καύσης είναι πιθανόν να είναι πολύ πιο δύσκολα βιοδιασπώμενα με αποτέλεσμα μία πιθανή καθίζησή τους να επιφέρει τοξικότητα στους οργανισμούς του βυθού (Καλογεράκης, 2013).

1.4 Η βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού πετρελαιοκηλίδων

Η βιοεξυγίανση είναι μια νέα μέθοδος, αρκετά ελπιδοφόρα για τον καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων μετά από την επιτυχή εφαρμογή της στο ατύχημα του Exxon Valdez το 1989.

Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως ``η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα έτσι ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης`` (Congress US, 1991). Η βιοεξυγίανση μπορεί να λάβει δύο μορφές: την βιοενίσχυση και την βιοδιέγερση.

1.4.1 Μορφές Βιοεξυγίανσης

Βιοδιέγερση (Biostimulation)

Η μέθοδος της βιοδιέγερσης στηρίζεται στο γεγονός ότι υπάρχουν πάντα μικροοργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν το πετρέλαιο. Ωστόσο, σε μία πετρελαιοκηλίδα υπάρχει μεγάλη ποσότητα άνθρακα χωρίς όμως να υπάρχουν οι ποσότητες αζώτου και φωσφόρου που απαιτούνται. Για αυτό το λόγο, στη συγκεκριμένη τεχνική προστίθενται θρεπτικές ουσίες ή άλλα περιοριστικά υποστρώματα, ώστε να επιτευχθεί η αναλογία άνθρακα : αζώτου : φωσφόρου (C:N:P=120:10:1 σε mol), που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Καλογεράκης, 2013).

Βιοενίσχυση (bioaugmentation)

Στη μέθοδο της βιοενίσχυσης γίνεται προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν το πετρέλαιο. Έτσι, ενισχύεται ο μικροβιακός πληθυσμός κι επιτυγχάνεται υψηλότερος ρυθμός βιοδιάσπασης. Η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε περιοχές μόνιμης πετρελαϊκής ρύπανσης, ενώ η αποδοτικότητα της μεθόδου είναι αμφισβητήσιμη καθώς συχνά οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί ξεπερνούν σε αριθμό τους προστιθέμενους (Καλογεράκης, 2013).

Από διάφορες εφαρμογές των μεθόδων αυτών στο πεδίο αλλά και από εργαστηριακές δοκιμές, συμπεραίνεται ότι και οι δύο τεχνικές μπορούν να ενισχύσουν τη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Ωστόσο, η μέθοδος της βιοδιέγερσης είναι αποτελεσματικότερη μιας και η προσθήκη μικροοργανισμών δε θα ενισχύσει περισσότερο τη διάσπαση του πετρελαίου από μία απλή προσθήκη θρεπτικών (Μπορμπουδάκης, 2016).

1.4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης ως μέθοδο απορρύπανσης

Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης δεν είναι μια ουτοπική τεχνική καθώς πέρα από πολλά πλεονεκτήματα, έχει και αρκετά μειονεκτήματα, τα οποία είναι τα εξής: (Μπορμπουδάκης, 2016)

Πλεονεκτήματα

- Έχει απλή εφαρμογή και δεν είναι ιδιαίτερες οι απαιτήσεις σε προσωπικό και μηχανικό εξοπλισμό.
- Το κόστος λειτουργίας είναι χαμηλό σε σύγκριση με άλλες μεθόδους βιοαποκατάστασης.
- Είναι πολύ φιλική προς το περιβάλλον γιατί βασίζεται σε φυσικές διεργασίες και περιλαμβάνει την τελική αποικοδόμηση του πετρελαίου σε ανόργανα προϊόντα (CO₂ και H₂O).
- Ο χρόνος αποκατάστασης είναι σχετικά μικρός, κυμαίνεται μεταξύ 6 και 24 μηνών.

Μειονεκτήματα

- Αποτελεί μια δευτερεύουσα μέθοδο αποκατάστασης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η ρύπανση είναι μεγάλη.
- Η απόδοσή της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι θα πρέπει να εξετάζονται συνεχώς ώστε να επιτυγχάνεται ο βέλτιστος ρυθμός δράσης των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση και η αποδόμηση των ρύπων.
- Είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί η μείωση της συγκέντρωσης των ρύπων άνω του 95% των συστατικών του πετρελαίου κάτω του 0.1 ppm.

1.5 Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου

Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου είναι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες που περιλαμβάνονται στη γήρανση και την τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον, ιδιαίτερα για τα μη πτητικά συστατικά του πετρελαίου. Έχει αποδειχθεί ότι περισσότερα από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο έως τις ενώσεις με πάνω από 40 άτομα άνθρακα. Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κύριοι βιοαποικοδομητές κι έχουν ένα μεγάλο εύρος κατανομής που καλύπτει μέχρι και τα πιο αρκτικά περιβάλλοντα. Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλώνουν υδρογονάνθρακες είναι άμεσα συνδεδεμένη με την έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες κι επομένως περιβάλλοντα με πρόσφατη ή χρόνια ρύπανση πετρελαίου παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό αυτών των μικροοργανισμών σε σχέση με μη ρυπασμένες περιοχές (Νικολοπούλου, 2005).

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί έχουν συνεργιστική δράση και δεν έχει βρεθεί κανένα γένος βακτηρίων που να μπορεί να αποικοδομήσει όλα τα συστατικά του αργού πετρελαίου. Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει μια σειρά διεργασιών, όπου κάποιοι μικροοργανισμοί πραγματοποιούν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου με αποτέλεσμα να παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται από μια διαφορετική ομάδα μικροοργανισμών κι έτσι γίνεται περαιτέρω αποικοδόμηση (Νικολοπούλου, 2005).

1.6 Επιφανειοδραστικές / Τασιενεργές Ενώσεις

Οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ενώσεις (surfactants) είναι οργανικές αμφίφιλες ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια των διαλυμάτων μειώνοντας την επιφανειακή τους τάση. Έτσι, είναι πιο εφικτό να αναμιχθούν ή να διασκορπιστούν εύκολα ως γαλακτώματα στο νερό ή σε άλλα υγρά. (Μπορμπουδάκης, 2016)

Όσον αφορά τη μοριακή τους δομή, αποτελούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα, που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα και/ή υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες, και από ένα υδρόφιλο τμήμα αποτελούμενο από μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες, πεπτιδία ή πρωτεΐνες (Νικολοπούλου, 2005).

Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στο συνδυασμό της δράσης του υδρόφιλου και του υδρόφοβου τμήματός τους. Το υδρόφιλο τμήμα κάνει τις τασιενεργές ουσίες διαλυτές στο νερό

και μέσω του υδρόφοβου τμήματός τους, συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες μειώνοντας την επιφανειακή τάση των διαλυμάτων. Έτσι, το υδρόφοβο τμήμα προσανατολίζεται προς τον υδρόφοβο ρύπο, π.χ. πετρέλαιο, ενώ το υδρόφιλο τμήμα προσανατολίζεται προς το νερό. Λόγω της επιφανειοδραστικότητας τους τα μόρια των τασιενεργών ενώσεων δεισδύουν στο υπόστρωμα, δηλαδή ανάμεσα στον ρύπο και την ινώδη επιφάνεια, με αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση και απομάκρυνση του ρύπου (Μπορμπουδάκης, 2016).

1.6.1 Επιφανειοδραστικές/Τασιενεργές ενώσεις βιολογικής προέλευσης

Μέχρι πρόσφατα για την παραγωγή τασιενεργών ουσιών χρησιμοποιούταν ως πρώτη ύλη το πετρέλαιο. Αυτό όμως ήταν τοξικό για το περιβάλλον, γιατί πολλές επιφανειοδραστικές ουσίες σχημάτιζαν επικίνδυνες ενώσεις, οι οποίες δεν αποικοδομούνται πλήρως στο έδαφος ή στο νερό. Επιπλέον, πέρα από τα περιβαλλοντικά ζητήματα που υπήρχαν, είχαν διαπιστωθεί και προβλήματα υγείας στους χρήστες όπως αλλεργίες, δερματοπάθειες κ.ά. Έτσι, άρχισε να αυξάνεται το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (biosurfactants), ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη όπως *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium* και *Alcanivorax*, που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών (Banat, et al., 2000). Είναι αμφίφυλες ενώσεις μικροβιακής προέλευσης, μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπώμενες και φιλικές προς το περιβάλλον. Η *in situ* παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών μπορεί να υποκινηθεί στην περιοχή της ρύπανσης και οι ουσίες αυτές μπορούν και να ανακυκλωθούν (Νικολοπούλου, 2005).

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης κατατάσσονται σε 5 μεγάλες ομάδες (Μπορμπουδάκης, 2016):

1. Γλυκολιπίδια
2. Φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα
3. Λιποπεπτίδια/λιποπρωτεΐνες
4. Πολυμερικές επιφανειοδραστικές ενώσεις
5. Τασιενεργά σωματίδια

Πίνακας 1.3 - Ποσότητες παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών από διάφορους μικροοργανισμούς και ποικιλία πηγών άνθρακα (Kosaric & Sukan, 2014).

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

Για την επαφή των μικροοργανισμών με τους υδρογονάνθρακες έχουν αναφερθεί τρεις βασικοί μηχανισμοί: (Κορακάκη, 2012)

- Πρόσληψη των διαλυμένων υδρογονανθράκων στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να λειτουργεί σε υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας.
- Πρόσληψη υδρογονανθράκων που δε βρίσκονται στην υδατική φάση, από κύτταρα που έρχονται σε επαφή με πολύ μεγαλύτερες σταγόνες υδρογονανθράκων από αυτά. Ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται κυρίως σε ελάχιστα διαλυτούς υδρογονάνθρακες.
- Πρόσληψη υδρογονανθράκων που βρίσκονται σε μια ψευδο-διαλυμένη κατάσταση.

Η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των υδρογονανθράκων με την προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών ακολουθεί το εξής μονοπάτι: (Κορακάκη, 2012)

1. Μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υδατικής και μη-υδατικής φάσης.
2. Αύξηση της διαλυτότητας των υδρογονανθράκων. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως διαλυτοποίηση και προκαλείται από την παρουσία μικκυλίων. Η διαλυτοποίηση εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας, την υδροφοβικότητα, τις αλληλεπιδράσεις θαλασσινού νερού-δραστικής ουσίας και τον χρόνο παραμονής του ρύπου στη θάλασσα.
3. Ορισμένες από αυτές διευκολύνουν στην προσκόλληση ή την αποκόλληση των μικροοργανισμών από την επιφάνεια του ρύπου, επηρεάζοντας την υδροφοβικότητα της επιφάνειας των κυττάρων ή των ρυπογόνων ενώσεων (Κορακάκη, 2012).

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

Στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (Biosurfactants-BSs) κατά την αποικοδόμηση υδρογονανθράκων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μικροβιακές κοινότητες της Ανατολικής Μεσογείου που ήταν εντελώς παρθένα, καθώς επίσης και μικροοργανισμοί που είχαν απομονωθεί από περιοχή χρόνια ρυπασμένη με πετρελαιοειδή (Antoniou, et al., 2015). Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες εξετάστηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών.

2.1 Δειγματοληψία

Για το συγκεκριμένο πείραμα, εξετάστηκαν μικροβιακές κοινότητες (consortia) μικροοργανισμών από δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, κοντά στο Κουφονήσι Λασιθίου στην Κρήτη. Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια του προγράμματος ανοικτών θαλασσών «Υποδομές Μεταφορών, Περιβάλλον και Αειφόρος Ανάπτυξη» (ΥΜΕΠΕΡΑΑ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία επιφανειακά αλλά και σε βάθος 1000m σε θαλάσσια περιοχή που ήταν εντελώς παρθένα. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με 12L Niskin bottles στις εξής συντεταγμένες: 26.131288E, 34.815447N.

2.2 Εμπλουτισμός καλλιεργειών και φύλαξη σε γλυκερόλη

Το πρώτο στάδιο του πειράματος ήταν η δημιουργία κοινοτήτων εμπλουτισμένων σε μικροοργανισμούς που αποικοδομούν πετρέλαιο και η φύλαξή τους σε γλυκερόλη. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των διαδοχικών εμπλουτισμών εξετάστηκαν δύο διαφορετικές περιπτώσεις από τη δειγματοληψία που είχε γίνει και μελετήθηκαν μια καλλιέργεια βαθιών νερών στους 25°C και μια καλλιέργεια βαθιών νερών στους 14°C. Σκοπός του πρώτου σταδίου ήταν η δημιουργία των εμπλουτισμένων κοινοτήτων. Για την επίτευξη αυτού έγινε παρακολούθηση της αύξησης του πληθυσμού των μικροβιακών κοινοτήτων ώστε να διαπιστωθεί σε πόσο χρονικό διάστημα φτάνουν στο στάδιο της εκθετικής αύξησης όπου και πρέπει να γίνει η μεταφορά και να δημιουργηθεί η επόμενη καλλιέργεια.

Για κάθε περίπτωση δημιουργήθηκαν τρεις επαναλήψεις και η παρασκευή τους έγινε σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 500 ml.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η ετοιμασία των υγρών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά με τη χρήση αποστειρωμένων σκευών και κάτω από αποστειρωμένο απαγωγέα με φλόγα.

Καλλιέργειες εμπλουτισμού

Αναλογίες διαλυμάτων για τις κοινότητες SURF25, DEEP14, DEEP25 (x3 επαναλήψεις)

- 250ml ONR7
- 0.5% v/v αργό πετρέλαιο πυκνότητας 0.7905 g/ml
- 20% του τελικού όγκου θαλασσινό νερό (50ml) από τη δειγματοληψία

Αφού δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες εμπλουτισμού όπως αυτές αναφέρονται παραπάνω, οι κωνικές φιάλες παρακολουθούνταν καθημερινά και γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀) με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας. Πιο συγκεκριμένα, σε καθημερινή βάση με τη χρήση αποστειρωμένων σκευών και κάτω από αποστειρωμένο απαγωγέα με φλόγα, λαμβάνονταν 2 ml από κάθε καλλιέργεια τα οποία τοποθετούνταν σε σωλήνες “erppendorf” των 2 ml. Έπειτα ακολουθούσε μηχανική ανάδευση του δείγματος (sonication), στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρηση και τέλος η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης. Οι συγκεκριμένες διαδικασίες αναφέρονται αναλυτικά στις επόμενες ενότητες.

Πρέπει να αναφερθεί ότι καθ’ όλη τη διάρκεια των διαδοχικών εμπλουτισμών καθώς επίσης και τη διάρκεια του πειράματος (ενότητα 2.3), οι καλλιέργειες ήταν τοποθετημένες σε μηχανήμα ανάδευσης σε σκοτεινό περιβάλλον και αναδεύονταν στα 110 rpm. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ήταν 25°C για τη μία καλλιέργεια βαθιών νερών και 14°C για την άλλη, η οποία βρισκόταν σε ψυγείο.

