



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΡΥΓΑΝΑ ΣΩΤΗΡΙΑ

ΧΑΝΙΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ, 2022

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 σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας,
Τομέας Σχεδιασμού & Ανάπτυξης Περιβαλλοντικών Διεργασιών (II)**

**ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΡΥΓΑΝΑ ΣΩΤΗΡΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΓΟΝΤΙΚΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

Περίληψη

Το πετρέλαιο αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας από την παραγωγή του οποίου εξαρτάται η παγκόσμια οικονομία όχι μόνο τώρα αλλά και μελλοντικά. Δυστυχώς, όμως, τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί ατυχήματα τόσο κατά την εξόρυξη όσο και κατά τη μεταφορά του πετρελαίου μέσω των υδάτινων διαδρομών που προκάλεσαν τεράστια οικολογική καταστροφή.

Η παρούσα διπλωματική εργασία μέσω του πειραματικού μέρους που αποτελείται προσομοιώνει τη βιοεξυγίανση πετρελαίου σε θαλασσινό νερό από μικροοργανισμούς. Σκοπός ήταν η ανάπτυξη των βακτηρίων *Paracoccus*, *Alcanivorax venustensis* και *Alcanivorax borkumensis* σε υποστρώματα υδρογονανθράκων και πετρελαίου και κατ' επέκταση η αποικοδόμησή τους. Προκειμένου να μετρηθεί η ανάπτυξη του πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο (UV spectrophotometry) στα 600nm. Εκτός από την ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε και εκχύλιση του πετρελαίου από το βακτήριο *Paracoccus*, ώστε να διαπιστωθεί σε τι βαθμό έχει αποικοδομήσει το πετρέλαιο. Η ίδια διαδικασία έγινε και με τα βακτήρια *Alcanivorax venustensis* και *Alcanivorax borkumensis* με τη διαφορά ότι καθένα από τα δύο αναπτύχθηκε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, $T=14^{\circ}\text{C}$ και $T=25^{\circ}\text{C}$. Με το πέρας των εκχυλίσεων από τα βακτήρια, η ποσοτικοποίηση των υδρογονανθράκων, που αποτελούν μέρος του πετρελαίου και εξετάζονται, έγινε με την τεχνική αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπία μάζας (GC/MS), ώστε να διαπιστωθεί σε ποιες συνθήκες αναπτύσσονται καλύτερα οι μικροοργανισμοί.

Παρατηρήθηκε πως κανένα από τα παραπάνω βακτήρια δεν κατάφερε να αποικοδομήσει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) ενώ σε μεγάλο βαθμό έχει αποικοδομήσει τα αλκάνια το *Alcanivorax venustensis* στους 25°C .

Λέξεις-κλειδιά: υδρογονάνθρακες, πετρέλαιο, αλκάνια, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), *Paracoccus*, *Alcanivorax venustensis*, *Alcanivorax borkumensis*

Abstract

Oil is the most important source of energy on the production of which the world economy depends not only now but also in the future. Unfortunately, however, in recent years there have been recorded accidents both in the extraction and transport of oil through the water routes that have caused a huge ecological disaster.

The present dissertation through the experimental part, that constitutes it simulates the bioenforcement of oil in seawater by microorganisms. The main purpose was the bacterial growth of *Paracoccus*, *Alcanivorax venustensis* and *Alcanivorax borkumensis* in hydrocarbon and oil substrates and thus their degradation. In order to properly measure the bacterial population growth, a UV spectrophotometer was used at 600nm. Other than the bacterial growth an extraction of the oil from the bacterium *Paracoccus* was also carried out to determine to what extent the oil has degraded. The same procedure was done with the bacteria *Alcanivorax venustensis* and *Alcanivorax borkumensis* with the difference that each of the two developed at two different temperatures, T=14°C and T=25°C. At the end of the extractions from the bacteria, the quantification of hydrocarbons, which are part of the oil and are examined, was done with the technique of gas chromatography and mass spectroscopy (GC/MS) to see under which conditions microorganisms grow best.

It was observed that none of the above bacteria managed to degrade the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) while to a large extent *Alcanivorax venustensis* has degraded alkanes in 25°C.

Keywords: Hydrocarbons, crude oil, alkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Paracoccus*, *Alcanivorax venustensis*, *Alcanivorax borkumensis*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νίκο Καλογεράκη, επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της εργασίας και πολύ καλή συνεργασία. Ακόμη, ευχαριστώ την κ. Αντωνίου Ελευθερία, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τη βοήθειά της στην εκπόνηση των πειραμάτων. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Βούλα Φράγκου για τη μεγάλη βοήθειά της τόσο στο πειραματικό-εργαστηριακό μέρος όσο και στη συγγραφή των αποτελεσμάτων. Να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για το πνεύμα συνεργασίας που διατηρούν εντός του εργαστηρίου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Γοντικάκη Ευαγγελία για την πολύτιμη βοήθειά της και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη μεγάλη στήριξη της, συμπαράσταση, αγάπης και εμπιστοσύνης της μαζί με τις επιτυχίες και αποτυχίες όλα αυτά τα 5 χρόνια των σπουδών μου. Τέλος, ευχαριστώ βαθιά τους φίλους μου και ιδιαιτέρως τον Κόκκο Σπύρο και Κωστόπουλο Γιώργο για την αγάπη και εμψύχωση που μου έδωσαν αυτά τα χρόνια των σπουδών. Ευχαριστώ την Παρασκευάκη Ειρήνη και Σκινίτη Γεωργία, δύο ανθρώπους που γνώρισα στα Χανιά και αναπτύχθηκε μια όμορφη και ειλικρινής φιλία.

Πίνακας Περιεχομένων	
Περίληψη	4
Abstract.....	5
Ευχαριστίες	6
Κατάλογος Εικόνων	9
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Γραφημάτων	10
1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	11
1.2 Χημική σύσταση πετρελαίου	12
1.2.1. Κατηγορίες υδρογονανθράκων	13
1.3 Διύλιση πετρελαίου και προϊόντα διύλισης	14
1.4 Θαλάσσια ρύπανση	16
1.4.1 Exxon Valdez	17
1.4.2 Deepwater Horizon	19
1.5 Πετρελαϊκή ρύπανση στη Μεσόγειο	20
1.6 Επιπτώσεις πετρελαϊκής ρύπανσης	21
1.7 Αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων	22
1.7.1. Διαδικασίες γήρανσης πετρελαίου	22
1.7.2. Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων	24
1.8 Βιολογική απομάκρυνση πετρελαίου	26
1.8.1. Μεταβολισμός υδρογονανθράκων	26
1.8.2. Μηχανισμός βιοαποδόμησης	26
1.8.3. Βιοεξυγίανση	27
1.9 Επιφανειοδραστικές ουσίες.....	29
1.10 Μικροοργανισμοί-αποικοδομητές	29
2. Σκοπός πειράματος.....	32
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	33
3.1 Παρασκευή διαλυμάτων.....	33
3.2 Μέθοδοι πειραμάτων	34
3.3 Πειράματα	38
4. Πειραματικά Αποτελέσματα.....	48
4.1 Πείραμα 1. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων από το στέλεχος <i>Paracoccus</i> sp.....	48
4.2 Πείραμα 2. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων με προσθήκη πεπτόνης σε καλλιέργειες <i>Alcanivorax venustensis</i>	49

4.3 Πείραμα 3. Σύγκριση δύο στελεχών του γένους <i>Alcanivorax</i> σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.....	51
4.4 Σύγκριση ικανότητας αποικοδόμησης αλκανίων από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.....	52
5. Συμπεράσματα-Συζήτηση	55
6. Βιβλιογραφία.....	58
6.1 Ξένη βιβλιογραφία.....	58
6.2 Ελληνική βιβλιογραφία	59
6.3 Ιστοσελίδες.....	61

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1 Πως δημιουργήθηκε το πετρέλαιο.....	12
Εικόνα 1.2 Διαδικασία διύλισης πετρελαίου.....	15
Εικόνα 1.3 Προϊόντα διύλισης πετρελαίου.....	15
Εικόνα 1.4 Το ατύχημα του Exxon Valdez.....	17
Εικόνα 1.5 Δεξαμενόπλοιο Exxon Valdez.....	18
Εικόνα 1.6 Λιπαροί βράχοι σε τμήμα παραλίας στην Αλάσκα.....	18
Εικόνα 1.7 Deepwater Horizon.....	19
Εικόνα 1.8 Δορυφορική εικόνα από την πετρελαιοκηλίδα του Deepwater Horizon.....	20
Εικόνα 1.9 Ελικόπτερο της ιταλικής πετρελαϊκής εταιρίας ENI.....	21
Εικόνα 1.10 Το εμπορικό πλοίο Eurobulker X.....	21
Εικόνα 1.11 Καθαρισμός πετρελαιοκηλίδας από τη θάλασσα και ακτή.....	22
Εικόνα 1.12 Διαδικασίες γήρανσης πετρελαιοκηλίδας.....	24
Εικόνα 1.13 Σπρέι χημικών από αεροπλάνα και πλοιάρια.....	24
Εικόνα 1.14 Πλοiάριο συλλέγει το επιπλέον πετρέλαιο μετά την έκρηξη του Deepwater Horizon.....	25
Εικόνα 1.15 Επιτόπου ανάφλεξη στην κηλίδα του Deepwater Horizon.....	25
Εικόνα 1.16 <i>Paracoccus denitrificans</i>	30
Εικόνα 1.17 Αποικοδόμηση του πετρελαίου από το <i>Alcanivorax borkumensis</i>	31
Εικόνα 3.1 Φιαλίδια παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών.....	34
Εικόνα 3.2 Εκχύλιση υδρογονανθράκων. Στήσιμο πειράματος.....	35
Εικόνα 3.3 Χοάνη εκχύλισης.....	35
Εικόνα 3.4 Φιαλίδια (vials) των 4ml με πετρέλαιο-DCM.....	36
Εικόνα 3.5 SPE συσκευή.....	37
Εικόνα 3.6 Ανάπτυξη βακτηρίου <i>Paracoccus marcusii</i> σε θρεπτικό Marine Broth.....	40
Εικόνα 3.7 Φλάσκες με εξαδεκάνιο.....	41
Εικόνα 3.8 Φλάσκες με πετρέλαιο.....	41
Εικόνα 3.9 Φλάσκες με τις καλλιέργειες του πειράματος 2.....	44
Εικόνα 3.10 Καλλιέργεια με υπόστρωμα crude oil <i>Alcanivorax venustensis</i> 25°C.....	46