Η διαδικασία παρακολούθησης της οπτικής απορρόφησης επαναλαμβανόταν καθημερινά μέχρι η κάθε καλλιέργεια να φτάσει περίπου στην τιμή 0,4. Σε αυτό το σημείο είχε διαπιστωθεί πειραματικά ότι υπήρχε μια μέγιστη τιμή στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς από εκεί και έπειτα η τιμή της οπτικής απορρόφησης μειωνόταν. Επομένως, μόλις η καλλιέργεια έφτανε σε αυτό το σημείο γινόταν εμπλουτισμός. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια απομακρυνόταν χωρίς όμως να απορριφθεί και δε συνεχιζόταν η παρακολούθησή της. Ωστόσο, δημιουργούταν μία νέα καλλιέργεια, η οποία ήταν εμπλουτισμένη με το 10% της προηγούμενης, περιείχε θρεπτικό μέσο ONR7 και αργό πετρέλαιο σαν πηγή άνθρακα. Ο εμπλουτισμός αυτός έγινε δύο φορές και δημιουργήθηκαν έτσι διαδοχικά 3 καλλιέργειες συνολικά (η αρχική καλλιέργεια, ο πρώτος εμπλουτισμός και ο δεύτερος εμπλουτισμός) για κάθε περίπτωση.

1^{ος} εμπλουτισμός και 2^{ος} εμπλουτισμός

Αναλογίες διαλυμάτων για τις κοινότητες SURF25, DEEP14, DEEP25 (x3 επαναλήψεις)

- 250ml ONR7
- 0.5% v/v αργό πετρέλαιο πυκνότητας 0.7905 g/ml
- 10% του τελικού όγκου θαλασσινό νερό (25ml) από την προηγούμενη καλλιέργεια

Μετά τους δύο εμπλουτισμούς που έγιναν, πραγματοποιήθηκε η φύλαξή τους στην κατάψυξη σε διάλυμα γλυκερόλης 25%.

2.3 Πείραμα

2.3.1 Καλλιέργειες πειράματος

Έπειτα, ξεκίνησε το πείραμα και δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες πειράματος. Σκοπός ήταν η ανάπτυξη και παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (BSs) κατά την αποικοδόμηση υδρογονανθράκων. Αφού είχαν γίνει οι εμπλουτισμοί των καλλιεργειών, δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες πειράματος, SURF25, DEEP14 και DEEP25, η εξέλιξη των οποίων παρακολουθούνταν σε σχέση με το χρόνο για συνολικά 50 ημέρες. Επίσης, πραγματοποιούνταν οι τρεις έλεγχοι επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης.

Καλλιέργειες πειράματος

Αναλογίες διαλυμάτων για τις καλλιέργειες SURF25, DEEP14, DEEP25 (x3 επαναλήψεις)

- 250ml ONR7
- 0.5% v/v αργό πετρέλαιο πυκνότητας 0.7905 g/ml
- 2ml μικροοργανισμών έπειτα από απόψυξη

2.3.2 Μελέτη απομονωμένων μικροοργανισμών

Εκτός από τις καλλιέργειες επιφανειακών και βαθιών νερών μελετήθηκαν επίσης και τέσσερις απομονωμένοι μικροοργανισμοί και μια μικροβιακή κοινότητα από παλαιότερη μελέτη που είχε γίνει. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί Υ, Κ, Espα, Υαc και η μικροβιακή κοινότητα Ε8, που ήταν αποθηκευμένοι στην κατάψυξη από το 2015 σε διάλυμα γλυκερόλης 25% (Antonίου, et al., 2015). Οι μικροοργανισμοί αυτοί και η κοινότητα Ε8 προήλθαν από περιοχή μολυσμένη με πετρελαιοειδή και μελετήθηκαν ώστε να συγκριθούν με τις καλλιέργειες των επιφανειακών και βαθιών νερών.

Η υδροφοβικότητα είναι ένα από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά μιας κοινότητας, καθώς μέσω αυτής είναι εφικτή η έμμεση εκτίμηση παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών. Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε η κοινότητα με τον κωδικό Ε8, μιας και σε παλαιότερη μελέτη είχε βρεθεί ότι έχει μεγάλο ποσοστό υδροφοβικότητας που αγγίζει το 67% (Κορακάκη, 2012). Ο υπολογισμός της υδροφοβικότητας γίνεται μετρώντας την οπτική απορρόφηση μιας καλλιέργειας στα 600nm σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η αρχική οπτική απορρόφηση (OD_{600i}) και το δεύτερο στάδιο είναι η οπτική απορρόφηση της κάτω-υδατικής φάσης μετά από προσθήκη ελαιώδους μέσου, ανάδευση και διαχωρισμό των φάσεων. Έτσι, ο υπολογισμός γίνεται από τον τύπο (Κορακάκη, 2012):

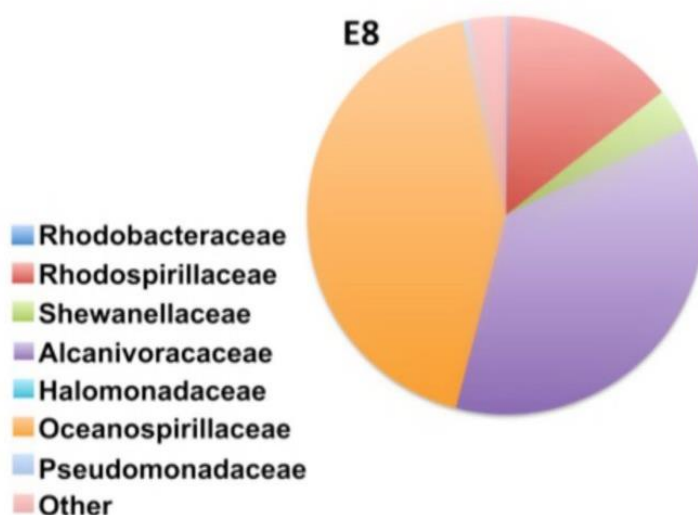
$$\text{Hydrophobicity (\%)} = \frac{(OD_{600i}) - (OD_{600f})}{(OD_{600i})} \cdot 100$$

Η σύσταση της κοινότητας Ε8 παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2.1 (Antonίου, et al., 2015).

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι ο απομονωμένος μικροοργανισμός με τον κωδικό Υ παρουσιάζει ομοιότητα με τον μικροοργανισμό *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Antoniou, et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα κατά gram αρνητικό βακτήριο και συγκαταλέγεται στο γένος *Alcanivorax*. Τα βακτήρια αυτού του γένους είναι από τους πιο ευρέως διαδεδομένους αποικοδομητές αλκανίων και ταυτόχρονα παράγουν σε μεγάλη κλίμακα επιφανειοδραστικές ουσίες και σχηματίζουν βιοφίλμ. (Κορακάκη, 2012).

Ο απομονωμένος μικροοργανισμός με τον κωδικό ESPA προήλθε από ίζημα ρυπασμένο με πετρελαιοειδή και ταυτοποιήθηκε με τον μικροοργανισμό *Paracoccus marcusii* του γένους *Paracoccus* και της οικογένειας *Rhodobacteraceae* (Antoniou, et al., 2015). Είναι και αυτό ένα κατά gram αρνητικό βακτήριο και είχε διαπιστωθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι ο μικροοργανισμός αυτός προσκολλάται στην ελαιώδη φάση περισσότερο από ότι στην υδάτινη (Κορακάκη, 2012). Επομένως, μελετήθηκε περαιτέρω γιατί θα μπορούσε να αποτελέσει μια πολύ καλή λύση για τη βιοαποκατάσταση ρυπασμένων θαλάσσιων περιοχών, μιας και η βιομάζα του θα ήταν προσκολλημένη στην ελαιώδη φάση και δε θα επηρεαζόταν λόγω των θαλάσσιων ρευμάτων.

Επιπλέον, μελετήθηκε ο απομονωμένος μικροοργανισμός με τον κωδικό K, καθώς επίσης και ο μικροοργανισμός Υac, οι οποίοι προήλθαν από προηγούμενη μελέτη (Antoniou, et al., 2015) και δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα.



Διάγραμμα 2.1 - Σύσταση μικροβιακής κοινότητας E8 (Antoniou, et al., 2015).

Οι μικροοργανισμοί Υ, Espa, K, Υac και η μικροβιακή κοινότητα E8 καλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με αργό πετρέλαιο και θρεπτικό μέσο ONR7, αφού πρώτα έγινε απόψυξή τους, ώστε να αυξηθεί ο πληθυσμός τους και να καταγραφεί η καμπύλη ανάπτυξής τους. Για την κοινότητα E8 δημιουργήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς εξετάστηκε μια καλλιέργεια για τον καθένα. Οι αναλογίες των καλλιιεργειών

ήταν ίδιες με τις καλλιέργειες πειράματος των επιφανειακών και βαθιών νερών, βρίσκονταν όλες στους 25°C και αναδεύονταν όπως ακριβώς και οι καλλιέργειες βαθιών και επιφανειακών νερών.

Μετά τη δημιουργία των καλλιεργειών πειράματος, ξεκίνησε η παρακολούθηση των καλλιεργειών για συνολικά 50 μέρες. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιούνταν ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα η μέτρηση της βιομάζας, Πιο συγκεκριμένα, γινόταν μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm, ώστε να δημιουργηθεί η καμπύλη ανάπτυξης της κάθε καλλιέργειας, καθώς επίσης και ο έλεγχος για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης όπως φαίνεται στους πίνακες 2.1 και 2.2.

Πίνακας 2.1 - Ημέρες πραγματοποίησης μετρήσεων για την κοινότητα E8 και τους απομονωμένους μικροοργανισμούς Esra, Y, Yac, K.

Day	Biomass Measurement	Drop Collapse Test	Oil Spreading Test	Emulsification Test
2 ^η	x			
4 ^η	x			
8 ^η	x	x	x	
12 ^η	x			x
16 ^η	x	x	x	
24 ^η	x	x	x	x
32 ^η	x	x	x	
40 ^η	x	x	x	
50 ^η	x	x	x	x

Πίνακας 2.2 – Ημέρες πραγματοποίησης μετρήσεων για τις καλλιέργειες βαθιών και επιφανειακών νερών, SURF25, DEEP14, DEEP25.

Day	Biomass Measurement	Drop Collapse Test	Oil Spreading Test	Emulsification Test
3 ^η	x			
6 ^η	x	x	x	
9 ^η	x	x	x	
12 ^η	x	x	x	x
15 ^η	x	x	x	
18 ^η	x	x	x	x
24 ^η	x	x	x	x
50 ^η	x	x	x	x

2.3.3 Biosurfactant tests

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιούνταν σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα οι τρεις έλεγχοι επιφανειοδραστικών ουσιών, το drop collapse test, το oil spreading test και το emulsification test.

Drop Collapse Test

Για τη μέθοδο Drop Collapse απαιτείται μια πλάκα 96 φρεατίων και η δοκιμή γίνεται στο κάλυμμα της πλάκας. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν 2 μl ορυκτέλαιου σε κάθε περιοχή του φρέατος που οριοθετείται στο κάλυμμα, τα οποία αφέθηκαν να εξισορροπηθούν για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, στις περιοχές που είχαν καλυφθεί με ορυκτέλαιο μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας, 5 μl του δείγματος χωρίς κύτταρα (supernatant). Η δοκιμή πραγματοποιούνταν 5 φορές για κάθε δείγμα, 5 φορές για τον αρνητικό έλεγχο, που ήταν το απιονισμένο νερό, και 5 φορές για τον θετικό έλεγχο που ήταν το επιφανειοδραστικό oil begone. Το oil begone είναι μια επιφανειοδραστική ουσία που προέρχεται από φυτά (Thavasi, et al., 2011).

Έπειτα, παρατηρούνταν το μέγεθος της σταγόνας μετά από 1 λεπτό με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού. Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται όταν η διάμετρος της σταγόνας είναι κατά τουλάχιστον 1 mm μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διάμετρο της σταγόνας του απιονισμένου νερού. Τέλος, ελεγχόταν το μέγεθος της σταγόνας μετά από 3 λεπτά και μετά από 10 λεπτά για τυχόν καθυστερημένη δράση επιφανειοδραστικής ουσίας (Thavasi, et al., 2011).

Emulsification Test

Για τη μέθοδο Emulsification χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες οι οποίοι ήταν αποστειρωμένοι με διχλωρομεθάνιο. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 2 ml πετρελαίου ντίζελ και 2 ml υπερκείμενου χωρίς κύτταρα (supernatant) από κάθε καλλιέργεια. Έπειτα, έγινε στροβιλισμός για 2 λεπτά σε μηχανήμα ανάδευσης και η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε καλλιέργεια. Τέλος, μετρήθηκε το ύψος του γαλακτώματος (emulsion) μετά από 1 λεπτό και μετά από 24 ώρες έτσι ώστε να προσδιοριστεί η σταθερότητά του. Πιο συγκεκριμένα (Thavasi, et al., 2011):

‘NA’ : για μη ύπαρξη γαλακτώματος

‘+++’ : για ύπαρξη γαλακτώματος

‘++’ : για παρουσία φουσκών σε όλη τη στρώση του δείγματος

‘+’ : για παρουσία κάποιων φουσκών στη στρώση του δείγματος

Oil Spreading Test

Για τη μέθοδο Oil Spreading προστέθηκαν σε γυάλινο τρυβλίο 20 ml αποσταγμένου νερού μαζί με 20 μl αργού πετρελαίου στην επιφάνεια. Έπειτα προστέθηκαν στην επιφάνεια του πετρελαίου 10 μl υπερκείμενου χωρίς κύτταρα (supernatant) από κάθε καλλιέργεια. Ο αρνητικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με απιονισμένο νερό και ο θετικός μάρτυρας ήταν το oil

begone. Η ύπαρξη επιφανειοδραστικής ουσίας επιβεβαιώνεται αν δημιουργηθεί μια ζώνη χωρίς πετρέλαιο. Ανάλογα με τη διάμετρο της ζώνης καθορίζεται το αποτέλεσμα του συγκεκριμένου test. Πιο συγκεκριμένα (Menezes Bento, et al., 2005; Ahmad, et al., 2015):

‘NA’ : για μη ύπαρξη ζώνης

‘+’ : για διάμετρο ζώνης 0.5-1.5 cm

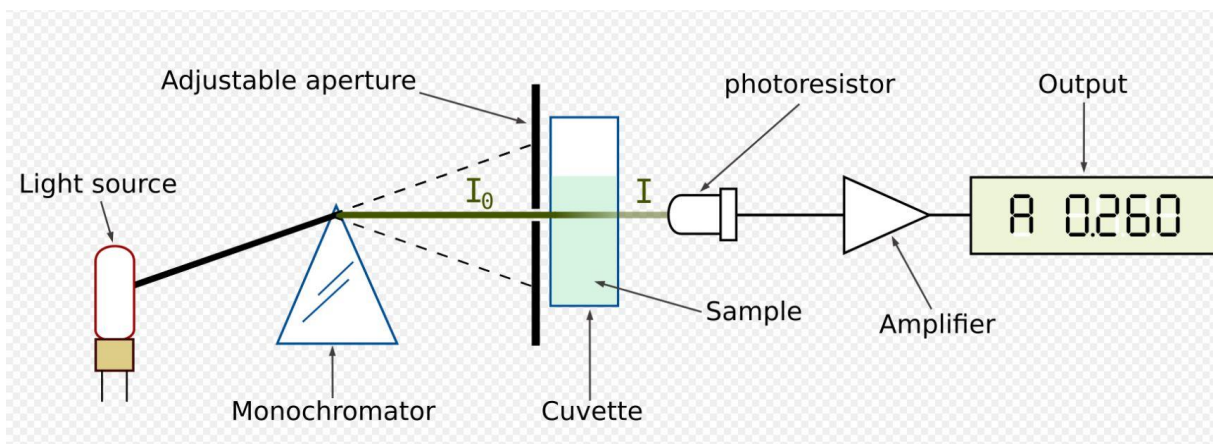
‘++’ : για διάμετρο ζώνης 1.6-2.5 cm

‘+++’ : για διάμετρο ζώνης 2.6-3.5 cm

2.4 Μέθοδος οπτικής πυκνότητας

Η δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών αλλά και η εκτίμηση της συγκέντρωσης βιομάζας πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (APHA & AWWA, 1998). Το φως αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα που αλληλοεπιδρούν με την ύλη και απορροφούνται, ανακλώνται, σκεδάζονται ή διαδίδονται μέσα σε αυτήν. Οι Lambert & Beer μελετώντας μονοχρωματικές ακτινοβολίες κατέληξαν στον παρακάτω νόμο (γνωστός και ως νόμος Beer-Lambert), που αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας. Η απορρόφηση (A) για σταθερό πάχος στοιβάδας (d) και ορισμένο μήκος κύματος φωτός είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος (C) της ουσίας που απορροφά. (Καρκαλούσος, et al., 2015). Έτσι, μετρώντας την απορρόφηση μιας δέσμης φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από ένα δείγμα μικροοργανισμών, είναι έμμεσα εφικτός ο προσδιορισμός της κυτταρικής τους ανάπτυξης. Η μέτρηση της απορρόφησης του φωτός και η καταγραφή ενός φάσματος απορρόφησης γίνεται με ειδικά όργανα, τα φασματοφωτόμετρα.

Η πιο απλή μορφή φασματοφωτόμετρου είναι το φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος (VIS από το Visible), στο οποίο η πηγή είναι μια κοινή λάμπα πυράκτωσης. Το σύστημα διαχωρισμού είναι ένα κοινό πρίσμα ή συνηθέστερα ένα παραθλαστικό φράγμα, το οποίο απομονώνει την επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία (μια συχνότητα ορατή σαν κόκκινο, πράσινο, κίτρινο κ.λπ. φως). Η ακτινοβολία αυτή περνάει μέσα από μια κυψελίδα δηλ. διαφανές άχρωμο δοχείο που περιέχει το προς εξέταση δείγμα και όσο φως δεν απορροφά το διάλυμα μετρείται από ένα κοινό φωτόμετρο που βρίσκεται από την απέναντι πλευρά της κυψελίδας. Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (UV) είναι παρόμοιο με αυτό του ορατού αλλά με δύο διαφορές. Η πηγή είναι λυχνία Δευτερίου ή Ξένου ώστε να παράγει υπεριώδη ακτινοβολία και όλα τα εξαρτήματα (πρίσμα, κυψελίδα κ.λπ.) δεν είναι από γυαλί (το οποίο απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία) αλλά από χαλαζία. Ως όργανο συνήθως εμπεριέχει και λυχνία πυράκτωσης ώστε να μπορεί να γίνουν μετρήσεις και στο ορατό φάσμα και τότε αναφέρεται ως UV-VIS. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (UV-Vis), η λειτουργία του οποίου φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 2.3. (Βικιπαίδεια, 2010).



Εικόνα 2.1 - Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτομέτρου ορατού και υπεριώδους (UV-VIS) (Ψυλλάκη , 2014).

Πρέπει να αναφερθεί ότι για να ισχύει ο νόμος Lambert-Beer πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις: (Καρκαλούσος, et al., 2015)

- τα διαλύματα να μην είναι πυκνά ($0,1 < A < 1$)
- η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
- η κυψελίδα να έχει ομοιόμορφη διατομή
- τα μόρια της διαλυμένης ουσίας να μην αντιδρούν μεταξύ τους
- η μέτρηση να γίνεται στο λ_{max} (το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, χαρακτηριστικό για κάθε ένωση).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, για τη δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών αλλά και την εκτίμηση της συγκέντρωσης βιομάζας μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600nm (OD_{600}). Το τυφλό δείγμα ήταν το PBS και με τη βοήθεια αυτού έγινε ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου πριν από κάθε μέτρηση.

Μετά τη φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος, με τη βοήθεια πιπέτας διαχωριζόταν το υπερκείμενο υγρό (supernatant) από το ίζημα (pellet). Το υπερκείμενο υγρό φυλασσόταν για να χρησιμοποιηθεί για τους ελέγχους ύπαρξης επιφανειοδραστικών ουσιών που αναφέρονται στην ενότητα 2.6. Έτσι, στο σωλήνα errendorf παρέμενε το ίζημα, στο οποίο προστίθονταν 2 ml PBS. Στη συνέχεια γινόταν ομογενοποίηση του ιζήματος (pellet) με το ισοτονικό διάλυμα με τη βοήθεια αναδευτήρα vortex για περίπου 20 δευτερόλεπτα και ξεκινούσε η φωτομέτρησή του. Το διάλυμα που θα φωτομετρηθεί θα πρέπει να είναι σε ισορροπία και οι κυψελίδες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι καθαρές και κατάλληλες για το μήκος κύματος της μέτρησης. Αρχικά, γινόταν μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου με το τυφλό (blank) διάλυμα που στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το PBS. Στη συνέχεια, μεταφερόταν το υπό εξέταση διάλυμα από τον κάθε σωλήνα errendorf στην κυψελίδα και αυτή τοποθετούταν στο φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας γινόταν στα 600nm και καταγραφόταν η ένδειξη μόλις η τιμή της είχε σταθεροποιηθεί.

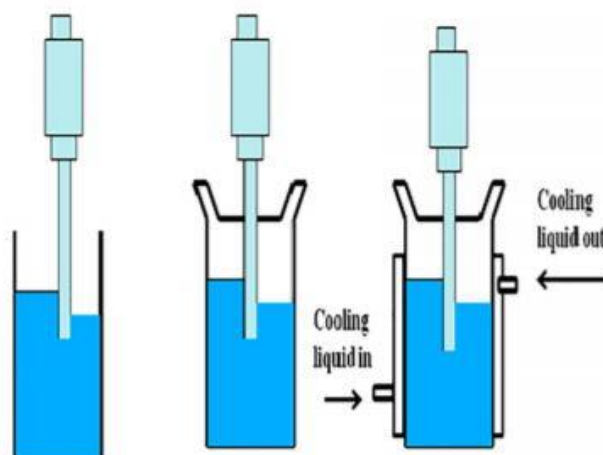
Η διαδικασία επαναλαμβανόταν για όλες τις καλλιέργειες καθημερινά στο πρώτο στάδιο που γινόταν ο διαδοχικός εμπλουτισμός.

2.4.1 Sonication

Μετά από κάθε δειγματοληψία, γινόταν sonication. Κατά τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιούνται τα ηχητικά κύματα για την ανάδευση σωματιδίων σε ένα διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, το ηλεκτρικό σήμα μετατρέπεται σε φυσική δόνηση ώστε να διασπάσει τις ουσίες. Αυτές οι διαταράξεις μπορούν να αναμίξουν διαλύματα, να επιταχύνουν τη διάλυση ενός στερεού σε ένα υγρό και να απομακρύνουν το διαλυμένο αέριο από τα υγρά (Gillespie, 2018).

Ο ήχος είναι ένα κύμα εναλλασσόμενης υψηλής και χαμηλής πίεσης. Η συχνότητα ενός ηχητικού κύματος καθορίζεται από το πόσο συχνά τα σωματίδια μιας ουσίας δονούνται όταν διέρχεται από αυτά το ηχητικό κύμα. Στη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιούνται συνήθως κύματα υπερήχων με συχνότητες 20 kHz (20.000 κύκλοι ανά δευτερόλεπτο) ή υψηλότερες. Αυτές οι συχνότητες είναι πάνω από αυτές που μπορεί κάποιος να ακούσει, αλλά η προστασία των αυτιών συνιστάται επειδή η διαδικασία δημιουργεί ένα δυνατό θόρυβο. Όσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ανάδευση των σωματιδίων (Gillespie, 2018).

Για τη συγκεκριμένη διαδικασία είναι απαραίτητο το δείγμα να βρίσκεται σε ψυχρό περιβάλλον. Για αυτό το λόγο, ο κάθε σωλήνας errendorf τοποθετούνταν σε κουτί με πάγο και γινόταν η μηχανική ανάδευση με το δείγμα τοποθετημένο στον πάγο όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.2. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν 6 φορές για 5 δευτερόλεπτα για κάθε δείγμα (Gillespie, 2018).



Εικόνα 2.2 - Σχηματική αναπαράσταση μηχανικής ανάδευσης-sonication (Wen, et al., 2018).

2.4.2 Φυγοκέντρηση (Centrifugation)

Η φυγοκέντρηση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών ποσοτήτων διαλύματος. Η πιο κοινή της χρήση είναι στο διαχωρισμό στερεής ουσίας που αιωρείται σε υγρό. Η βασική αρχή της φυγοκέντρησης είναι ότι τα σωματίδια που είναι διασκορπισμένα σε ένα υγρό μίγμα, καθιζάνουν λόγω βαρύτητας αν η πυκνότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτήν

του μίγματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο χρόνος που απαιτείται για να καθιζάνουν τα αιωρούμενα σωματίδια είναι πολύς και για αυτό το λόγο η φυγοκέντρωση ωθεί τη στερεά ουσία πιο γρήγορα στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια φυγόκεντρης δύναμης που δημιουργείται στον φυγοκεντρητή ("Αρχή της φυγοκέντρωσης", 2019).

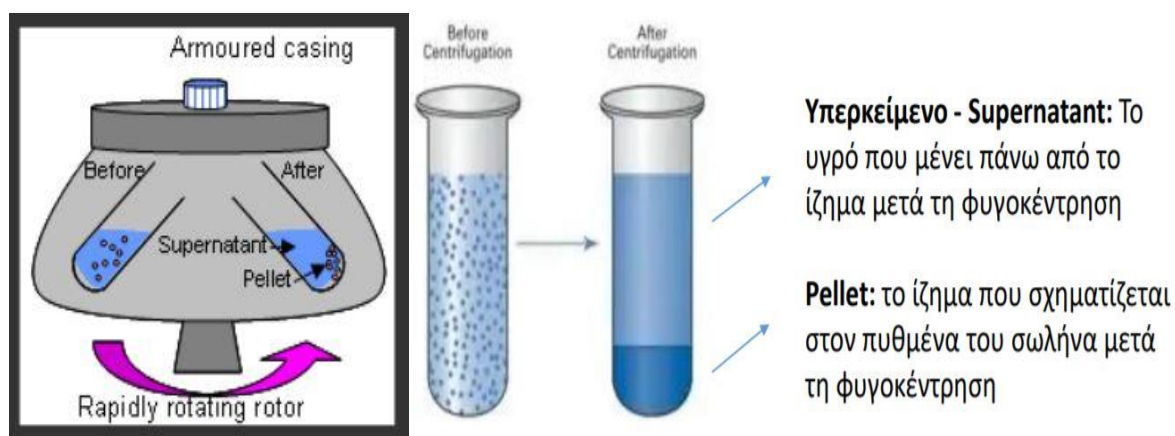
Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φυγοκέντρωση ονομάζονται φυγοκεντρητές (Εικόνα 2.3) . Το κύριο μέρος του φυγοκεντρητή είναι ο ρότορας και σε αυτόν υπάρχουν φωλιές για να τοποθετηθούν οι σωλήνες φυγοκέντρωσης. Ο ρότορας περιστρέφεται με υψηλή ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται φυγόκεντρος δύναμη, η ύπαρξη της οποίας οδηγεί στο διαχωρισμό των μηχανικών μειγμάτων, όπως για παράδειγμα καθίζηση εναιωρημένων σωματιδίων σε υγρό ("Αρχή της φυγοκέντρωσης", 2019).



Εικόνα 2.3 - Επιτραπέζιος κάθετος φυγοκεντρητής.

Η φυγοκέντρωση μπορεί να χωριστεί σε δύο τύπους: την προπαρασκευαστική και την αναλυτική. Η προπαρασκευαστική φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο να απομονωθεί ένα μέρος του δείγματος για περαιτέρω έρευνα όπως για παράδειγμα για την απομόνωση κυττάρων από ένα εναιώρημα, βιολογικά μακρομόρια, κ.λπ. Η αναλυτική φυγοκέντρωση από την άλλη χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμπεριφοράς των βιολογικών μακρομορίων σε ένα φυγοκεντρικό πεδίο. Με αυτή τη μέθοδο μπορούν να ληφθούν δεδομένα σχετικά με τη μάζα, το σχήμα και το μέγεθος των μορίων σε σχετικά μικρούς όγκους του δείγματος. Στην καθημερινή εργαστηριακή εργασία, η προπαρασκευαστική φυγοκέντρωση είναι πιο συνηθισμένη και είναι κι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ("Αρχή της φυγοκέντρωσης", 2019).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που μπορεί να διεξαχθεί μια προπαρασκευαστική φυγοκέντρωση. Η πιο κλασική από αυτές είναι η διαφορική μέθοδος, η οποία βασίζεται στη διαφορά του ρυθμού καθίζησης των σωματιδίων. Το υλικό που μελετάται φυγοκεντρείται με σταδιακή αύξηση της φυγοκεντρικής επιτάχυνσης και σε κάθε στάδιο ένα από τα κλάσματα του μέσου εναποτίθεται στον πυθμένα του σωλήνα. Μετά τη φυγοκέντρωση, δημιουργείται το υπερκείμενο υγρό (supernatant), το οποίο μένει πάνω από το ίζημα και στον πυθμένα του σωλήνα σχηματίζεται το ίζημα (pellet) (Εικόνα 2.4) ("Αρχή της φυγοκέντρωσης", 2019).