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Σύσταση αργού πετρελαίου.....	12
Πίνακας 3.1 Αναλυτικές ποσότητες καλλιεργειών πειράματος 1.....	41
Πίνακας 3.2 Αναλυτικές ποσότητες καλλιεργειών πειράματος 2.....	44
Πίνακας 3.3 Αναλυτικές ποσότητες καλλιεργειών πειράματος 3.....	46
Πίνακας 4.1 Αποικοδόμηση αλκανίων σε rpm εντός 14 ημερών.....	54

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1.1 Ποσοστό εισροών πετρελαίου στη θάλασσα μέσω πλοίων, θαλάσσιων δραστηριοτήτων αλλά και φυσικών πηγών (διαρροές).....	16
Γράφημα 4.1.α Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου <i>Paracoccus</i> sp. σε θρεπτικό ONR7 με εξαδεκάνιο, ναφθαλίνιο, αργό πετρέλαιο και Marine Broth.....	48
Γράφημα 4.1.β Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου <i>Paracoccus</i> sp. σε θρεπτικό ONR7 με εξαδεκάνιο, ναφθαλίνιο και αργό πετρέλαιο.....	49
Γράφημα 4.2.α Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου <i>Alcanivorax venustensis</i> σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο, ναφθαλίνιο, και σε ONR7 μαζί με πεπτόνη με δεκαεξάνιο και ναφθαλίνιο.....	50
Γράφημα 4.2.β Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου <i>Alcanivorax venustensis</i> σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο και ναφθαλίνιο.....	50
Γράφημα 4.3 Δείκτης γαλακτωματοποίησης των καλλιεργειών <i>Paracoccus</i> και <i>Alcanivorax venustensis</i> σε θερμοκρασία T=25°C. Υποστρώματα: εξαδεκάνιο, εξαδεκάνιο με πεπτόνη, ναφθαλίνιο, ναφθαλίνιο με πεπτόνη, Marine Broth και πετρέλαιο.....	50
Γράφημα 4.4 Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών των στελεχών <i>Alcanivorax borkumensis</i> & <i>Alcanivorax venustensis</i> σε crude oil και σε δύο θερμοκρασίες, T=25°C και T=14°C.....	52
Γράφημα 4.5 % αποικοδόμηση αλκανίων από το βακτήριο <i>Paracoccus</i> συγκριτικά με το <i>Alcanivorax borkumensis</i> και <i>Alcanivorax venustensis</i> σε θερμοκρασία T=25°C...53	
Γράφημα 4.6 % αποικοδόμηση αλκανίων από το στέλεχος <i>Alcanivorax venustensis</i> συγκριτικά με το <i>Alcanivorax borkumensis</i> σε θερμοκρασία T=14°C και T=25°C.....	54

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

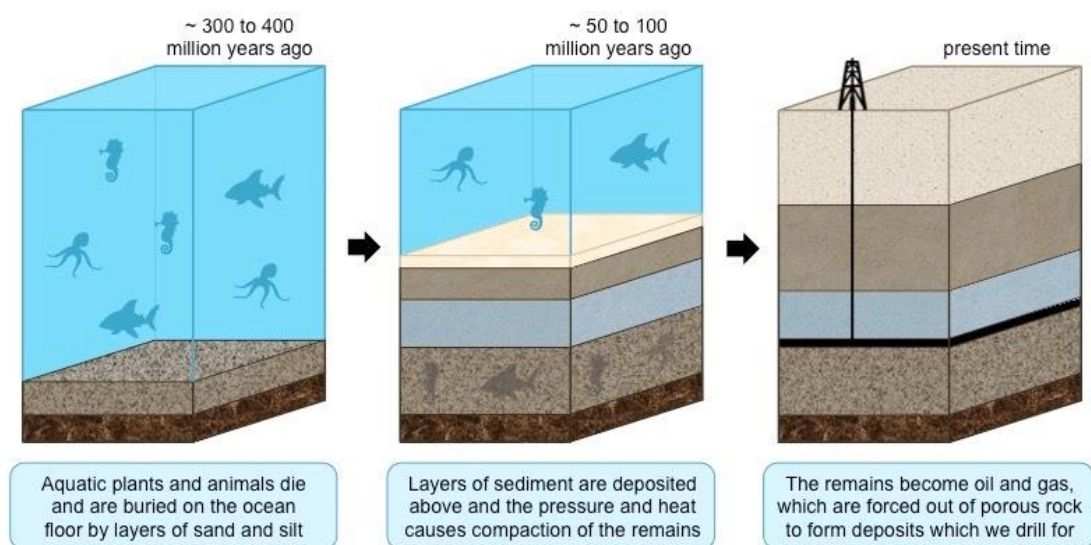
Το πετρέλαιο προέρχεται από την ελληνική λέξη *πέτρα* και τη λατινική λέξη *oleum* που σημαίνει λάδι. Η ονομασία αυτή χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από το Γερμανό ορυκτολόγο Agricola το 1556^[49]. Πρόκειται για ένα παχύρευστο μαύρο ή καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα που αποτελεί τη σημαντικότερη φυσική πηγή ενέργειας από την ανακάλυψή του μέχρι και σήμερα^[31]. Η πρώτη ένδειξη χρήσης πετρελαίου γίνεται στη Βίβλο, που αναφέρεται ότι ο Νώε επάλειψε την Κιβωτό πριν από τον κατακλυσμό με κάποιο υλικό ασφαλικής σύστασης^[49]. Η ύπαρξη του πετρελαίου είναι γνωστή από την αρχαία Ελλάδα καθώς ο Ηρόδοτος αναφέρει ότι στη Ζάκυνθο υπήρχε πηγάδι με άσφαλτο. Γνώστες, επίσης, της χρήσης του πετρελαίου ήταν και οι λαοί της Μεσοποταμίας (Σουμέριοι, Ασσύριοι, Βαβυλώνιοι). Ευρέως γνωστή ήταν η χρήση του στο καλαφάτισμα των πλοίων, κατασκευή καλαθιών και τη συγκόλληση των κομματιών του μωσαϊκού. Χρησιμοποιούνταν, ακόμη, στην ιατρική σαν καθαρτικό, υγρό εντριβών και απολυμαντικό. Οι αρχαίοι Έλληνες ήξεραν καλά τις χρήσεις του, ωστόσο δεν τις μετέδωσαν στους Ρωμαίους κατακτητές. Επιπλέον, το «υγρό πυρ» των Βυζαντινών είχε κατά πάσα πιθανότητα ως βάση το πετρέλαιο. Μέχρι τις αρχές του 19^{ου} αιώνα το πετρέλαιο χρησιμοποιούνταν ως φωτιστικό. Η πρώτη γεώτρηση ειδικά για αναζήτηση πετρελαίου έγινε από τον Edwin Drake στη δυτική Πενσυλβάνια τον Αύγουστο του 1859 σε βάθος 21m. Την ίδια περίπου περίοδο πετρελαϊκά πεδία ανακαλύφθηκαν σε Ευρώπη και Άπω Ανατολή. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1891 έγινε η πρώτη άντληση πετρελαίου από υποθαλάσσια πηγάδια που βρίσκονταν σε περιοχή με γλυκό νερό, στη λίμνη Grand Lake St. Mary's. Πέντε χρόνια αργότερα, το 1896, αντλήθηκε πετρέλαιο από υποθαλάσσια πηγάδια στην περιοχή που βρίσκεται το κανάλι Santa Barbara στην Καλιφόρνια. Με την αρχή του 20^{ου} αιώνα και τη Βιομηχανική Επανάσταση, η πετρελαϊκή βιομηχανία έγινε η πρώτη πηγή ενέργειας στον κόσμο. Σήμερα το πετρέλαιο αποτελεί την πρώτη ύλη στη βιομηχανία των πετροχημικών, αλλά τη βασική εφαρμογή τη βρίσκει στην παραγωγή ενέργειας από την οποία εξαρτάται η παγκόσμια οικονομία^{[49],[32]}.

Για τη δημιουργία του πετρελαίου υπάρχουν πολλές θεωρίες. Παλαιότερα οι χημικοί και γεωλόγοι δέχονταν ότι το πετρέλαιο σχηματίστηκε από ανόργανες πρώτες ύλες, θεωρία που σήμερα έχει εγκαταλειφθεί. Η επικρατέστερη θεωρία, που είναι και αποδεκτή, ανάγει τη δημιουργία του πετρελαίου σε φυτικές και ζωικές πρώτες ύλες^[30].

Ο γεωλόγος Henry Potonié δέχτηκε πως το πετρέλαιο είναι προϊόν αποσύνθεσης ζωικών και φυτικών οργανισμών που εγκλωβίστηκαν στα πετρώματα σε μεγάλο βάθος της Γης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αποσύνθεση περιλάμβανε κυρίως θαλάσσιους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς οι οποίοι θάφτηκαν κάτω από διαδοχικές στιβάδες λάσπης πριν από 400-500 εκατομμύρια χρόνια. Η αρχική προϋπόθεση για δημιουργία πετρελαίου σε τέτοιες ποσότητες είναι η ύπαρξη μια ρηχής θάλασσας πλούσιας σε φυτά και ζώα από πολύ μικρά έως πολύ μεγάλα. Η δεύτερη προϋπόθεση είναι ότι πεθαίνοντας οι οργανισμοί βουλιάζουν και θάβονται κάτω από τη λάσπη. Το οξυγόνο στο βυθό απαιτείται να είναι περιορισμένο, ώστε η διαδικασία της αποσύνθεσης να είναι αργή. Με το πέρασμα των χρόνων η λάσπη και ο πηλός κάθονται πάνω στις αποθέσεις δημιουργώντας μ' αυτόν τον τρόπο τεράστιες πιέσεις. Έτσι, κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες, χημικές διεργασίες μετέτρεψαν τους οργανισμούς σε πετρέλαιο και αέριο^{[27],[50],[51]} (Εικόνα 1.1).