Εικόνα 2.4 - Αναπαράσταση διαδικασίας φυγοκέντρησης (Dwight Powell, 2016).

Πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φυγοκέντρησης παίζουν οι ρότορες που βρίσκονται στην κεφαλή του φυγοκεντρητή. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ρότορα: οι κάθετοι ρότορες, οι ρότορες σταθερής γωνίας και οι ρότορες ταλαντευόμενου κάδου. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο φυγοκεντρητής είχε ρότορες σταθερής γωνίας, όπου οι σωλήνες που περιέχεται το δείγμα, κρατούνται σε σταθερή γωνία κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης. Μετά το πέρας της μηχανικής ανάδευσης, το κάθε δείγμα φυγοκεντρούταν στα 13000 rpm για 20 λεπτά ("Αρχή της φυγοκέντρησης", 2019).

2.5 Διαλύματα πειράματος

2.5.1 Αργό πετρέλαιο

Το αργό πετρέλαιο που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα, προήλθε από το Ιράν (Iranian light crude oil) και είχε πυκνότητα 0.7905 g/ml. Πριν τη χρήση του ως θρεπτικό για τους μικροοργανισμούς, το πετρέλαιο φιλτραρίστηκε και αποστειρώθηκε με τη βοήθεια φίλτρου με μέγεθος πόρων 0,2 μm.

2.5.2 Παρασκευή διαλύματος ONR7

Για την προετοιμασία του τεχνητού θαλασσινού νερού ONR7, που χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο, παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα. Όλα τα διαλύματα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε θερμοκρασία 120°C και σε πίεση 1.1bar για 20 λεπτά.

Διάλυμα 1 (σε 1L H₂O)

NaCl	113.95 g
Na ₂ SO ₄	19.9 g
KCl	3.6 g

NaBr	415 mg
NaHCO ₃	155 mg
H ₃ BO ₃	135 mg
NaF	13 mg
NH ₄ Cl	0.35 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	445 mg
TAPSO	6.5 g

Διάλυμα 2 (σε 500ml H₂O)

MgCl ₂ x 6H ₂ O	55.9 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	7.3 g
SrCl ₂ x 6H ₂ O	120 mg

Διάλυμα 3 (σε 100ml H₂O)

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

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

1. Ανάμειξη 200ml του διαλύματος 1 με 133 ml απιονισμένο νερό
2. Ρύθμιση του pH στο 7.6 με NaOH (2M)
3. Προσθήκη 100 ml από το διάλυμα 2 με 233 ml απιονισμένο νερό
4. Ανάμειξη 20 ml από το διάλυμα 3 με 213 ml απιονισμένο νερό

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

2.5.3 Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS)

Το PBS είναι ένα ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συχνά σε βιολογικές έρευνες. Αποτελείται από χλωριούχο νάτριο, φωσφορικό νάτριο και σε ορισμένες συνθέσεις από χλωριούχο κάλιο και φωσφορικό κάλιο. Το PBS βοηθάει στη διατήρηση ενός σταθερού pH και η ωσμωτικότητα του και οι συγκεντρώσεις ιόντων του συνήθως ταιριάζουν με αυτές του ανθρώπινου σώματος (ισοτονικό). Δεδομένου ότι δεν είναι τοξικό για τα κύτταρα, χρησιμοποιείται εκτενώς για έκπτυση κυττάρων και άλλων παρασκευασμάτων που μπορεί να αφήσουν ένα υπόλειμμα. Τέλος, η λεπτή μεμβράνη του νερού που συνδέεται με την ουσία αποτρέπει την μετουσίωση ή άλλες διαμορφωτικές αλλαγές (Protocols Online, 2016).

Για 1L από 1X PBS: (Protocols Online, 2016)

- Τοποθέτηση 800 ml απιονισμένου νερού
- Προσθήκη 8 g of NaCl.
- Προσθήκη 0.2 g of KCl.
- Προσθήκη 1.44 g of Na_2HPO_4 .
- Προσθήκη 0.24 g of KH_2PO_4 .
- Προσαρμογή του pH στο 7.4 με HCl.

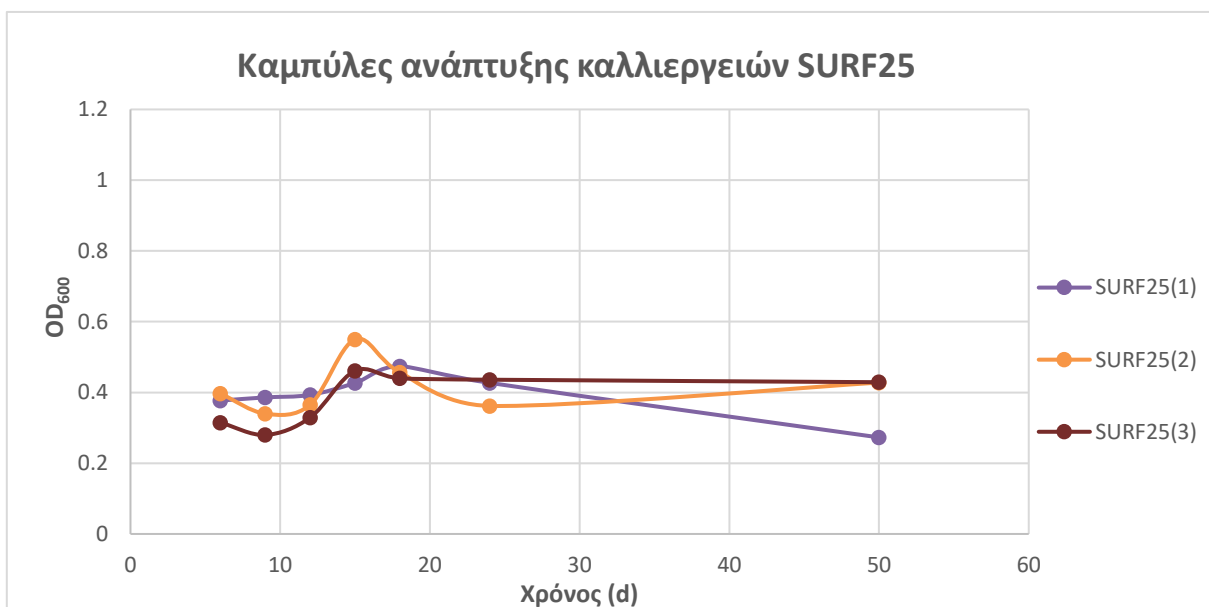
Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι η συνολική ποσότητα του διαλύματος να είναι 1L

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται οι καμπύλες ανάπτυξης των μικροβιακών κοινοτήτων για τα βαθιά και επιφανειακά νερά, καθώς επίσης και για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς και τη μικροβιακή κοινότητα E8. Επίσης, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τους τρεις ελέγχους που έγιναν για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων αλλά και εικόνων.

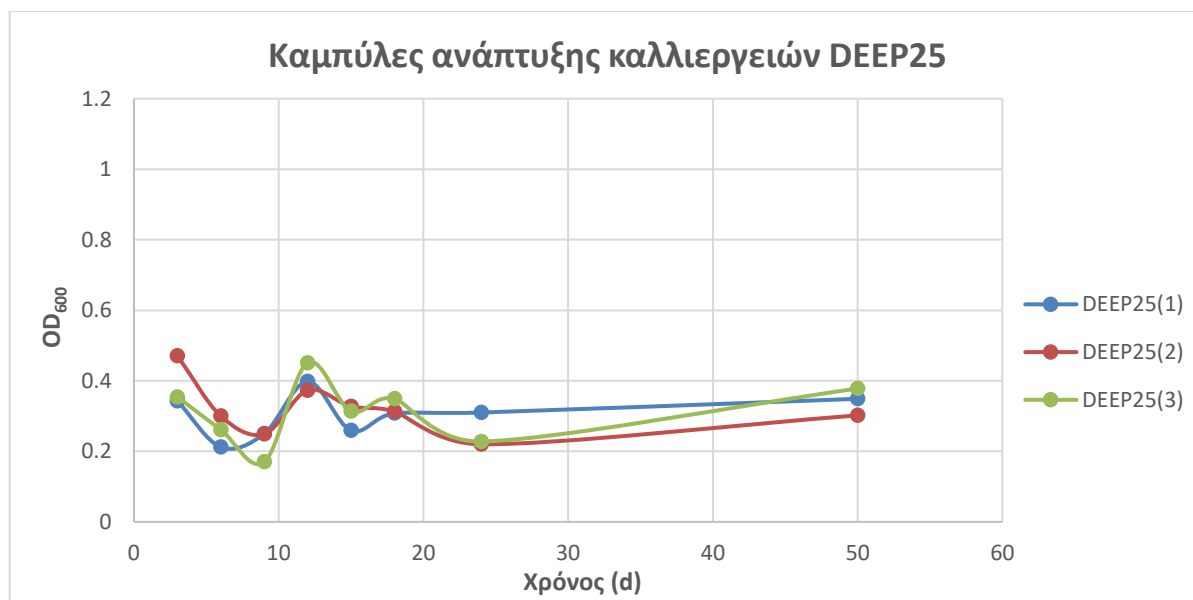
3.1 Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων

Στα διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των καλλιεργειών SURF25, DEEP25 και DEEP14 σε σχέση με το χρόνο για τις 50 μέρες που παρακολουθούνταν. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της βιομάζας είναι γραμμική συνάρτηση της οπτικής απορρόφησης και επομένως μέσω της τελευταίας μπορούν να εξαχθούν αποτελέσματα για την ανάπτυξη των μικροβιακών κοινοτήτων και των απομονωμένων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.



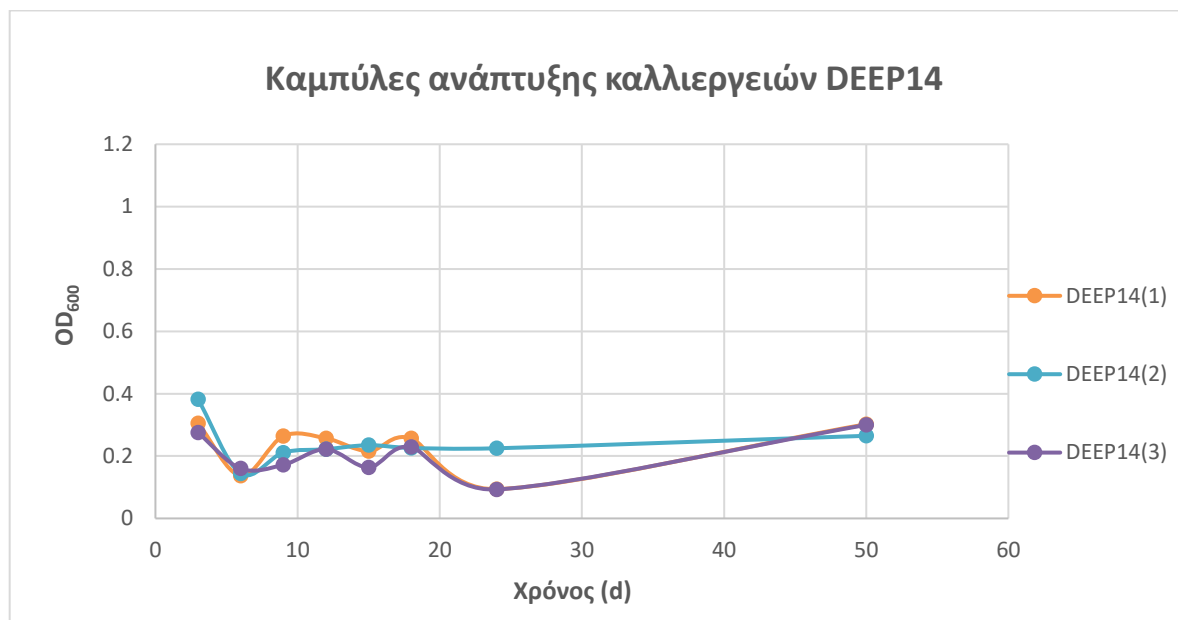
Διάγραμμα 3.1 - Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών επιφανειακών νερών στους 25°C.

Από το διάγραμμα 3.1 φαίνεται ότι οι καλλιέργειες επιφανειακών νερών δεν παρουσιάζουν αύξηση της ανάπτυξής τους και οι τιμές της οπτικής απορρόφησης είναι σχετικά σταθερές και κυμαίνονται μεταξύ 0.3-0.5.



Διάγραμμα 3.2 - Καμπύλες ανάπτυξης καλλιεργειών βαθιών νερών στους 25°C.

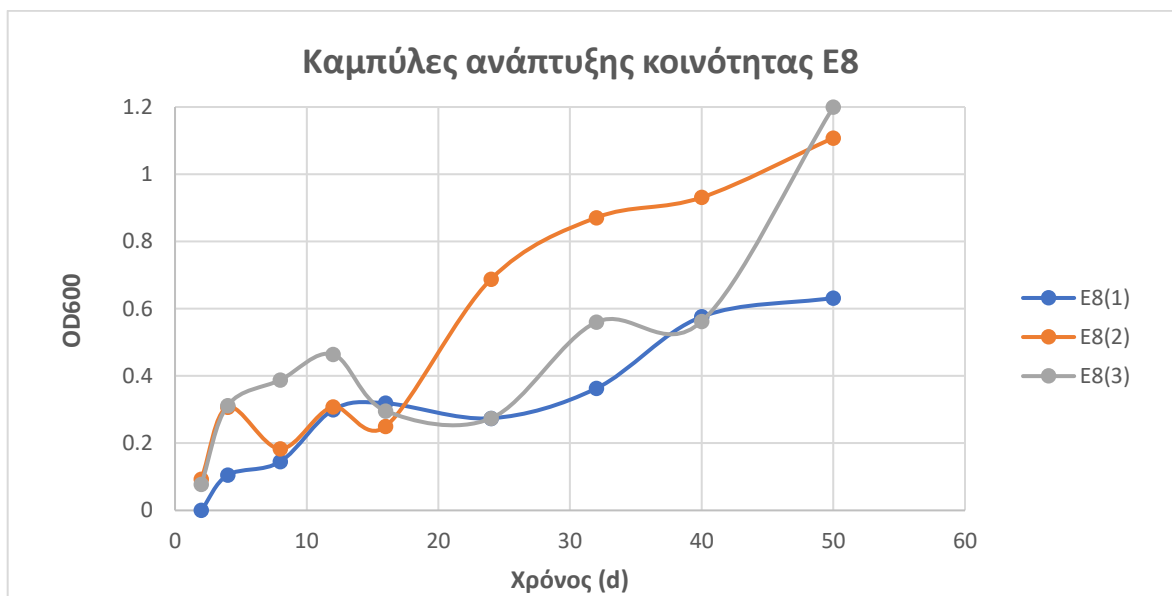
Βάσει του διαγράμματος 3.2, οι καλλιέργειες βαθιών νερών στους 25°C παρουσιάζουν αρκετές αυξομειώσεις στην καμπύλη ανάπτυξης της και στις 18 μέρες σταθεροποιούνται σε οπτική απορρόφηση περίπου 0.3.



Διάγραμμα 3.3 - Καμπύλες ανάπτυξης **καλλιεργειών** βαθιών νερών στους 14°C.

Από το διάγραμμα 3.3 παρατηρείται ότι οι καλλιέργειες βαθιών νερών στους 14°C παρουσιάζουν χαμηλές τιμές οπτικής απορρόφησης και η καμπύλη ανάπτυξης έχει μειωτικές τάσεις.

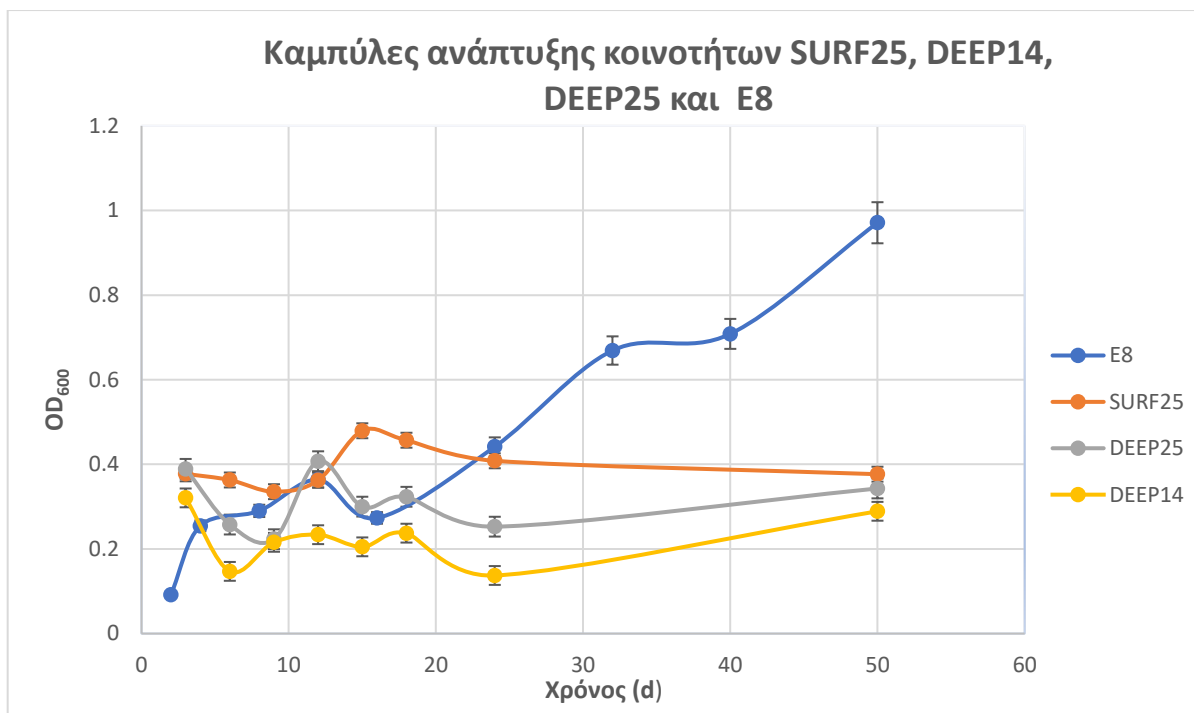
Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης για τις τρεις καλλιέργειες της μικροβιακής κοινότητας E8.



Διάγραμμα 3.4 – Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακής κοινότητας E8.

Παρατηρώντας το διάγραμμα 3.4 συμπεραίνεται ότι η οπτική απορρόφηση συνεχώς αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο και για τις τρεις καλλιέργειες και φτάνει μια υψηλή μέση τιμή, περίπου 1. Επίσης παρατηρείται ότι περίπου στις 18 μέρες ξεκινάει η συνεχόμενη αύξηση της οπτικής απορρόφησης.

Τέλος, στο διάγραμμα 3.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλες οι μικροβιακές κοινότητες που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, έχει κατασκευαστεί μία καμπύλη ανάπτυξης σε σχέση με το χρόνο για κάθε κοινότητα, η οποία προέκυψε από το μέσο όρο των τριών μετρήσεων που αντιστοιχούσαν στις τρεις καλλιέργειες κάθε κοινότητας. Επίσης, στο διάγραμμα φαίνεται η τυπική απόκλιση της κάθε μέτρησης.

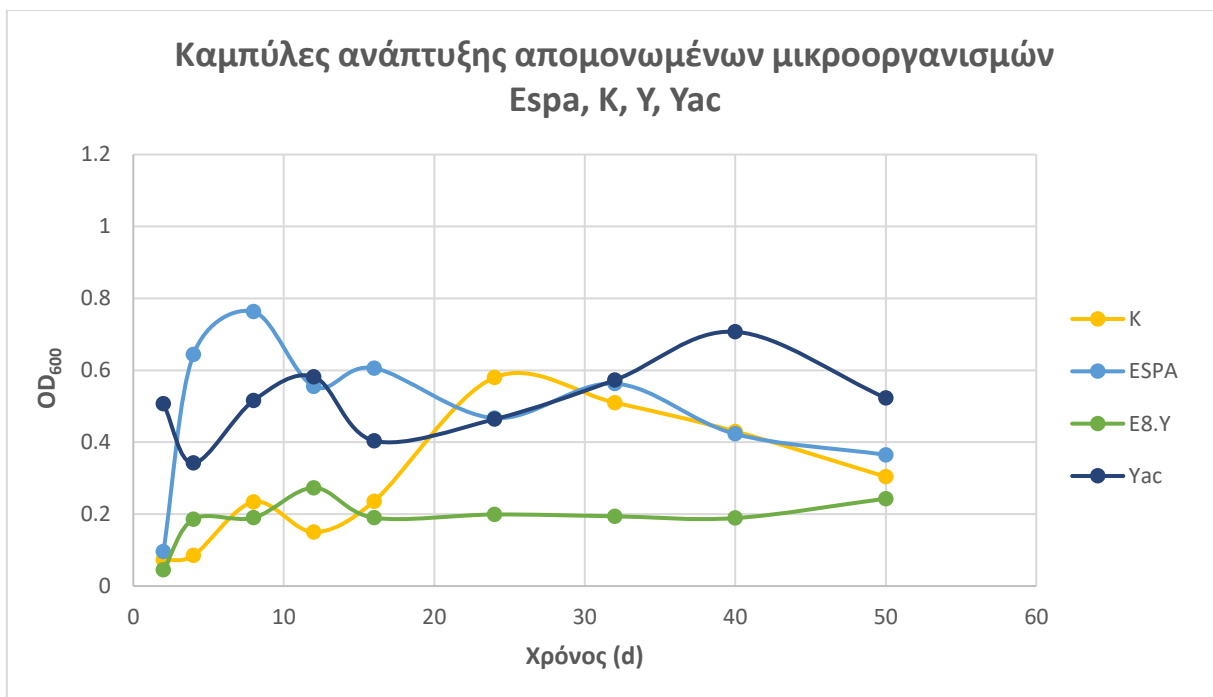


Διάγραμμα 3.5 - Καμπύλες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων επιφανειακών και βαθιών νερών και κοινότητας E8.

Από το διάγραμμα αυτό παρατηρείται ότι η κοινότητα E8 παρουσιάζει μια σταθερή αύξηση και η οπτική απορρόφηση φτάνει τιμή 1. Αντίθετα, η οπτική απορρόφηση στις κοινότητες βαθιών και επιφανειακών νερών παρουσιάζει αυξομειώσεις και οι τιμές είναι αρκετά πιο χαμηλές. Πιο συγκεκριμένα, οι πιο χαμηλές τιμές απορρόφησης εμφανίζονται στις κοινότητες των βαθιών νερών στους 14°C, ακολουθούν οι κοινότητες των βαθιών νερών στους 25°C, ενώ μια καλύτερη εικόνα εμφανίζεται στις κοινότητες επιφανειακών νερών. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι οι μεγαλύτερες αποκλίσεις παρουσιάζονται στην κοινότητα E8.

3.2 Καμπύλες ανάπτυξης απομονωμένων μικροοργανισμών

Στη συνέχεια αναλύονται οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί που προήλθαν από περιοχή ρυπασμένη με πετρελαιοειδή. Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των απομονωμένων μικροοργανισμών Esra, K, Y, Yac σε σχέση με το χρόνο.



**Διάγραμμα 3.6 - Καμπύλες ανάπτυξης απομονωμένων μικροοργανισμών
Espa, K, Y, Yac.**

Από το διάγραμμα 3.6 παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός Espa αυξάνεται τις πρώτες 8 περίπου μέρες όπου και φτάνει τη μέγιστη τιμή οπτικής απορρόφησης περίπου 0,8 και στη συνέχεια μειώνεται. Επίσης, ο μικροοργανισμός K αυξάνεται μέχρι και την 23η ημέρα, όπου παρουσιάζει μία μέγιστη τιμή 0,6 και στη συνέχεια μειώνεται. Όσον αφορά τον μικροοργανισμό Y παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς με μέγιστη τιμή 0,3. Τέλος, ο μικροοργανισμός Yac παρουσιάζει πολλές αυξομειώσεις στην οπτική απορρόφηση αλλά ταυτόχρονα οι τιμές είναι αρκετά υψηλές με μέγιστη τιμή 0,7.

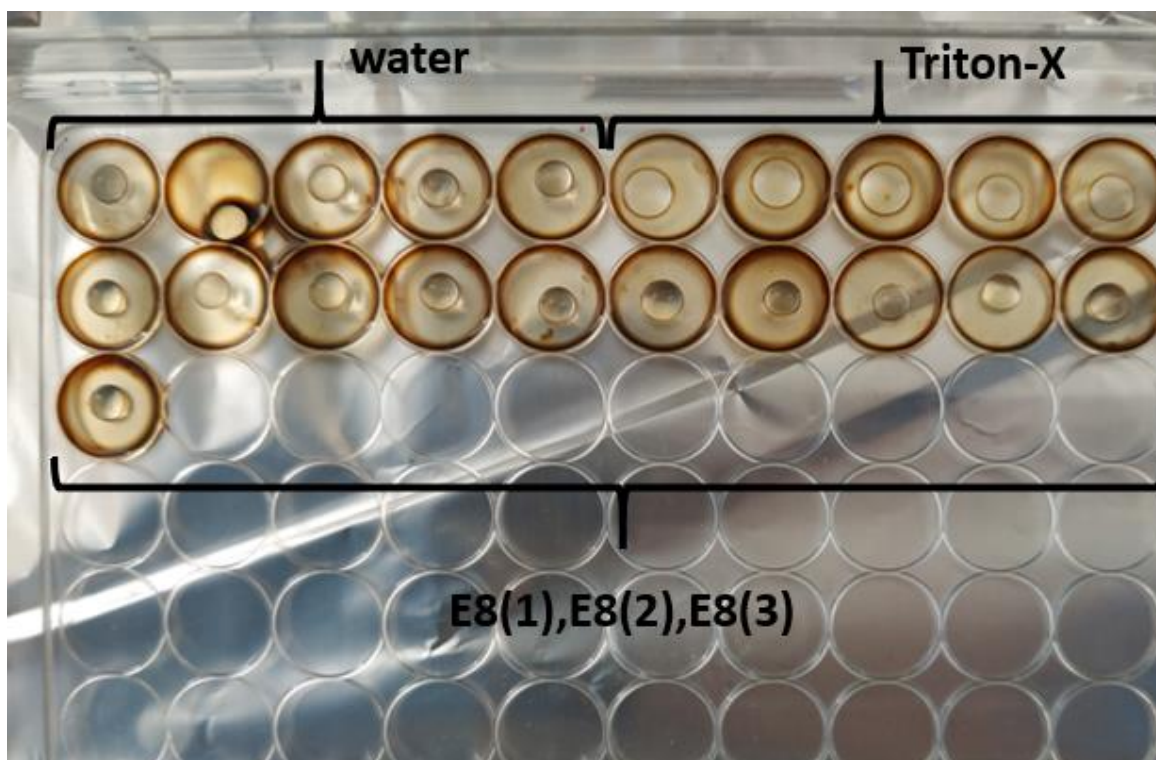
3.3 Biosurfactant tests

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των επιφανειοδραστικών oil begone και Triton-X, για τα τρία διαφορετικά test που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο επιφανειοδραστικών ουσιών ώστε να εξηγηθεί ο τρόπος λειτουργίας κάθε test. Στη συνέχεια αναλύονται για κάθε test τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν τόσο για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς, όσο και για τις μικροβιακές κοινότητες βαθιών και επιφανειακών νερών.

3.3.1 Drop Collapse Test

Το πρώτο test που πραγματοποιήθηκε για έλεγχο επιφανειοδραστικών ουσιών ήταν το drop collapse test. Σε αυτό ελέγχεται η διάμετρος της σταγόνας του δείγματος και για να υπάρχει

θετικό αποτέλεσμα πρέπει να είναι κατά 1 mm μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διάμετρο της σταγόνας του νερού. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζονται στην 1η γραμμή 5 επαναλήψεις με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια 5 επαναλήψεις με το επιφανειοδραστικό Triton-X με αραιώση 1:1000. Στη 2η σειρά έχουν γίνει οι δοκιμές για την μικροβιακή κοινότητα E8 για τη 12η μέρα πειράματος.



Εικόνα 3.1 – Drop collapse test για τη μικροβιακή κοινότητα E8 την 12η μέρα μαζί με θετικό και αρνητικό έλεγχο.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.1, είναι εμφανής η μεγαλύτερη διάμετρος του επιφανειοδραστικού Triton-X σε σχέση με την αντίστοιχη του νερού. Επίσης, η διάμετρος των σταγόνων της μικροβιακής κοινότητας E8 δεν παρουσιάζει διαφορές με τη διάμετρο της σταγόνας του νερού κι επομένως το αποτέλεσμα του test είναι αρνητικό.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο test είχε αρνητικά αποτελέσματα και δεν έδειξε ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών ούτε για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς και ούτε για τις μικροβιακές κοινότητες.

3.3.2 Emulsification test

Το δεύτερο test που πραγματοποιήθηκε για έλεγχο επιφανειοδραστικών ουσιών ήταν το emulsification test. Στο διάγραμμα 3.7 φαίνεται το ύψος γαλακτώματος για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι αραιώσεις

1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000 και μετρήθηκε το ύψος γαλακτώματος μετά από 24h όπως φαίνεται στον πίνακα 6.9 στο παράρτημα.