Η θεωρία αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι στο πετρέλαιο βρέθηκαν ίχνη χλωροφύλλης και αίμης. Η ύπαρξη αυτών των ενώσεων αποδεικνύει τη ζωική και φυτική προέλευση καθώς και ότι η δημιουργία του πετρελαίου έγινε κάτω από ήπια βιολογική δράση,

αφού οι ενώσεις αυτές αποσυντίθενται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 250°C. Τέλος, η θεωρία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα πετρέλαια εντοπίζονται κυρίως σε ιζηματογενή πετρώματα ενώ στη βάση των κοιτασμάτων βρίσκεται σχεδόν πάντα αλμυρό νερό^{[27],[50],[51]}.



Εικόνα 1.1: Πως δημιουργήθηκε το πετρέλαιο. Πηγή: ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-4-ecology/43-carbon-cycling/fossil-fuels.html

1.2 Χημική σύσταση πετρελαίου

Το αργό πετρέλαιο είναι μίγμα υδρογονανθράκων (C & H_2) ενώ περιέχει και κάποιες ποσότητες οργανικών ουσιών που περιέχουν θείο (S), οξυγόνο (O_2) και άζωτο (N_2). (Πίνακας 1.1). Η σύστασή του μπορεί να διαφέρει ανάλογα την τοποθεσία, ηλικία, το χρόνο και το βάθος εξόρυξης^{[28],[29]}. Η ποσοστιαία αναλογία του άνθρακα και του υδρογόνου σε διαφορετικούς τύπους πετρελαίου ποικίλλει μεταξύ 83%-87% για τον άνθρακα και 11%-14% για το υδρογόνο^[27]. Όπως αναφέρθηκε τ' άλλα στοιχεία βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, όμως το θείο μπορεί να φτάσει σε περιεκτικότητα 8%, όπως συμβαίνει στο πετρέλαιο που εξορύσσεται από το Ιράκ^{[26],[28],[29],[30]}.

Πίνακας 1.1: Σύσταση αργού πετρελαίου. Πηγή: Τεχνολογία Πετρελαίου και Φυσικού Αερίου. Αργό Πετρέλαιο, Χαρακτηριστικά-Ιδιότητες. Εργαστήριο τεχνολογίας καυσίμων και λιπαντικών, ΕΜΠ.

Στοιχεία	Περιεκτικότητα (% w/w)
Άνθρακας (C)	83.90-86.80
Υδρογόνο (H_2)	11.40-14.00
Θείο (S)	0.06-8.00
Άζωτο (N_2)	0.11-1.70
Οξυγόνο (O_2)	0.50
Μέταλλα (Fe, V, Ni)	0.03

Οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσεται το αργό πετρέλαιο είναι οι *παραφινικοί υδρογονάνθρακες* που αποτελούν το 50% της μάζας των ελαφρών κλασμάτων (μεθάνιο προπάνιο), οι *ναφθениκοί*, που περιέχονται σ' όλα τα πετρελαϊκά κλάσματα.

Τέτοιο πετρέλαιο είναι εκείνο που προέρχεται από την Βενεζουέλα. Τελευταία κατηγορία είναι οι *αρωματικοί υδρογονάνθρακες* με χαρακτηριστικό παράδειγμα το βενζόλιο^{[26],[28],[29]}.

Κάποιες από τις ιδιότητες του αργού πετρελαίου είναι οι παρακάτω:

- Ο φθορισμός του πετρελαίου μπορεί να είναι πράσινος αν υπάρχουν παραφινικοί υδρογονάνθρακες ή μπλε αν υπάρχουν ναφθενικοί^[26].
- Δυσάρεστη οσμή λόγω παρουσίας ενώσεων θείου^[26].
- Το ιξώδες ποικίλει και είναι συνάρτηση της περιεκτικότητας σε ελαφρά κλάσματα^[26].
- Εύφλεκτο υγρό με σημείο ανάφλεξης στους 30°C^[26].
- Το ειδικό βάρος είναι μεταξύ 0.750-1.06N/m³^[26].
- Η πυκνότητα είναι μεταξύ 0.73-1.04g/cm³^[52].
- Θερμαντική ικανότητα 10400-11000kcal/g^[52].

Το αργό πετρέλαιο πριν τη μεταφορά του αφυδατώνεται και σταθεροποιείται για να απομακρυνθούν τα μη συμπεκνωμένα και ασφυξιογόνα αέρια, το νερό και οι προσμίξεις^[26].

1.2.1. Κατηγορίες υδρογονανθράκων

Οι υδρογονάνθρακες είναι ενώσεις αποτελούμενες μόνο από άτομα άνθρακα (C) και υδρογόνου (H) συνδεδεμένα μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι ενώσεις αυτές χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τη διάταξη των ατόμων. Οι δύο ομάδες είναι οι αρωματικοί και οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες^[9].

Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatics Hydrocarbons)

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ-ΡΑΗ) αποτελούν κατηγορία εκατοντάδων οργανικών ενώσεων που αποτελούνται από ενωμένους δακτυλίους βενζολίου και συχνά βρίσκονται μαζί σε ομάδες δύο ή περισσότερων^[7]. Οι δακτύλιοι μπορεί να βρίσκονται σε ευθεία γραμμή, να σχηματίζουν γωνίες ή/και να δημιουργούν συστάδα^[8]. Τα ΡΑΗ βρίσκονται φυσικά στο περιβάλλον αλλά κυρίως είναι αποτέλεσμα των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων και συγκεκριμένα της ατελούς καύσης των ορυκτών καυσίμων. Άλλες πηγές είναι η ηφαιστειογενής δραστηριότητα, δασικές πυρκαγιές, ο καπνός των τσιγάρων^[8]. Έχει διαπιστωθεί ότι το 90% των ΡΑΗ στο περιβάλλον που βρίσκονται στο έδαφος είναι λιγότερο εκτεθειμένα σε φωτοχημικές και βιολογικές διεργασίες αποδόμησης^[8]. Τα ΡΑΗ αποτελούν τη λιγότερο πτητική κατηγορία υδρογονανθράκων και έχουν υψηλότερα σημεία ζέσεως συγκριτικά με τα ν-αλκάνια με τον ίδιο αριθμό ατόμων. Τέλος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκονται σε κρυσταλλική στερεή μορφή ενώ οι μεγάλες μοριακές μάζες και η έλλειψη πολικών υποκατάστατων τους καθιστούν δυσδιάλυτος στο νερό^[40].

Αλειφατικοί (μη αρωματικοί) Υδρογονάνθρακες-Αλκάνια

Οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από άτομα C και H διατεταγμένα σε ευθείες αλυσίδες, διακλαδισμένες ή μη αρωματικές δομές δακτυλίου. Τα άτομα συνδέονται μεταξύ τους μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες μπορούν να βρεθούν σε τρεις τύπους, αλκάνια, αλκένια και αλκίνια. Επίσης, υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες, ως κορεσμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες και ως ακόρεστοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ανάλογα με την παρουσία ή όχι διπλών δεσμών. Τα αλκάνια, για παράδειγμα, είναι κορεσμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες καθώς αποτελούνται μόνο από απλούς δεσμούς σίγμα^[9].

Τα αλκάνια αποτελούν τις πιο απλές οργανικές ενώσεις με χημικό τύπο C_nH_{2n+2} . Κάθε άτομο άνθρακα έχει τέσσερις ομοιοπολικούς δεσμούς (C-C ή C-H) και κάθε άτομο υδρογόνου έχει έναν ομοιοπολικό δεσμό μ' ένα άτομο άνθρακα. Μια σειρά αποτελούμενη από άτομα άνθρακα και υδρογόνου ονομάζεται ανθρακική αλυσίδα. Όλα τα αλκάνια είναι άοσμα, άχρωμα και από χημικής άποψης δεν είναι πολύ δραστικά. Τέλος, τα αλκάνια χρησιμεύουν στη σύνθεση πολυμερών, ως ενδιάμεσα στην παραγωγή εντομοκτόνων, βαζελίνης, ασφάλτου κ.α., ενώ αποτελεί βασικό συστατικό του πετρελαίου και του φυσικού αερίου^{[10],[41]}.

Ολικοί Πετρελαϊκοί Υδρογονάνθρακες (Total Petroleum Hydrocarbons-TPH)

Ο όρος αυτός περιγράφει μία μεγάλη ομάδα με εκατοντάδες χημικές οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο πετρέλαιο και σε προϊόντα αυτού^[25]. Τα TPH είναι μίγμα οργανικών ουσιών που αποτελούνται κυρίως από άνθρακα και υδρογόνο. Χημικές ουσίες που ενδέχεται να βρεθούν στα TPH είναι το βενζόλιο, τολουόλιο, εξάνιο και ναφθαλίνη^[25]. Η όψη των TPH διαφέρει ανάλογα τη χημική ουσία, τα οποία εμφανίζονται ως υγρά μ' ανοιχτόχρωμο ή διαφανές χρώμα που εξατμίζονται γρήγορα ή ως σκούρα και ημιστερεά υγρά που δεν εξατμίζονται^[25]. Τα TPH εισέρχονται στο περιβάλλον από ατυχήματα και διαρροές πετρελαίου, απορρίψεις βιομηχανικών προϊόντων και χρήση φυτοφαρμάκων^[25].

1.3 Διύλιση πετρελαίου και προϊόντα διύλισης

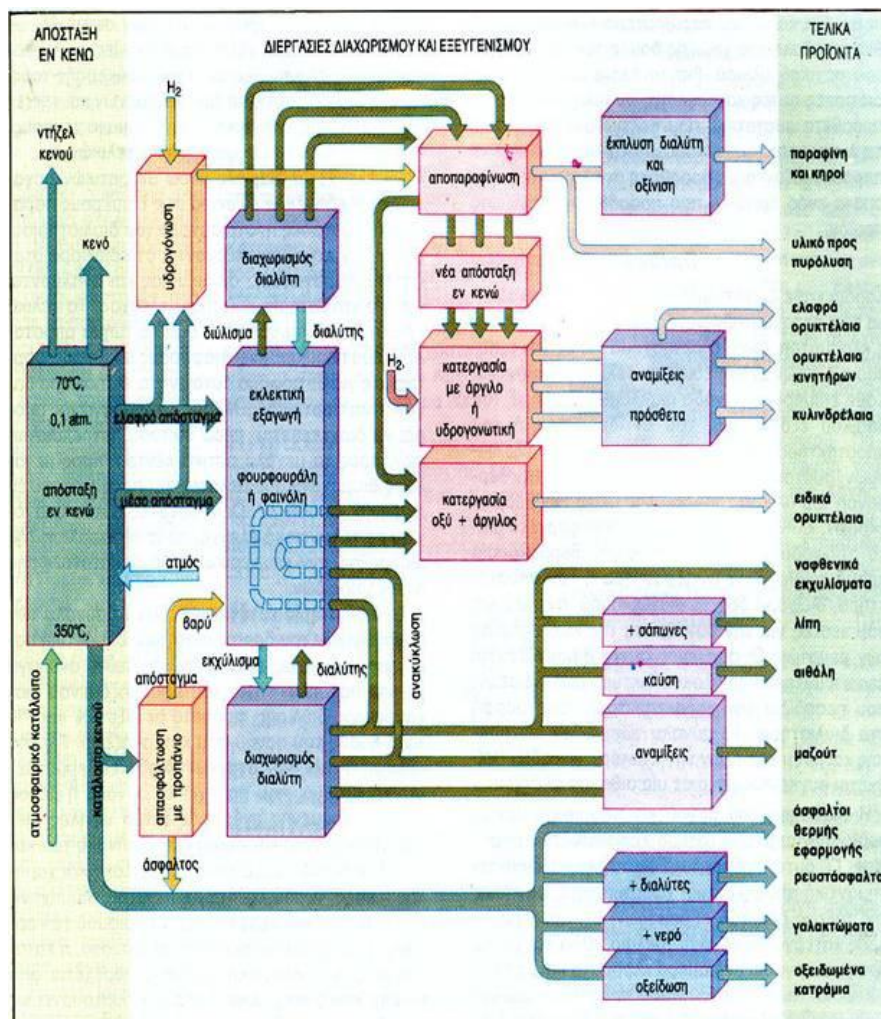
Το αργό πετρέλαιο εκτός από υδρογονάνθρακες περιέχει κι άλλες ουσίες, όπως έχει ειπωθεί παραπάνω, θείο (S), νερό (H_2O), οξυγόνο (O_2), άζωτο (N_2), μερκαπτάνες που το καθιστούν πρακτικά άχρηστο στην ακατέργαστη μορφή του. Αρχικά, το αργό πετρέλαιο υφίσταται ειδική επεξεργασία για την απομάκρυνση των προσμίξεων του θείου που περιέχει. Η κατεργασία ονομάζεται αποθείωση του πετρελαίου^[53].

Η αγορά, ωστόσο, χρειάζεται τα πετρελαϊκά υλικά με καθορισμένα χαρακτηριστικά, επομένως το πετρέλαιο διυλίζεται για να προκύψουν αυτά τα τελικά προϊόντα. Τα τελικά προϊόντα διακρίνονται σε ενεργειακά (βενζίνη, diesel, μαζούτ κ.α.) και σε μη ενεργειακά (άσφαλτος, λιπαντικά έλαια)^[53].

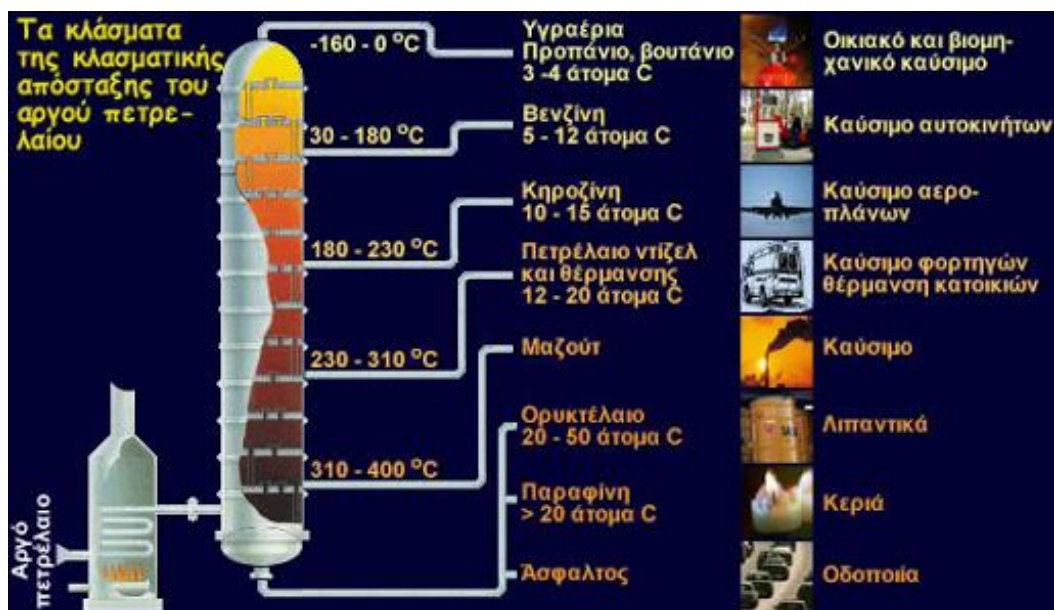
Η διεργασία της διύλισης είναι η συνεχής κλασματική απόσταξη από την οποία προκύπτει μια βασική δεκάδα πετρελαϊκών κλασμάτων με χαρακτηριστικά που βελτιώνονται σε μετέπειτα εγκαταστάσεις ανάλογα τη χρήση που θα ακολουθήσουν (Εικόνα 1.3).

- Καύσιμα αέρια
- Κλάσμα προπανίου
- Κλάσμα βουτανίου
- Ελαφριά βενζίνη
- Βαριά βενζίνη
- Κηροζίνη
- Δύο ή περισσότερα ποιότητες diesel
- Διάφορα αποστάγματα
- Ένα κατάλοιπο της εν κενό απόσταξης

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τριών διεργασιών, της ατμοσφαιρικής απόσταξης του αργού πετρελαίου, του διαχωρισμού των αερίων και βενζινών και της εν κενό απόσταξης του ατμοσφαιρικού κλάσματος. Οι διεργασίες αυτές αποτελούν τη μονάδα διύλισης αργού πετρελαίου^[53] (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Διαδικασία διύλισης πετρελαίου. Πηγή: http://oil-evolution.blogspot.com/2007/10/blog-post_6118.html

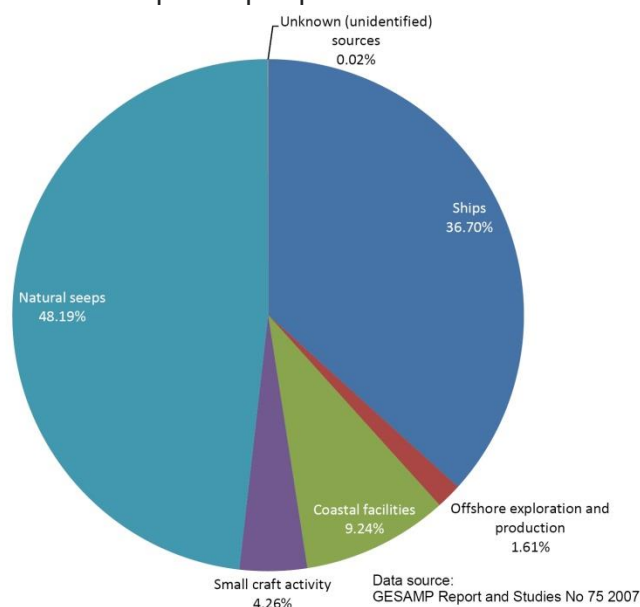


Εικόνα 1.3: Προϊόντα διύλισης πετρελαίου. Πηγή: <http://molwave.chem.auth.gr/fabchem/?q=node/266>

1.4 Θαλάσσια ρύπανση

Υπάρχουν πέντε (5) κύριες πηγές ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Γράφημα 1.1):

- Ρύπανση από απορρίψεις^[1].
- Ρύπανση από χερσαίες πηγές^[1].
- Ρύπανση από την εξόρυξη και εκμετάλλευση της υφαλοκρηπίδας και του θαλάσσιου βυθού^[1].
- Ρύπανση από την ατμόσφαιρα^[1].
- Ρύπανση από εμπορικά πλοία^[1].