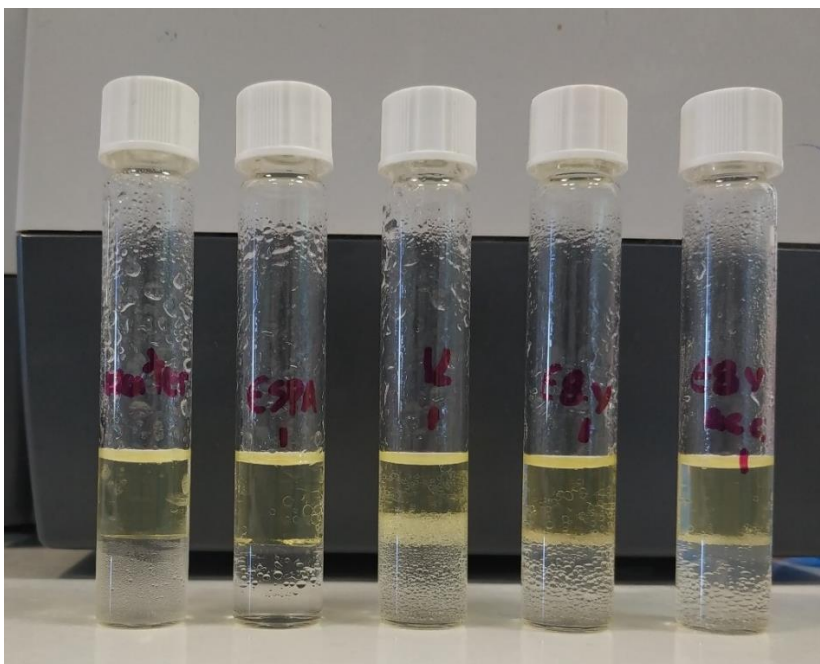


Διάγραμμα 3.7 – Ύψος γαλακτώματος για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone.

Στο διάγραμμα 3.7 παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ύψος γαλακτώματος παρουσιάζεται στην μικρότερη αραιώση 1:1000, ενώ είναι μηδενικό στις αραιώσεις 1:8000 και 1:10000. Επίσης, διαπιστώνεται ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός αραιώσης τόσο μειώνεται το ύψος γαλακτώματος.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του emulsification test στις μικροβιακές κοινότητες και τους απομονωμένους μικροοργανισμούς, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις άλλες δύο, πιθανώς λόγω της ευαισθησίας της. Ωστόσο, emulsification layer παρουσίασαν μόνο κάποιοι απομονωμένοι μικροοργανισμοί, ενώ οι κοινότητες βαθιών κι επιφανειακών νερών είχαν απλά ενδείξεις (φούσκες) για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 5-10 του παραρτήματος.

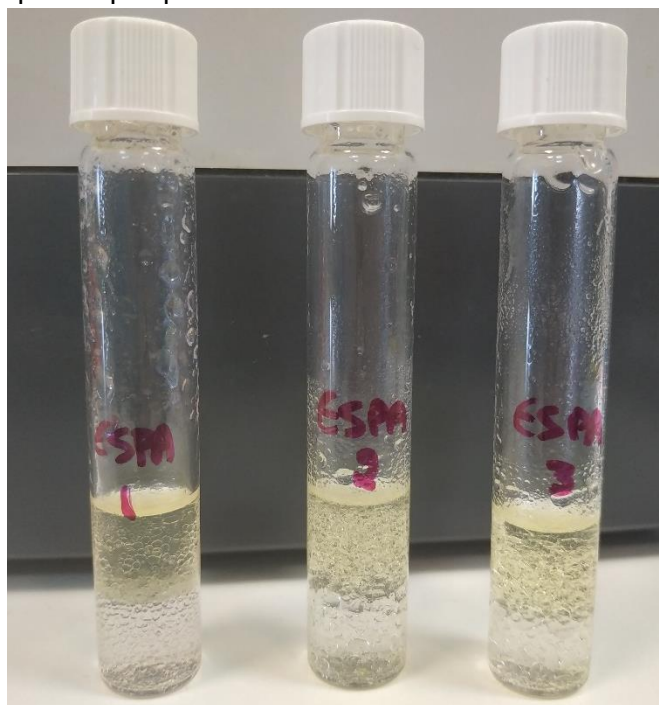
Στις εικόνες 3.2, 3.3 και 3.4 παρουσιάζονται οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί για διαφορετικές μέρες του πειράματος, τη 12η και την 24η για μετρήσεις που έγιναν μετά από 1 min.



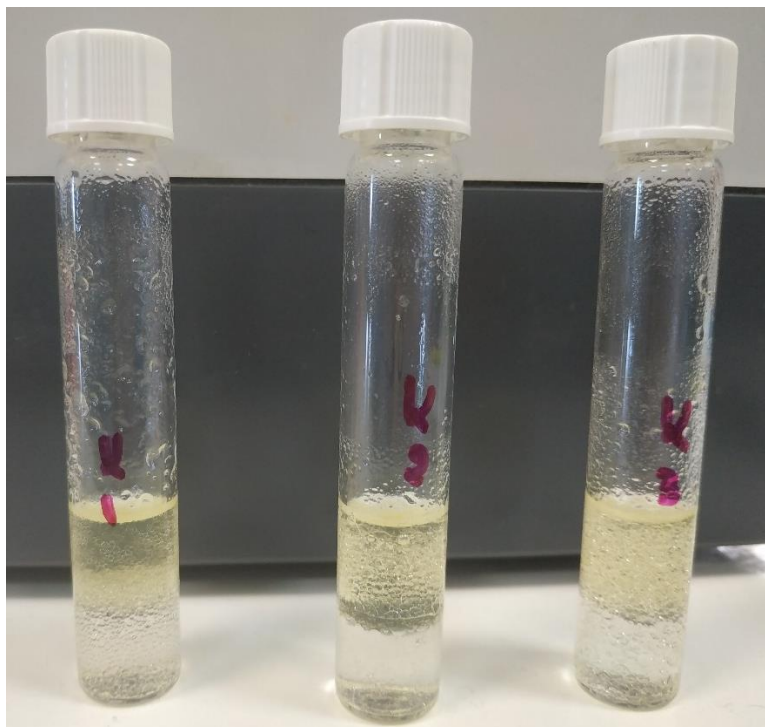
Εικόνα 3.2 – Emulsification test στους απομονωμένους μικροοργανισμούς τη 12η μέρα.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.2 που αφορά τη 12^η μέρα του πειράματος, διαπιστώνεται ότι για τον μικροοργανισμό Esra δεν υπάρχει καμία ένδειξη ύπαρξης επιφανειοδραστικών ουσιών, οι μικροοργανισμοί Υ και Υαc έχουν μερικές φούσκες, ενώ ο μικροοργανισμός Κ παρουσιάζει ύπαρξη emulsion layer.

Στις εικόνες 3.3 και 3.4 παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί Esra και Κ στην 24^η μέρα του πειράματος για μέτρηση που έγινε μετά από 1 min.



Εικόνα 3.3 – Emulsification test στον απομονωμένο μικροοργανισμό Esra την 24η μέρα.



Εικόνα 3.4 – Emulsification test στον απομονωμένο μικροοργανισμό K την 24η μέρα.

Και στις δύο παραπάνω εικόνες οι μικροοργανισμοί έχουν σχηματίσει emulsion layer που φαίνεται ως στρώμα γεμάτο φούσκες.

Στους πίνακες 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της κοινότητας E8 και των απομονωμένων μικροοργανισμών από το emulsification test για μετρήσεις μετά από 1 min και μετά από 24h. Πιο συγκεκριμένα, έχουν κατασκευαστεί heatmap και όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.1 έχει καθοριστεί ένα διαφορετικό χρώμα για κάθε αποτέλεσμα του emulsification test.

Πίνακας 3.1 – Υπόμνημα αποτύπωσης αποτελεσμάτων του Emulsification test.

	No sign of emulsion
	+
	++
	+++

Πίνακας 3.2 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για την κοινότητα E8.

Emulsification test after 1 min			
DAYS	12	24	50
E8			
E8			
E8			

Πίνακας 3.3 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για την κοινότητα E8.

Emulsification test after 24h			
DAYS	13	25	51
E8			
E8			
E8			

Παρατηρώντας τον πίνακα 3.2 τα αποτελέσματα του test δεν είναι απολύτως ξεκάθαρα. Ωστόσο, παρατηρείται ότι την 50η μέρα τα αποτελέσματα είναι αρκετά καλύτερα σε σχέση με τις πρώτες μέρες του πειράματος. Επίσης, είναι αντιληπτό ότι μετά από 24h δεν υπάρχουν ενδείξεις για ύπαρξη emulsion layer και επομένως ούτε BSs.

Στη συνέχεια, στους πίνακες 3.4 και 3.5 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Espa, Y, Yac.

Πίνακας 3.4 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Espa, Y, Yac.

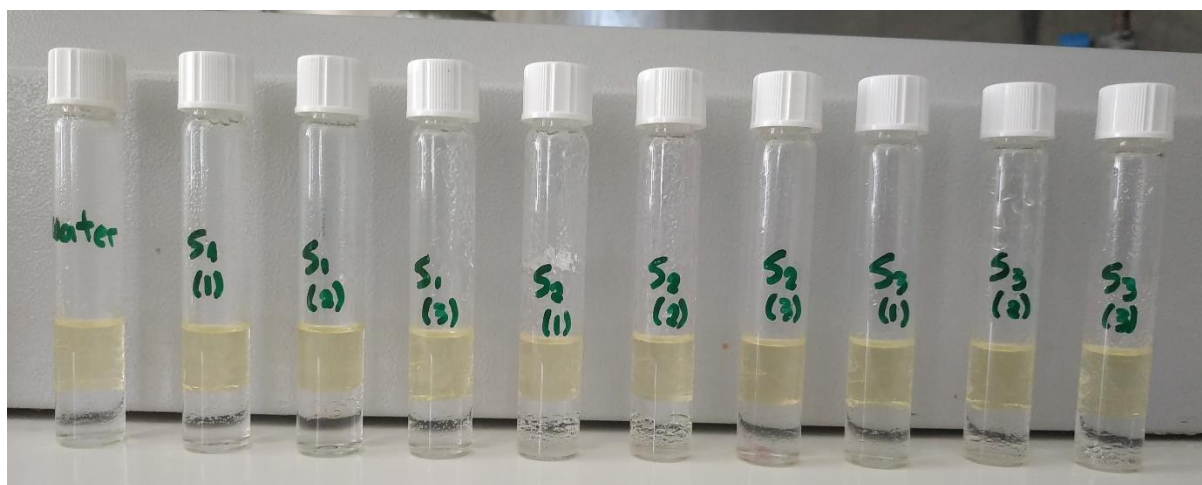
Emulsification test after 1 min			
DAYS	12	24	50
K			
Espa			
E8.Y			
Yac			

Πίνακας 3.5 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Espa, Y, Yac.

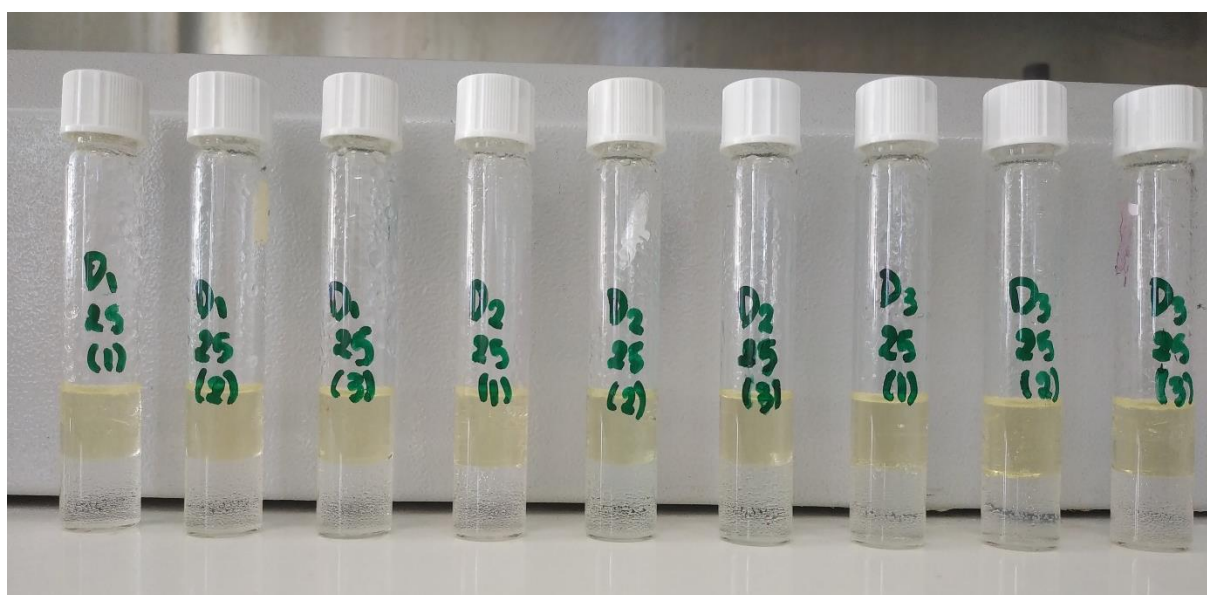
Emulsification test after 24h			
DAYS	13	25	51
K			
Espa			
E8.Y			
Yac			

Με βάση τους πίνακες 3.4 και 3.5 διαπιστώνεται ότι ο μικροοργανισμός Υac δεν έχει ενδείξεις ούτε μετά από 1 min ούτε μετά από 24h. Επίσης, όσον αφορά τους μικροοργανισμούς Esra και Υ ο πρώτος έχει πολύ καλύτερα αποτελέσματα και έχει παρουσιάσει emulsion layer μετά από 1 min, ενώ ο Υ παρουσιάζει ενδείξεις BSs την 50η μέρα. Τέλος, ο μικροοργανισμός Κ έχει τα καλύτερα αποτελέσματα, καθώς τόσο μετά από 1 min όσο και μετά από 24h, παρουσιάζει ύπαρξη emulsion layer.