Γράφημα 1.1: Ποσοστό εισροών πετρελαίου στη θάλασσα μέσω πλοίων, θαλάσσιων δραστηριοτήτων αλλά και φυσικών πηγών (διαρροές). Πηγή: <https://seos-project.eu/marinepollution/marinepollution-c02-p02.gr.html>

Η σπουδαιότητα και η ευρεία η χρήση του πετρελαίου έχει οδηγήσει στην υπέρμετρη άντλησή του. Η άντλησή του συνηθιζόταν να πραγματοποιείται σε χερσαίες περιοχές καθώς ήταν πιο εύκολος ο εντοπισμός κοιτασμάτων, η γεώτρηση και η κατασκευή ειδικών πλατφόρμων για την εξαγωγή του. Ωστόσο, με την αύξηση της ζήτησης του πετρελαίου σε συνδυασμό με τη μείωση κοιτασμάτων στο υπέδαφος, οι πετρελαϊκές εταιρείες στράφηκαν στην αναζήτηση υποθαλάσσιων κοιτασμάτων πετρελαίου προκειμένου να ικανοποιηθούν αυτές οι ανάγκες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο περισσότερος πετρελαϊκός πλούτος βρίσκεται υποθαλάσσια. Βέβαια, η εξαγωγή πετρελαίου από θαλάσσιες πλατφόρμες σε μέρη της θάλασσας μακριά από την ακτή και σε μεγάλο βάθος, δημιουργεί μεγάλο κίνδυνο ατυχήματος (κηλίδες πετρελαίου, πυρκαγιές). Δημιουργείται κίνδυνος διαρροής πετρελαίου στη θάλασσα και από την μεταφορά του από τα τάνκερ. Τα δύο παραδείγματα που δίδονται αφορούν την πρόσκρουση του δεξαμενόπλοιου Echon Valdez στον κόλπο της Αλάσκας και την έκρηξη της πλατφόρμας εξόρυξης πετρελαίου Deepwater Horizon.

1.4.1 Exxon Valdez

Ένα από τα μεγαλύτερα ατυχήματα μεταφοράς πετρελαίου αποτελεί η σύγκρουση του τάνκερ *Exxon Valdez* σε ύφαλο (Εικόνα 1.4). Στις 24/3/1989 το δεξαμενόπλοιο μεταφέροντας πετρέλαιο από την Αλάσκα στην Καλιφόρνια προσέκρουσε στον ύφαλο Bligh στον πορθμό Prince William στον κόλπο της Αλάσκας^{[27],[32]} (Εικόνα 1.5). Αποτέλεσμα ήταν να χυθούν στη θάλασσα συνολικά 40000t πετρελαίου^[29]. Το εμβαδόν της πετρελαιοκηλίδας έφτασε τα 28000km², ρυπαίνοντας 1300mi ακτογραμμής^{[27],[56]}. Εκατοντάδες ψάρια, πουλιά και άλλα θαλάσσια ζώα πέθαναν ως συνέπειες της κηλίδας. Πάνω από 600000 πουλιά, και θαλάσσια ζώα πέθαναν ακαριαία, ενώ το σύστημα δεν έχει ανακάμψει ακόμα. Η ζημιά στον κλάδο της



Εικόνα 1.4: Το ατύχημα του Exxon Valdez. Φωτογραφία που τραβήχτηκε 1/4/1989. Πηγή: CHRIS WILKINS, AFP/GETTY IMAGES

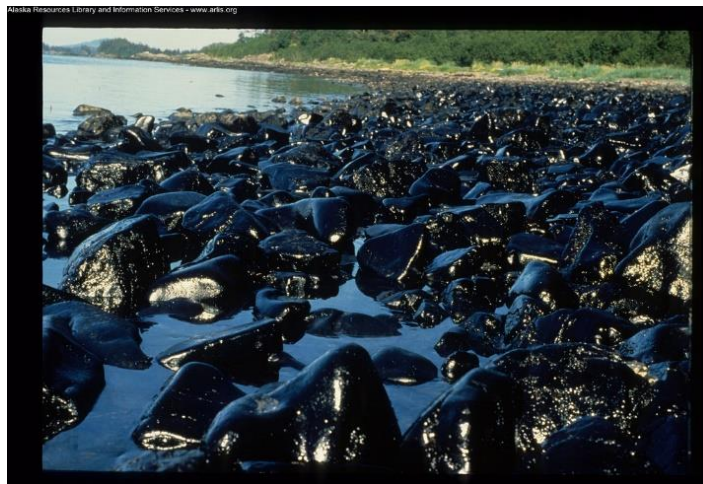
αλιείας συνεχίζεται μέχρι και σήμερα^[56]. Ήταν μία τεράστια οικολογική καταστροφή με ταυτόχρονες συνέπειες στην οικονομία και κοινωνία^[27]. Με σκοπό την αντιμετώπιση της κηλίδας χρησιμοποιήθηκαν επιφανειοδραστικές ουσίες, μίγμα διαλυτών και χημικές ουσίες διασποράς που λόγω καιρικών συνθηκών και της φύσης του

πετρελαίου (heavy crude oil), η μέθοδος απορρίφθηκε^{[3],[32]}. Δύο μέρες μετά το ατύχημα δυνατοί άνεμοι μετέφεραν μεγάλο μέρος της κηλίδας στις ακτές^{[3],[27]} (Εικόνα 1.6). Εφαρμόστηκαν μηχανικά μέσα για τον καθαρισμό, όπως τα πλωτά φράγματα, ενώ χρησιμοποιήθηκε ζεστό νερό με πίεση για τον καθαρισμό των ακτών, ωστόσο σταμάτησε γιατί ήταν επιβλαβές για τους μικροοργανισμούς^[3]. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν ουσίες ως λίπασμα που περιείχαν θρεπτικά συστατικά, άζωτο και φώσφορο, ώστε να αναπτυχθούν γρηγορότερα (βιοδιέγερση) οι μικροοργανισμοί και να αποικοδομήσουν ταχύτερα το πετρέλαιο. Συνολικά από το 1989-1991 χρησιμοποιήθηκαν 48600kg νιτρικών λιπασμάτων και 5000kg φωσφόρου. Έως το 2010 η πετρελαιοκηλίδα από το Exxon Valdez θεωρούνταν η μεγαλύτερη περιβαλλοντική καταστροφή εξαιτίας του ανθρώπου. Όμως, το 2010 το ατύχημα του Deepwater Horizon την ξεπέρασε^{[3],[29]}. Το 2008 το Ανώτατο Δικαστήριο των ΗΠΑ κατέβασε την αποζημίωση για την καταστροφή της αλιείας και τις γενικότερες ζημιές από 5 δις εκατομμύρια δολάρια σε 500 εκατομμύρια δολάρια^[56]



Εικόνα 1.5: Δεξαμενόπλοιο Exxon Valdez.

Πηγή: Exxon_Valdez_in_Prince_William_Sound_Alaska._15011152492



Εικόνα 1.6: Λιπαροί βράχοι σε τμήμα παραλίας στην Αλάσκα. Η περιοχή μετά από χρόνια κηρύχθηκε περιβαλλοντικά ευσταθής τόσο από την εταιρία όσο και από την λιμενική αρχή.

Πηγή: <https://www.flickr.com/photos/arlis-reference/4750613516>

1.4.2 Deepwater Horizon

Η ακόρεστη ζήτηση του πλανήτη για περισσότερο πετρέλαιο έχει οδηγήσει τις πετρελαιοβιομηχανίες σ' ένα ατελείωτο κυνήγι κέρδους που βασίζεται σε σχεδόν



Εικόνα 1.7: Deepwater Horizon. Πυροσβεστικά σβήνουν τη φωτιά. Πηγή: Richard Pallardy, Deepwater Horizon oil spill (Britannica.com/event/Deepwater-Horizon-oil-spill)

ανέφικτους στόχους βάζοντας έτσι σε κίνδυνο την ασφάλεια των εργαζομένων, αλλά και την ασφάλεια του οικοσυστήματος της περιοχής^[31]. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η έκρηξη της θαλάσσιας πλατφόρμας *Deepwater Horizon* στον κόλπο του Μεξικού στις 20/4/2010^[2]. Η πλατφόρμα αυτή αποτελούσε μια προηγμένης τεχνολογίας πλατφόρμα άντλησης πετρελαίου, που ανήκε στην ελβετική εταιρία Transocean και είχε μισθωθεί από τη British Petroleum και έκανε γεώτρηση στο πηγάδι Macondo όταν χτύπησε θύλακες μεθανίου οι οποίοι προκάλεσαν τεράστια πίεση στους σωλήνες και τελικά πολλαπλές

εκρήξεις^[31] (Εικόνα 1.7). Η έκρηξη έγινε 77km από την πλησιέστερη ακτή και σε βάθος 1500m κατ' αντιστοιχία σε πίεση 15MPa^{[2],[3]}. Τα συστήματα ασφαλείας δεν μπόρεσαν να περιορίσουν την έκρηξη με αποτέλεσμα να σκοτωθούν 11 άνθρωποι ενώ πολλοί τραυματίστηκαν σοβαρά^[31]. Δύο μέρες μετά από συνεχή και μεγάλη πυρκαγιά, τα απομεινάρια του Deepwater Horizon βυθίστηκαν με το πηγάδι να εκλύει ανεξέλεγκτα πετρέλαιο. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, απελευθερώθηκαν στον ωκεανό 4900000 βαρέλια πετρελαίου. Στις 21/9/2010 το πηγάδι ανακηρύχθηκε ανενεργό. Το γεγονός αυτό καθιστά το ατύχημα ένα από τα πιο καταστροφικά ατυχήματα της υδρόσφαιρας^{[3],[31]}. Η πετρελαιοκηλίδα που σχηματίστηκε επικράτησε στην περιοχή για 87 μέρες προκαλώντας ανυπολόγιστη ρύπανση του υδάτινου περιβάλλοντος^[4]. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί η κηλίδα χρησιμοποιήθηκαν τόσο μηχανικά όσο και χημικά μέσα. Τέτοια ήταν τα πλωτά φράγματα, πλοία περισυλλογής, ελεγχόμενη καύση ενώ εφαρμόστηκαν 7000000L χημικής ουσίας διασποράς COREXIT EC9500A^[21]. Η εφαρμογή έγινε από αέρος για την επιφάνεια της θάλασσας, ενώ εφαρμόστηκε και υποθαλάσσια κατευθείαν στο φρεάτιο^{[3],[27]}. Η ουσία ήταν ειδικά σχεδιασμένη για τη διάλυση και το διασκορπισμό του πετρελαίου στο νερό, όπως και για την ευκολότερη αποδόμησή του από τους μικροοργανισμούς^[27]. Καταλήγοντας, οι περιβαλλοντικές και κοινωνικές συνέπειες από το ατύχημα ήταν ανυπολόγιστες και παραμένουν μέχρι και σήμερα. Περισσότερα από 5000 κήτη πέθαναν εξαιτίας της πετρελαιοκηλίδας στον κόλπο του Μεξικού, σύμφωνα με μελέτη που δημοσιεύτηκε στην επιθεώρηση *Conversation Letters* της Εταιρίας Βιολογίας Διατήρησης (*Society for Conservation Biology*)^[54]. Η πετρελαιοκηλίδα έφτασε μέχρι τ' ανοιχτά της Λουιζιάνα^[54] (Εικόνα 1.8). Δημιουργήθηκε κοινωνικό-οικονομικό αντίκτυπο καθώς η ανεργία ήταν τεράστια, αφού η εξόρυξη σταμάτησε που ήταν καταλυτική για την τοπική κοινωνία^[55].



Εικόνα 1.8: Δορυφορική εικόνα από την πετρελαιοκηλίδα του Deepwater Horizon. Πηγή: https://www.nasa.gov/topics/earth/features/oilspill/20100525_spill.html

1.5 Πετρελαϊκή ρύπανση στη Μεσόγειο

Η Μεσόγειος θάλασσα παρουσιάζει αυξημένη επικινδυνότητα όσον αφορά τη διαρροή πετρελαίου και άλλων χημικών από ναυτικά ατυχήματα λόγω της αυξημένης κίνησης πλοίων τα οποία μεταφέρουν μεγάλες ποσότητες πετρελαίου.

Η Μεσόγειος αποτελεί μόνο το 0.7% της συνολικής υδάτινης επιφάνειας, ωστόσο λαμβάνει το 17% της παγκόσμιας ρύπανσης από πετρέλαιο^[33]. Ετησίως επιβαρύνεται με 42000t πετρελαίου και προϊόντων του, όπου οι 20000t προέρχονται από τα διυλιστήρια των χωρών εξαγωγής, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Περιβάλλοντος^[34] (Εικόνα 1.9). Αυτό την καθιστά ως τη θάλασσα με τη μεγαλύτερη ρύπανση σε παγκόσμιο επίπεδο. Ωστόσο, μόνο το 30% των ατυχημάτων καταγράφονται από τις αρχές^[33]. Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι στην κεντρική Μεσόγειο οι συγκεντρώσεις πετρελαίου είναι από 9.3-28mg/L, ενώ κατά μήκος των ελληνικών ακτών, η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.1-3.9mg/L^[32]. Η πίσσα φτάνει σε συγκέντρωση 38mg/m³^[35]. Η κατάσταση επιδεινώνεται από την κυκλοφορία γερασμένων και κακώς συντηρημένων πλοίων ακατάλληλων για τη μεταφορά επικίνδυνων φορτίων^[31]. Η Μεσόγειος αριθμεί 1638 πετρελαιοκηλίδες μικρές και μεγάλες^[35]. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη συνολική επιβάρυνση από πετρέλαιο, το 70% οφείλεται σε παράνομες δραστηριότητες, όπως ο καθαρισμός και το άδειασμα των δεξαμενών εν πλω και το 25% οφείλεται σε πραγματικά ατυχήματα^[35] (Εικόνα 1.10). Με σκοπό να προστατευτεί το θαλάσσιο περιβάλλον, το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο προτείνει εντατικοποίηση του ελέγχου των πλοίων στα λιμάνια, καλύτερη συντήρηση των πλοίων και απόσυρση των παλαιών πλοίων^[35].



Εικόνα 1.9: Ελικόπτερο της ιταλικής πετρελαϊκής εταιρίας ENI πετάει πάνω από εξέδρα εξόρυξης πετρελαίου στο Κανάλι της Σικελίας την ώρα που ακτιβιστές της Greenpeace προχωρούν σε κατάληψή της. Πηγή: Francesco Alesi/Greenpeace



Εικόνα 1.10: Το εμπορικό πλοίο Eurobulker X το οποίο κόπηκε στα δύο στο Λευκαντί της Εύβοιας το 2000 προκαλώντας τεράστια οικολογική καταστροφή. Πηγή: <https://www.tovima.gr/2008/11/24/archive/oi-petrelaikes-bombes-tis-mesogeioy/>

1.6 Επιπτώσεις πετρελαϊκής ρύπανσης

Η ρύπανση της θάλασσας και του εδάφους από πετρέλαιο έχει αρνητικές συνέπειες για τους οργανισμούς αλλά και το περιβάλλον γενικότερα. Αρχικά, το 30-40% του πετρελαίου που χύνεται στη θάλασσα αποτελείται από πτητικά συστατικά τα οποία εξατμίζονται γρήγορα, όμως το εναπομείναν δημιουργεί μία μεμβράνη, το στρώμα πετρελαίου, που εμποδίζει τις εναλλαγές αέρα-νερού που είναι απαραίτητες για τη θαλάσσια ζωή^[57]. Ως αποτέλεσμα έχει τη μείωση του οξυγόνου, επιβράδυνση της φωτοσύνθεσης αφού η ηλιακή ακτινοβολία παρεμβάλλεται και δεν φτάνει στο επιθυμητό βάθος και την αύξηση της θερμοκρασίας η οποία ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν το οξυγόνο ($O_{2(g)}$)^[26]. Ακόμη και $1\mu\text{g/L}$ (1ppb) πετρελαίου στη θάλασσα ενδέχεται να βλάψει τους πιο ευαίσθητους οργανισμούς^[36]. Ίχνη πετρελαίου στο νερό επηρεάζουν την αναπαραγωγική συμπεριφορά των οργανισμών, τη δυνατότητα προσανατολισμού και το ρυθμό αφομοίωσης της τροφής. Συγκεντρώσεις της τάξεως 0.1g/kg στα ιζήματα μπορούν να επιφέρουν αρνητικές συνέπειες στους βενθικούς οργανισμούς^[36].

Η πίσσα που εκβράζεται σε αμμώδεις ακτές καταστρέφει τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, ενώ έχει υπολογιστεί ότι χρειάζονται 3 χρόνια για τη μερική αποκατάσταση της χλωρίδας^[36] (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Καθαρισμός πετρελαιοκηλίδας από τη θάλασσα και ακτή. Πηγή: Ευαγγελία Κουκάκη, 15/9/2017 (<https://www.maxmag.gr/soma-igia/epiptosis-mias-petroleokilidas-stin-ygia-ke-ti-lene-armodii/>)

Τα πτηνά, θηλαστικά και χελώνες επηρεάζονται άμεσα από τις πετρελαιοκηλίδες. Τα φτερά των πτηνών όταν καλυφθούν με πετρέλαιο κολλάνε μεταξύ τους, ώστε να είναι ανέφικτη η πλεύση και το πέταγμα, να μειώνεται η θερμική μόνωση στο σώμα και τελικά να καταλήγουν στο θάνατο^{[36],[57]}. Ακόμη, τα θηλαστικά με σκοπό να αναπνεύσουν έρχονται σε επαφή με το επιπλέον πετρέλαιο το οποίο εισέρχεται στην αναπνευστική οδό οπότε και πεθαίνουν από ασφυξία, ενώ το δέρμα τους εκτίθεται στις τοξικές ουσίες του πετρελαίου^[37]. Το πετρέλαιο είναι τοξικό σ' όλα τα στάδια ζωής των χελωνών, αφού αυξάνει τη θνησιμότητα των αυγών, γενετικές ανωμαλίες και εν τέλει το θάνατο. Τέλος, έχει επιπτώσεις στο δέρμα, αίμα και τους αδένες που ρυθμίζουν την αλατότητα^[5].

Στη Μεσόγειο λόγω απουσίας μεγάλων κυματισμών, έντονων φαινομένων και μεγάλης συγκέντρωσης αλατότητας, η φυσική διάλυση της κηλίδας είναι δύσκολη. Εκτός από τις επιπτώσεις στο περιβάλλον, σημαντικές είναι και αυτές στην αλιεία, τον τουρισμό καθώς των άμεσων περιοχών που βρίσκεται η κηλίδα^[5].

1.7 Αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων

1.7.1. Διαδικασίες γήρανσης πετρελαίου

Το πετρέλαιο μόλις χυθεί στη θαλάσσια επιφάνεια, μία σειρά φυσικοχημικών και βιολογικών διεργασιών ξεκινά να λαμβάνει χώρα που έχει σαν συνέπεια την πλήρη διασπορά του πετρελαίου και τη σχεδόν ολική επαναφορά του θαλάσσιου περιβάλλοντος με αργό ρυθμό (ή σχετικά γρήγορα για τα πιο ελαφριά κλάσματα). Η φυσική μεταβολή της σύνθεσης του πετρελαίου ονομάζεται *γήρανση* (weathering process) (Εικόνα 1.12). Οι διεργασίες που πραγματοποιούνται έχουν ως εξής^{[6],[38]}:

ο Εξάπλωση (spreading)

Μόλις ελευθερωθεί στην επιφάνεια, το πετρέλαιο αρχίζει να εξαπλώνεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Αν το ιξώδες είναι χαμηλό, η εξάπλωση γίνεται γρηγορότερα. Το πάχος δεν μένει ίδιο σ' όλη τη μάζα του, αλλά διαφέρει σημαντικά, λόγω επίδρασης ανέμων, δημιουργία κύματος^[38].

- ο **Εξάτμιση (evaporation)**

Τα ελαφρά συστατικά του πετρελαίου εξατμίζονται σχετικά γρήγορα. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται από την τάση ατμών των διαφορετικών συστατικών. Γενικά τα συστατικά που έχουν θερμοκρασία βρασμού μέχρι 200°C εξατμίζονται εντός 24 ωρών. Όσο περισσότερο εξαπλώνεται η κηλίδα τόσο μεγαλύτερη είναι η εξάτμιση^[38].