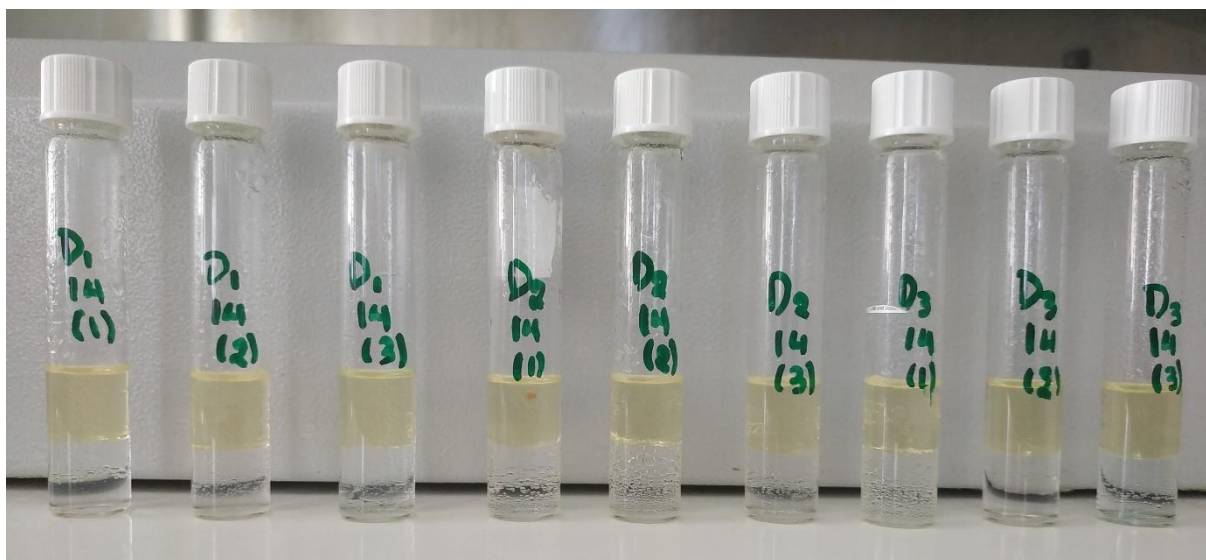
Στη συνέχεια, στις εικόνες 3.5, 3.6 και 3.7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του emulsification test για τις μικροβιακές κοινότητες DEEP14, DEEP25 και SURF25 για την 7η μέρα (μετά από 24h).



Εικόνα 3.5 – Emulsification test στην καλλιέργεια επιφανειακών νερών την 7η μέρα (μετά από 24h).



Εικόνα 3.6 – Emulsification test στην καλλιέργεια βαθιών νερών στους 25°C την 7η μέρα (μετά από 24h).



Εικόνα 3.7 – Emulsification test στην καλλιέργεια βαθιών νερών στους 14°C την 7η μέρα (μετά από 24h).

Από τις εικόνες 3.5, 3.6 και 3.7 παρατηρείται ότι η καλλιέργεια επιφανειακών νερών δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες ενδείξεις για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών.

Έπειτα ακολουθεί η καλλιέργεια βαθιών νερών στους 14°C όπου 4 από τα 9 δείγματα εμφανίζουν φούσκες και τέλος την καλύτερη εικόνα έχει η καλλιέργεια βαθιών νερών στους 25°C όπου σε όλα τα δείγματα εμφανίζονται φούσκες και στα περισσότερα καλύπτεται από αυτές μεγάλο μέρος του δείγματος.

Πίνακας 3.6 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 1 min για τις καλλιέργειες SURF25, DEEP25, DEEP 14.

Emulsification test after 1 min						
Days	6	12	18	24	50	
SURF25 (1)	Blue	Blue	Blue	Yellow	Blue	
SURF25 (2)				Yellow		
SURF25 (3)				Yellow		
DEEP25 (1)	Blue	Yellow	Blue	Yellow	Blue	
DEEP25 (2)		Blue		Yellow		
DEEP25 (3)		Yellow		Yellow		
DEEP14 (1)	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	
DEEP14 (2)						
DEEP14 (3)						

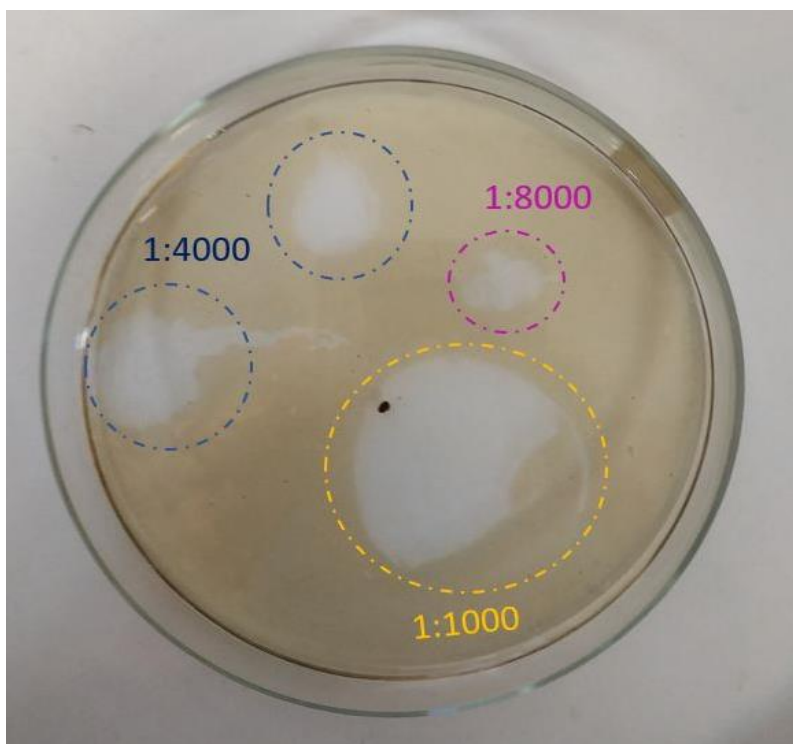
Πίνακας 3.7 – Αποτύπωση των αποτελεσμάτων του Emulsification test after 24h για τις καλλιέργειες SURF25, DEEP25, DEEP 14.

Emulsification test after 24h					
Days	7	13	19	25	51
SURF25 (1)					
SURF25 (2)					
SURF25 (3)					
DEEP25 (1)					
DEEP25 (2)					
DEEP25 (3)					
DEEP14 (1)					
DEEP14 (2)					
DEEP14 (3)					

Παρατηρώντας τους πίνακες 3.6 και 3.7 διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα του test είχαν λιγότερες ενδείξεις σε σύγκριση με τους απομονωμένους μικροοργανισμούς και την κοινότητα E8. Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να έχει η καλλιέργεια DEEP14 καθώς τόσο μετά από 1 min όσο και μετά από 24h έχει θετικά αποτελέσματα στο διάστημα των 50 ημερών. Επίσης η καλλιέργεια SURF25 παρουσιάζει ενδείξεις ύπαρξης BSs την 24η μέρα του πειράματος. Τέλος, όσον αφορά την καλλιέργεια DEEP25, φαίνονται θετικά αποτελέσματα την 7η μέρα αλλά μετά καμία ένδειξη για τις μετρήσεις μετά από 24 ώρες.

3.3.3 Oil spreading test

Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζεται η δοκιμή που έγινε με oil spreading test με το επιφανειοδραστικό Triton-X. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι αραιώσεις 1:1000, 1:4000 και 1:8000 και παρατηρήθηκε η ζώνη που σχηματίζεται χωρίς πετρέλαιο.



Εικόνα 3.8 – Oil Spreading Test για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού Triton-X.

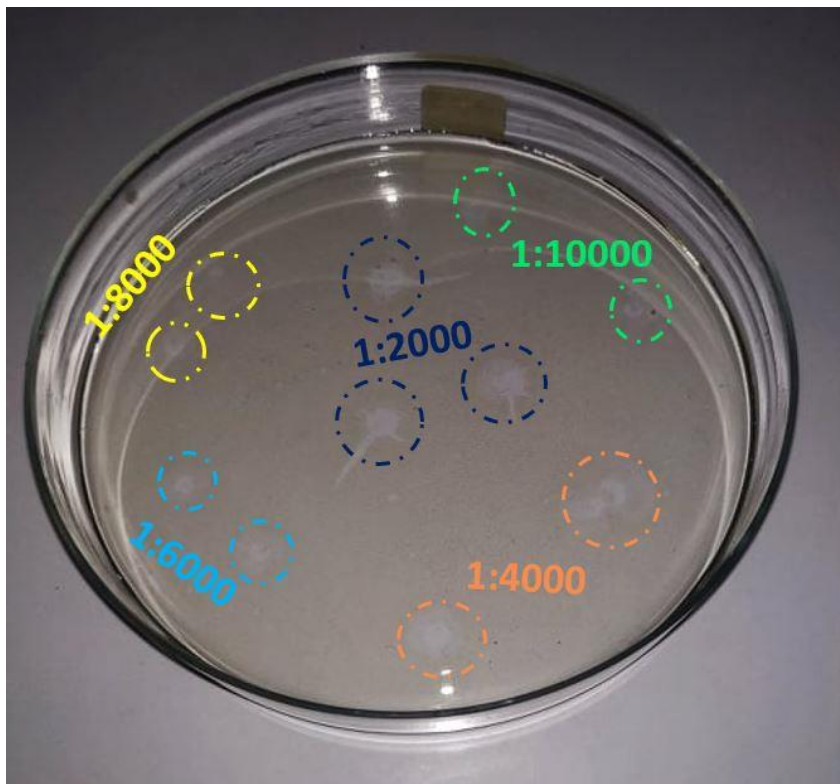
Έπειτα, μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης χωρίς πετρέλαιο για κάθε αραιώση, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.10 στο παράρτημα, και δημιουργήθηκε το διάγραμμα 3.8



Διάγραμμα 3.8 - Διάμετρος ζώνης χωρίς πετρέλαιο για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού Triton-X

Παρατηρώντας την εικόνα 3.2 και το διάγραμμα 3.8, συμπεραίνεται ότι όσο μικρότερη είναι η αραίωση τόσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος της ζώνης χωρίς πετρέλαιο κι επομένως τόσο πιο θετικό το αποτέλεσμα για ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών.

Τέλος, στην εικόνα 3.3 παρουσιάζεται η δοκιμή που έγινε για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι αραιώσεις 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000 και 1:10000 και παρατηρήθηκε η ζώνη που δημιουργείται χωρίς πετρέλαιο.



Εικόνα 3.9 – Oil spreading test για διαφορετικές αραιώσεις του επιφανειοδραστικού oil begone.

Τόσο στην εικόνα 3.2 όσο και στην εικόνα 3.3, παρατηρείται ότι η ζώνη χωρίς πετρέλαιο ήταν μεγαλύτερη για την αραίωση 1:2000 και μικρότερη έως ανύπαρκτη για την αραίωση 1:10000. Η μικρότερη διάμετρος της ζώνης χωρίς πετρέλαιο στην εικόνα 3.3 σε σχέση με την εικόνα 3.2, πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές αραιώσεις αλλά και στη διαφορετική φύση των επιφανειοδραστικών.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο test ήταν αρνητικό και δε δούλεψε για καμία από τις καλλιέργειες που μελετήθηκαν. Τόσο οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί, όσο και οι μικροβιακές κοινότητες έδειξαν με τη συγκεκριμένη μέθοδο ότι δεν παράγουν επιφανειοδραστικές ουσίες.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση- Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών σε μικροβιακές κοινότητες της Ανατολικής Μεσογείου κατά την αποικοδόμηση υδρογονανθράκων.

Βάσει των καμπυλών ανάπτυξης για τις μικροβιακές κοινότητες, διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια SURF25 δεν παρουσιάζει αύξηση της ανάπτυξής της και οι τιμές οπτικής απορρόφησης είναι σχετικά σταθερές και κυμαίνονται μεταξύ 0.3-0.5. Επίσης, η καλλιέργεια DEEP25 εμφανίζει αυξομειώσεις και στις 18 μέρες σταθεροποιείται σε οπτική απορρόφηση περίπου 0.3. Τέλος, η καλλιέργεια DEEP14 παρουσιάζει χαμηλές τιμές οπτικής απορρόφησης και η καμπύλη ανάπτυξής της έχει μειωτικές τάσεις. Οι αυξομειώσεις των καμπυλών ανάπτυξης οφείλονται πιθανώς στο γεγονός ότι οι καλλιέργειές μας περιείχαν αργό πετρέλαιο, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η τιμή της οπτικής απορρόφησης λόγω της θολερότητας του δείγματος.

Οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί και η κοινότητα E8 παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις κοινότητες SURF25, DEEP14 και DEEP25. Η κοινότητα E8 είχε την καλύτερη εικόνα με συνεχώς αυξανόμενη οπτική απορρόφηση με τελική μέση τιμή περίπου 1. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός K παρουσίασε αυξητική τάση μέχρι και την 23η περίπου ημέρα όπου έφτασε τη μέγιστη τιμή 0.6. Και ο μικροοργανισμός Esra παρουσίασε απότομη αύξηση και έφτασε την τιμή οπτικής απορρόφησης 0.8 την 10η μέρα κι έπειτα είχε μια σταθερή τιμή 0.5. Αντίθετα, ο μικροοργανισμός Yac είχε αρκετά χαμηλές τιμές οπτικής απορρόφησης οι οποίες ήταν σταθερές. Τέλος, ο μικροοργανισμός Y είχε πολλές αυξομειώσεις αλλά με σταθερά υψηλές τιμές οπτικής απορρόφησης.

Το oil spreading test και το drop collapse test ήταν δύο μέθοδοι που δεν έδειξαν αποτελέσματα, σε αντίθεση με το emulsification test. Αυτό δείχνει ότι το emulsification test ήταν καταλληλότερη και πιθανώς πιο ευαίσθητη μέθοδος για τον έλεγχο ύπαρξης BSs.

Τα αποτελέσματα των test για τις κοινότητες SURF25, DEEP14 και DEEP25 δεν έδειξαν ύπαρξη BSs. Το oil spreading test και το drop collapse test παρουσίασαν αρνητικά αποτελέσματα, ενώ στο emulsification test παρατηρήθηκαν ενδείξεις ύπαρξης BSs με την καλλιέργεια DEEP14 να παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, συγκρίνοντας τις καλλιέργειες βαθιών νερών DEEP14 και DEEP25, παρατηρήθηκε πτώση της παραγωγής των BSs με αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό δικαιολογείται, καθώς η δειγματοληψία έγινε σε βάθος 1500m όπου η θερμοκρασία ήταν στους 14°C και επομένως η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης τους είναι χαμηλή (14°C). Αυτό, θα μπορούσε να εξηγήσει την καλύτερη εικόνα αποτελεσμάτων στην καλλιέργεια DEEP14 σε σύγκριση με την καλλιέργεια DEEP25.

Όσον αφορά τους απομονωμένους μικροοργανισμούς, μόνο το emulsification test έδειξε ύπαρξη BSs. Συγκεκριμένα, για τους μικροοργανισμούς K και Esra δημιουργήθηκε emulsion layer, ο μικροοργανισμός Y παρουσίασε απλά ενδείξεις ύπαρξης επιφανειοδραστικών ουσιών, ενώ μικροοργανισμός Yac έδειξε αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον, είναι παράδοξο που η κοινότητα E8 δεν έδειξε ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών γιατί είχε την καλύτερη καμπύλη ανάπτυξης.