- ο **Διασπορά (dispersion)**

Λόγω έντονου κυματισμού στην θαλάσσια επιφάνεια η κηλίδα αναδεύεται και δημιουργούνται μικρά και μεγάλα σταγονίδια. Τα μικρά σταγονίδια παραμένουν κάτω από την επιφάνεια, ενώ τα μεγαλύτερα επανέρχονται στην επιφάνεια δημιουργώντας ένα λεπτό φιλμ. Τα σταγονίδια που είναι μέσα στη θάλασσα αλλά κοντά στην επιφάνεια, έχουν πολύ μεγάλη επιφάνεια. Έτσι, οι διεργασίες επιταχύνονται για γρήγορη αποκατάσταση. Ο ρυθμός διασποράς εξαρτάται από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες και τη σύσταση της κηλίδας. Όταν το ιξώδες είναι χαμηλό η διασπορά επιταχύνεται. Η προσθήκη χημικών μπορεί να επιταχύνει την διασπορά^[38].

- ο **Γαλακτωματοποίηση (emulsification)**

Γαλακτωματοποίηση είναι η διεργασία κατά την οποία σταγόνες θαλασσινού νερού παραμένουν εγκλωβισμένες στο πετρέλαιο (οργανική φάση). Η δημιουργία του γαλακτώματος είναι αποτέλεσμα της ανάδευσης της κηλίδας από τα κύματα. Το γαλάκτωμα έχει υψηλό ιξώδες συνήθως και παραμένει στο περιβάλλον περισσότερο από το αρχικό πετρέλαιο. Επιβραδύνει τις άλλες διεργασίες, όπως τη διασπορά και βιοδιάσπαση, άρα συνολικά επιβραδύνει την αποκατάσταση περιβάλλοντος. Το γαλάκτωμα μπορεί να διαχωριστεί σε νερό και πετρέλαιο αν θερμανθεί από τον ήλιο σε ήρεμη θάλασσα ή σε ακτή^[38].

- ο **Διάλυση (dissolution)**

Τα συστατικά που διαλύονται μεταβαίνουν με αργό ρυθμό την υδατική φάση. Οι ενώσεις που διαλύονται είναι ελαφριοί υδρογονάνθρακες οι οποίοι εξατμίζονται αρκετά γρήγορα σε σχέση με τα πιο βαριά συστατικά (έως και 100 φορές), καθιστώντας τη διάλυση δευτερεύουσα διεργασία^[38].

- ο **Οξείδωση (Oxidation)**

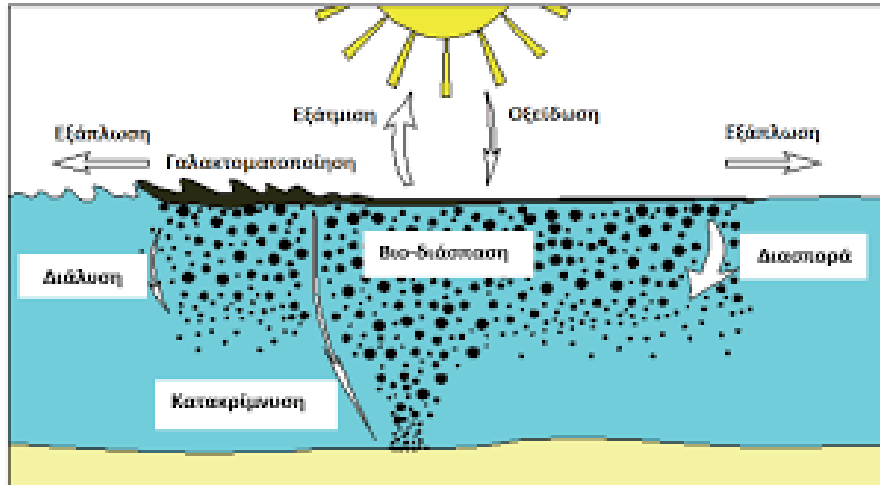
Τα συστατικά του πετρελαίου αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο δημιουργώντας έτσι είτε διαλυτές ενώσεις οι οποίες τελικά βιοαποικοδομούνται είτε αδιάλυτες (tars) που δημιουργούν συσσωματώματα που συχνά φτάνουν στην ακτή. Η δημιουργία αδιάλυτων ενώσεων είναι προϊόντα της οξείδωσης συστατικών πετρελαίου με μεγάλο ιξώδες. Ο ρυθμός οξείδωσης είναι σχετικά αργός και εξαρτάται από την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου. Σε ευνοϊκές συνθήκες, δηλαδή σε δυνατή ηλιακή έκθεση λεπτού στρώματος πετρελαίου, ο μέγιστος ρυθμός οξείδωσης και διάσπασης του φιλμ είναι μικρότερος του 0.1% ημερησίως^[38].

- ο **Κατακρήμνιση/Καταβύθιση (Sedimentation/Sinking)**

Κάποια από τα κλάσματα του πετρελαίου έχουν σχετική πυκνότητα $\rho > 1 \text{ g/cm}^3$ και βυθίζονται στο καθαρό ή σχετικά υφάλμυρο νερό. Ωστόσο, το θαλασσινό νερό έχει πυκνότητα $\rho = 1.025 \text{ g/cm}^3$ μ' αποτέλεσμα λίγα προϊόντα του αργού πετρελαίου να βυθίζονται. Παρατηρείται κατακρήμνιση συσσωματωμάτων στο βυθό που είναι αποτέλεσμα της προσκόλλησης στερεών σωματιδίων (ανόργανων ή οργανικών). Το θαλασσινό νερό στα πιο ρηχά έχει μεγαλύτερο αριθμό αιωρούμενων σωματιδίων που βοηθούν στην κατακρήμνιση του πετρελαίου^[38].

ο Βιοδιάσπαση (Biodegradation)

Το θαλασσινό νερό περιέχει ποικιλία μικροοργανισμών ορισμένοι από τους οποίους έχουν τη δυνατότητα να διασπούν συγκεκριμένα συστατικά του πετρελαίου πρώτα σε διαλυτές ενώσεις και τελικά σε CO_2 & H_2O . Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα των διεργασιών της βιοδιάσπασης. Οι σημαντικότεροι είναι η συγκέντρωση θρεπτικών (N_2 & P), η θερμοκρασία και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (dissolved oxygen, DO). Η βιοδιάσπαση ενισχύεται όταν η διασπορά του πετρελαίου είναι μεγάλη στην επιφάνεια της θάλασσας^[38].



Εικόνα 1.12: Διαδικασίες γήρανσης πετρελαιοκηλίδας. Πηγή: Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος (σημειώσεις 2013)

1.7.2. Τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων

Δύο είναι οι κλασικοί τρόποι αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.

1. Προσθήκη χημικών ουσιών διασποράς
2. Ανάκτηση του πετρελαίου με χρήση πλοιαρίων (skimmers) και booms.

Έκτος των δύο αυτών τεχνολογιών, υπάρχει μία σειρά υπό ανάπτυξη τεχνολογιών συμπληρωματικών των πρώτων. Πιθανή είναι η υιοθέτησή τους λόγω της αποτελεσματικότητάς τους σε μεγάλη κλίμακα^[38].

- I. Χημικές ουσίες διασποράς (chemical dispersants) (Εικόνα 1.13)
Προστίθενται συνήθως με γεωργικά αεροπλάνα ή πλοιάρια^[38].



Εικόνα 1.13: Σπρέι χημικών από αεροπλάνα και πλοιάρια. Πηγή: Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος (σημειώσεις 2013)

II. Περιορισμός και ανάκτηση επιπλέοντος πετρελαίου (Containment and recovery of floating oil) (Εικόνα 1.14)

Ο περιορισμός και η ανάκτηση της πετρελαιοκηλίδας γίνεται με τη χρήση ειδικών booms και πλοιαρίων (skimmers) ειδικά σχεδιασμένων για την ανοιχτή θάλασσα αλλά και κοντά σε ακτές^[38].



Εικόνα 1.14: Ένα πλοιάριο συλλέγει το επιπλέον πετρέλαιο μετά την έκρηξη του Deepwater Horizon στον κόλπο του Μεξικού το 2010. Πηγή: (NOAA)

III. Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης

- a. Ανάφλεξη στην ανοιχτή θάλασσα (in situ burning) (Εικόνα 1.15)
- b. Βιοεξυγίανση (bioremediation)
 - i. Βιοδιέγερση (biostimulation)
 - ii. Βιοενίσχυση (bioaugmentation)^[38]



Εικόνα 1.15: Ο NOAA (National Organization and Atmospheric Administration) σε συνεργασία με την ακτοφυλακή εφάρμοσαν επιτόπου ανάφλεξη στην κηλίδα του Deepwater Horizon. Πηγή: (U.S. Coast Guard)

Χρησιμοποιούνται, επίσης, τεχνικές για απομάκρυνση/καθαρισμό των ακτογραμμών. Οι τεχνικές είναι (α) ανάκτηση του επιπλέοντος πετρελαίου που έφτασε στην ακτή είτε χειρωνακτικά είτε μ' αντλίες κενού και (β) αποσυγκόλληση με πλύσιμο των βράχων με

θαλασσινό νερό και συλλογή του με booms κι skimmers. Αν η υπολειπόμενη ρύπανση είναι μεγάλη, χρησιμοποιείται ζεστό νερό υπό πίεση ή χημικά διασποράς^[38].

1.8 Βιολογική απομάκρυνση πετρελαίου

Η βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων πραγματοποιείται μέσω της δράσης των βακτηρίων και των μυκήτων που αναπτύσσονται δεσμεύοντας την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά το μεταβολισμό των υδρογονανθράκων. Οι οργανικές ενώσεις του πετρελαίου αποσυντίθενται μέσω των μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν ένζυμα ως καταλύτες που τα παράγουν οι ίδιοι. Τα τελικά προϊόντα της αποδόμησης είναι το CO₂, H₂O και βιομάζα ενώ σε περιπτώσεις ατελούς αποσύνθεσης παράγονται ενώσεις, όπως H₂S, CH₄ και γενικά ενώσεις του θείου (S) και του αζώτου (N₂)^[39].