Συνολικά, οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί και η κοινότητα E8 παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή BSs, πράγμα που μπορεί να οφείλεται στο ότι προήλθαν από περιοχή ρυπασμένη με πετρελαιοειδή. Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλώνουν

υδρογονάνθρακες είναι άμεσα συνδεδεμένη με την έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Επομένως, περιβάλλοντα με πρόσφατη ή χρόνια ρύπανση πετρελαίου παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό των μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο σε σχέση με μη ρυπασμένες περιοχές. Επίσης, οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί είχαν καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις μικροβιακές κοινότητες, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ανταγωνιστικότητα που επικρατεί μεταξύ των μικροοργανισμών σε αυτές.

Σε μελλοντική έρευνα θα μπορούσαν να εξετασθούν τα εξής:

- Πραγματοποίηση πειράματος για την κοινότητα βαθιών νερών στους 14°C και στην πίεση που επικρατούσε στα 1500m βάθος από όπου έγινε η δειγματοληψία, γιατί οι διαφορετικές συνθήκες πίεσης πιθανώς επηρέασαν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
- Καταγραφή της ανάπτυξης των καλλιεργειών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, η οποία είναι πιο αξιόπιστη σε σχέση με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας εξαιτίας της ύπαρξης του πετρελαίου στα δείγματα.
- Απομόνωση των μικροοργανισμών που υπήρχαν στις κοινότητες βαθιών και επιφανειακών νερών και αυτόνομη μελέτη τους.
- Πραγματοποίηση ελέγχων ύπαρξης BSs με διαφορετικές μεθόδους μιας και 2 από τα 3 test που έγιναν είχαν αρνητικά αποτελέσματα.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

- Ahmad, Z., Arshad, M., Ashgar, H. N., Sheikh, M. A., & Crowley, D. E. (2015, Δεκέμβριος 15). Isolation, Screening and Functional Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Site. *International Journal of Agriculture & Biology*, 18, pp. 542-548.
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015, April 07). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Frontiers in microbiology*, p. 274.
- APHA, & AWWA. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.). Washington DC: American Public Health Association.
- Atlas, R., & Hazen, T. (2011). *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history*. California: ACS Publications.
- Banat, I., Makkar, R., & Cameotra, S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*(53), 495-508.
- Clark, Bernard, R., Frid, C., & Attrill, M. (2002). *Marine pollution* (5 ed.). Oxford: Clarendon Press.
- Congress US. (1991). *Office of technology assessment, bioremediation for marine oil spills- background paper*. Washington, DC: Government Printing Office OTA-BP-O-70.
- Daling, P., Aamo, O., Lewis, A., & Strøm-Kristiansen, T. (1997). *SINTEF/IKU OIL-WEATHERING MODEL: PREDICTING OILS' PROPERTIES AT SEA* (1η εκδ.). Νορβηγία: American Petroleum Institute.
- Dwight Powell. (2016). *Slide Player*. Ανάκτηση 09 12, 2020, από <https://slideplayer.com/slide/10852376/>
- ESA. (2020). *Πετρελαιοκηλίδες*. Retrieved 05 12, 2020, from https://www.esa.int/SPECIALS/Eduspace_Global_GR/SEMZR4SRJHG_0.html
- Gillespie, C. (2018, 04 13). *How Does Sonication Work?* Ανάκτηση 09 16, 2020, από Sciencing: <https://sciencing.com/purpose-electrophoresis-5426937.html>
- Greenpeace, B. D. (2015). *Greenpeace*. Ανάκτηση 5 17, 2020, από <https://www.greenpeace.org.au/blog/bp-oil-spill-5-years/>
- Hamam, S., Hamoda, M., Shaban, H., & Kilani, A. (1988). Crude oil dissolution in saline water. *Water, Air, and Soil Pollution*, σσ. 55-64.
- Hayes, M., Michel, J., Dahlin, J., & Barton, K. (1995). *IDENTIFYING AND MAPPING SENSITIVE RESOURCES FOR INLAND AREA PLANNING* (1 ed.). International Oil Spill Conference: American Petroleum Institute.

- IPECA. (1991). *A guide to contingency planning for oil spills on water*. International Petroleum Industry Environmental Conservation Association.
- ITOPF. (2011a). *Effects of oil pollution on the marine environment*. UK: International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF).
- ITOPF. (2019). *Oil Tanker Spill Statistics 2019*. UK: International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF).
- Kosaric, N., & Sukan, F. (2014). *Biosurfactants: production and utilization-processes, technologies, and economics*. Cleveland: CRC Press.
- Lee, D., Lee, H., Kwon, B., Khim, J., Yim, U., Kim, B., & Kim, J. (2018, Οκτώβριος). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Tae'an beach sediment. *Environmental Pollution*, σσ. 254-264.
- McCain Jr, W. (1990). *The Properties of Petroleum Fluids* (2η εκδ.). Tulsa, Oklahoma: PennWell Publishing Company.
- Menezes Bento, F., Oliveira Camargo, F., Okeke, B. C., & Frankenberger Jr., W. (2005, Ιούλιος 6). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, 160, pp. 249-255.
- Modeva, S. (2016). *Curious to Know and See: The Exxon Valdez Oil Spill - 27 Years Ago Today*. Vessel Finder.
- National Research Council, Board, Marine and Board, & Ocean Studies. (1985). *Oil in the sea III: inputs, Fates, and Effects* (1η εκδ.). Washington, DC: The National Academies Press.
- NOAA, & API. (1994). Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response. National Oceanic Atmospheric Administration.
- NOAA, & Whitney, J. (1994, Ιούνιος). SHORELINE COUNTERMEASURES MANUAL. Alaska: National Oceanic & Atmospheric Administration and American Petroleum Institute. Retrieved 05 24, 2020, from https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/shoreline_countermeasures_freshwater.pdf
- Protocols Online. (2016). *Protocols Online*. Ανάκτηση 09 05, 2020, από https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate-buffered_saline
- Thavasi, R., Sharma, s., & Jayalakshmi, S. (2011). Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 2(1).
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C., Zandile, M., Duan, Y., . . . Luo, X. (2018, July 18). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics sonochemistry*, σσ. 538-549.

- WHOI. (2014). *Woods Hole Oceanographic Institution*. Retrieved 6 6, 2020, from <https://www.whoi.edu/oilinocean/page.do?pid=53439&tid=201&cid=58913&ct=362#>
- Αλεξόπουλος, Α. (2009). *Διεθνές Περιβαλλοντικό Δίκαιο - Πανεπιστημιακές Σημειώσεις*. Λέσβος: Πανεπιστήμιο Αιγαίου.
- "Αρχή της φυγοκέντρωσης". (2019, 05 12). *schkola4kotovo*. Ανάκτηση 09 11, 2020, από <https://schkola4kotovo.ru/el/centrifugirovanie-princip-metoda-centrifugirovanie-v-laboratorii-metodika/>
- Βικιπαίδεια. (2010). *Φασματοφωτόμετρο*. Ανάκτηση 09 09, 2020, από <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A6%CE%B1%CF%83%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%86%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%BF>
- Γιατσιδής, Α., & Γιαντσελίδη, Ν. (2014). *Ο ρόλος του πετρελαίου και του φυσικού αερίου στην ελληνική και ευρωπαϊκή οικονομία*. Καβάλα: ΤΕΙ Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης.
- Καζαντζής, Ε. (2017). *Πετρέλαιο: Εμπόριο, Διάρκεια και η Εξάρτηση της ανθρωπότητας*. Χίος: Πανεπιστήμιο Αιγαίου.
- Καλογεράκης, Ν. (2013). *Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος (ΤΕΧΝΙΚΗ ΒΙΟ-ΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ) BIOREMEDIATION ΜΕΡΟΣ Ι - Σημειώσεις*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.
- Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., . . . Φούντζουλα, Χ. (2015). *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας: Βασικές Αρχές Φωτομετρίας* (1η εκδ.). Αθήνα: Εκδόσεις Κάλλιπος.
- Καρώνης, Δ., Λόης, Ε., Ζαννίκος, Φ., & Στούρνας, Σ. (2007). *Τεχνολογία πετρελαίου και φυσικού αερίου* (1η εκδ.). Αθήνα: ΕΜΠ.
- Κολοβού, Α. (2015). *Σαν Σήμερα/Exxon Valdez: Η πρώτη ασύλληπτη θαλάσσια καταστροφή στην Αμερική*. Ανάκτηση 5 18, 2020, από <https://www.lifo.gr/team/sansimera/56311>
- Κορακάκη, Ε. (2012). *Απομόνωση μικροβιακών κοινοτήτων που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή και παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.
- Κότρικλα, Ά. (2015). *Ναυτιλία και περιβάλλον : Ρύπανση από υδρογονάνθρακες πετρελαίου* (1η εκδ.). Αθήνα: Εκδόσεις Κάλλιπος.
- Μπορμπουδάκης, Μ. (2016). *Επίδραση βιο-τασιενεργών ουσιών στην αποδόμηση πετρελαιοειδών υδρογονανθράκων*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.
- Νικολοπούλου, Μ. (2005). *Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.
- Νικολοπούλου, Μ. (2013). *Oil spills bioremediation in marine environment: biofilm characterization round oil droplets*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.

- Συμεωνίδης, Γ. (2009). *Πετρελαϊκή ρυπανση από ατυχήματα δεξαμενόπλοιων, υπόθεση Exxon Valdez*. Πειραιάς: Τμήμα Ναυτιλιακών Σπουδών, Πανεπιστήμιο Πειραιά.
- Τσακίρογλου , Α.-Α. (2014). *Οικολογικές συνέπειες εξόρυξης και μεταφοράς πετρελαίου στο θαλάσσιο οικοσύστημα της Μεσογείου*. Χανιά: ΤΕΙ Κρήτης.
- Τσισκάκη , Ε. (2011). *Βιοαποδόμηση Πετρελαϊκών Υδρογονανθράκων σε Θαλάσσιο Περιβάλλον*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.
- Ψυλλάκη , Ε. (2014). *Έλεγχος Ρύπανσης Νερών-Σημειώσεις: Στοιχεία Ατομικής Φασματοσκοπίας*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.

Κεφάλαιο 6: Παράρτημα - Πίνακες Μετρήσεων

Πίνακας 6.1-Απορρόφηση της μικροβιακής κοινότητας E8 και των απομονωμένων μικροοργανισμών K, Espa, Y, Yac.

DAY	Οπτική απορρόφηση στα 600 nm						
	E8(1)	E8(2)	E8(3)	K	ESPA	Y	Yac
2	0.105	0.093	0.078	0.073	0.096	0.045	0.507
4	0.145	0.307	0.312	0.085	0.644	0.186	0.342
8	0.299	0.183	0.388	0.234	0.763	0.190	0.516
12	0.319	0.308	0.464	0.150	0.555	0.273	0.582
16	0.274	0.250	0.296	0.236	0.606	0.190	0.404
24	0.363	0.688	0.274	0.580	0.467	0.199	0.464
32	0.576	0.871	0.560	0.510	0.563	0.194	0.573
40	0.632	0.931	0.562	0.430	0.423	0.189	0.707
50	0.605	1.108	1.200	0.304	0.365	0.243	0.523

Πίνακας 6.2 -Απορρόφηση (OD) των μικροβιακών κοινοτήτων από βαθιά και επιφανειακά νερά.

	Οπτική απορρόφηση στα 600 nm								
	S1	S2	S3	D1 (25°C)	D2 (25°C)	D3 (25°C)	D1 (14°C)	D2 (14°C)	D3 (14°C)
3		0.487	0.268	0.343	0.471	0.354	0.305	0.382	0.275
6	0.377	0.397	0.315	0.212	0.300	0.261	0.137	0.144	0.16
9	0.386	0.340	0.280	0.250	0.249	0.170	0.264	0.211	0.172
12	0.393	0.365	0.329	0.398	0.373	0.451	0.257	0.222	0.222
15	0.427	0.550	0.461	0.259	0.327	0.314	0.216	0.235	0.164

18	0.474	0.457	0.440	0.308	0.313	0.349	0.257	0.226	0.229
24	0.427	0.362	0.436	0.310	0.220	0.228	0.094	0.225	0.093
50	0.273	0.428	0.429	0.349	0.302	0.378	0.302	0.265	0.300

Πίνακας 6.3 – Emulsification test after 1 min για την κοινότητα E8.

DAY	Emulsification after 1min (cm)		
	E8(1)	E8(2)	E8(3)
12	NA	++'	+'
24	+'	NA	NA
50	NA	++'	++'

Πίνακας 6.4 – Emulsification test after 24h για την κοινότητα E8.

DAY	Emulsification after 24h (cm)		
	E8(1)	E8(2)	E8(3)
13	NA	++'	NA
25	NA	NA	NA
51	NA	NA	NA

Πίνακας 6.5 – Emulsification test after 1 min για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Espa, Y, Yac.

DAY	Emulsification after 1min (cm)			
	K	ESPA	E8.Y	Yac
12	+++'	NA	++'	NA
24	+++'	+++'	NA	NA
50	+++'	++'	+'	NA

Πίνακας 6.6 – Emulsification test after 24h για τους απομονωμένους μικροοργανισμούς K, Espa, Y, Yac.

DAY	Emulsification after 24h (cm)			
	K	ESPA	E8.Y	Yac
13	++'	NA	NA	NA
25	+++'	++'	NA	NA
51	+++'	++'	+'	NA

Πίνακας 6.7 – Emulsification test after 1 min για τις κοινότητες των βαθιών και επιφανειακών νερών.

DAY	Emulsification after 1min (cm)								
	S1	S2	S3	D1 (25°C)	D2 (25°C)	D3 (25°C)	D1 (14°C)	D2 (14°C)	D3 (14°C)
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA
12	NA	NA	NA	+	NA	+	++	++	++
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	NA
24	+	+	+	+	++	NA	NA	+	+
50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Πίνακας 6.8 – Emulsification test after 24h για τις κοινότητες των βαθιών και επιφανειακών νερών.

DAY	Emulsification after 1min (cm)								
	S1	S2	S3	D1 (25°C)	D2 (25°C)	D3 (25°C)	D1 (14°C)	D2 (14°C)	D3 (14°C)
7	NA	+	+	++	++	++	NA	+	NA
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	NA
25	NA	+	+	NA	NA	NA	+	+	+
51	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Πίνακας 6.9 – Ύψος γαλακτώματος στο emulsification test για διαφορετικές αραιώσεις του oil begone.

Αραίωση	Ύψος γαλακτώματος (cm)
1:1000	1.67
1:2000	1.37
1:4000	0.77
1:6000	0.07
1:8000	0.00
1:10000	0.00

Πίνακας 6.10 – Διάμετρος ζώνης χωρίς πετρέλαιο στο oil spreading test για διαφορετικές αραιώσεις του Triton-X.

Αραίωση	Διάμετρος ζώνης χωρίς πετρέλαιο (cm)
1:1000	4
1:4000	2
1:8000	1.3