Τα συστατικά του πετρελαίου είναι στο σύνολό τους βιοποδομήσιμα με τα ελαφρύτερα και πτητικά συστατικά να διασπώνται γρηγορότερα σε σχέση με τα βαρύτερα και δυσδιάλυτα. Οι αρωματικές ενώσεις που περιέχουν ένα βενζολικό πυρήνα (δακτύλιο), τα BTEX (βενζόλιο, τολουόλιο, αιθυλβενζόλιο, ξυλένιο) είναι εύκολα αποδομήσιμα σε σχέση με τις ενώσεις που περιέχουν δύο, όπως το ναφθαλίνη, ή περισσότερους δακτυλίου, όπως τα PAH^[39].

1.8.1. Μεταβολισμός υδρογονανθράκων

Οι μικροοργανισμοί του περιβάλλοντος έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές ουσίες και να χρησιμοποιούν την παραγόμενη ενέργεια για ανάπτυξη και αύξησή τους. Οι τρόποι μεταβολισμού είναι δύο, ο συμμεταβολισμός ο οποίος είναι ειδική κατηγορία μεταβολισμού. Η οργανική ουσία δεν χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα ή πηγή ηλεκτρονίων, οπότε διασπάται τυχαία από μια ομάδα μικροοργανισμών της οποίας τα προϊόντα μεταβολισμού χρησιμεύουν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για άλλους οργανισμούς. Η άλλη κατηγορία είναι ο καταβολισμός-ανοργανοποίηση, δηλαδή η διάσπαση οργανικών ή ανόργανων ουσιών σε πρωτεΐνες, σάκχαρα και λιπαρά οξέα. Γίνεται διάσπαση των μεγάλων μορίων σε μικρότερα^[42].

Γενικά, οι αρωματικές ενώσεις είναι σταθερές στο περιβάλλον και ιδιαίτερα οι πολυχλωριωμένες ενώσεις που όσο περισσότερα άτομα χλωρίου (Cl) τόσο περισσότερο σταθερές είναι^[42]. Ακόμη, οι μονοκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως τα BTEX, αποδομούνται από τους μικροοργανισμούς με ενσωμάτωση δύο -OH στο δακτύλιο (κατεχόλη) και στη συνέχεια διάσπαση του δακτυλίου^[42]. Τα τελικά προϊόντα της διάσπασης εισέρχονται στον κύκλο του Krebs και παράγουν ενέργεια για τους μικροοργανισμούς. Επίσης, τα PAH μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες, δηλαδή οξειδώνονται προς κατεχόλη και έπειτα διασπώνται οι δύο δακτύλιοι προς πυρροβικό οξύ και αιθανάλη (ακεταλδεΐδη)^[42].

1.8.2. Μηχανισμός βιοαποδόμησης

Το πετρέλαιο όταν βρεθεί στο περιβάλλον θεωρείται ρυπογόνο διότι τροποποιεί τις συνθήκες κάτω από τις οποίες λειτουργεί το όλο σύστημα. Έτσι, αυτό μετατρέπεται από τους μικροοργανισμούς σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και στη συνέχεια σε CO₂ σε αερόβιες συνθήκες ή σε CH₄ σε αναερόβιες με αύξηση βιομάζας παράλληλα^[43]. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος είναι οξειδοαναγωγικές, υδρολυτικές ή συζευκτικές^{[11],[43]}. Η βιοαποικοδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων επιτυγχάνεται υπό αερόβιες συνθήκες, όπου το O₂ είναι ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες τελικός δέκτης είναι τα ιόντα NO₃⁻, SO₄²⁻ και Fe³⁺.

Χαρακτηρίζεται ως μία πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων που διαφοροποιείται ανάλογα με τους μικροοργανισμούς^[44].

Η βιοαποικοδόμηση κάθε ουσίας εξαρτάται από ένα σύστημα ενζύμων το οποίο καταλύει συγκεκριμένες αντιδράσεις. Οι μικροοργανισμοί για την ανάπτυξή τους χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υπόστρωμα. Υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι παρουσιάζουν ειδίκευση ως προς τη θέση του μορίου της ένωσης που θα αποικοδομήσουν ενώ άλλοι διασπούν ενώσεις διαφόρων κατηγοριών^[44].

Η βιοδιάσπαση του πετρελαίου πραγματοποιείται μέσω βακτηρίων και μυκήτων. Το γνωστότερο γένος βακτηρίων ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonas* ενώ υπάρχουν αναφορές στα γένη *Bacillus*, *Alcanivorax*, *Paracoccus*, *Mycobacterium*^[44]. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποδομούν απλούς υδρογονάνθρακες, όπως το CH₄ έως και ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα. Τέλος, δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων που να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται στο αργό πετρέλαιο^{[12],[43]}.

Τελικά, προκειμένου να συντελεστεί βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς απαιτούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις^[36]:

1. Παρουσία μικροοργανισμών που παράγουν ένζυμα κατάλληλα για το μεταβολισμό των υδρογονανθράκων^[39].
2. Παρουσία επαρκούς ποσότητας υδρογονανθράκων που με την αποσύνθεσή τους παράγουν την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών^[39].
3. Παρουσία θρεπτικών συστατικών (N₂, P, K) απαραίτητων για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών^[39].
4. Παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων, δηλαδή ιόντων και ριζών που θα δέχονται τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την οξείδωση των υδρογονανθράκων.
5. Ύπαρξη κατάλληλων περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (υγρασία, θερμοκρασία, pH) για τη μικροβιακή ανάπτυξη^[39].

Απουσία χημικών ουσιών σε μεγάλες συγκεντρώσεις διότι τις καθιστούν τοξικές για τους μικροοργανισμούς^[39].

1.8.3. Βιοεξυγίανση

Η βιοεξυγίανση περιβάλλοντος ορίζεται ως η απορρύπανση του περιβάλλοντος με βιολογικές διεργασίες, δηλαδή με τη χρήση μικροοργανισμών σαν καταλύτες. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων και γενικότερα των ρυπασμένων περιοχών^[38].

1. Βιοδιέγερση (biostimulation) είναι η διαδικασία κατά την οποία οι αυτόχθονες μικροβιακοί πληθυσμοί αυξάνονται με προσθήκη θρεπτικών ουσιών (P, N₂) ή/και αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών (προσθήκη O₂, αλλαγή θερμοκρασίας)^[38].
2. Βιοενίσχυση (bioaugmentation) διαδικασία κατά την οποία στους γηγενείς πληθυσμούς των μικροοργανισμών προστίθενται «ξένοι» μικροοργανισμοί, ώστε να γίνει γρηγορότερη η αποικοδόμηση του πετρελαίου^[38].

Η βιοεξυγίανση σαν τεχνική αποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών έχει αρκετά πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα. Αυτά είναι:

Πλεονεκτήματα

- Περιλαμβάνει την ελάχιστη φυσική διακοπή της περιοχής^[30].
- Όταν εφαρμόζεται σωστά, δεν παρατηρούνται ανεπιθύμητες ενέργειες^[30].
- Τεχνολογία φιλική προς το περιβάλλον, αφού τα τελικά προϊόντα είναι ανόργανα^{[13],[30]}.
- Προσφέρει μία απλή και εμπεριστατωμένη λύση έναντι των μηχανικών μεθόδων^{[30],[45]}.
- Λιγότερο δαπανηρή απ' άλλες μεθόδους^[30].
- Έχει χαρακτηριστεί ως «πράσινη τεχνολογία»^[13].

Μειονεκτήματα

- Η λειτουργική της χρήση ενδέχεται να περιοριστεί από τη σύνθεση του πετρελαίου^[30].
- Ανησυχία ως προς την τοξικότητα των ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων^[30].
- Μεγάλος χρόνος εφαρμογής^[30].
- Προσέγγιση ειδικά προσαρμοσμένη για την εκάστοτε ρυπασμένη περιοχή^{[30],[45]}.
- Με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρειάζονται πληροφορίες σχετικά με την τοποθεσία της διαρροής και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου^[13].

Οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν βασικό ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα μέσω του μεταβολισμού που προκαλούν στις διάφορες ουσίες^[46]. Χρησιμοποιούν τους υδρογονάνθρακες, ιδιαίτερα το πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα και ενέργειας^[46]. Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, λοιπόν, προσαρμόζονται στις συνθήκες θαλάσσιου περιβάλλοντος-πετρελαίου, βελτιώνοντας συνεχώς τις ικανότητές τους^[46]. Οι καταστροφικές ποσότητες του πετρελαίου για το οικοσύστημα είναι ιδιαίτερος θετικός για τους γηγενείς μικροοργανισμούς-αποικοδομητές. Ωστόσο, μειώνεται αρκετά η βιοποικιλότητα του οικοσυστήματος^[46].

Σε ιδανικές συνθήκες η αποικοδόμηση μιας ποσότητας πετρελαίου πραγματοποιείται εντός ενός μηνός, όμως οι συνθήκες στο φυσικό περιβάλλον δεν είναι ιδανικές και εξαρτώνται από παράγοντες, όπως θερμοκρασία, pH του συγκεκριμένου οικοσυστήματος, περιεκτικότητα σε O₂, καθώς πρόκειται για αερόβιες διεργασίες^[58]. Επίσης, χρειάζονται άλατα και ιχνοστοιχεία τα οποία βοηθούν τα ένζυμα να ενεργοποιηθούν, ώστε να διασπασούν οι μικροοργανισμοί το πετρέλαιο^[46].

Το πετρέλαιο στην επιφάνεια της θάλασσας αποικοδομείται αρκετά πιο εύκολα, ιδιαίτερα αν υπάρχουν και κυματισμοί, σε σχέση με τον πυθμένα όπου ο ρυθμός είναι αρκετά πιο αργός^[46]. Το ίδιο, δυστυχώς, συμβαίνει και στο πετρέλαιο που βρίσκεται στην άμμο, πέτρες, έδαφος γιατί η αποικοδόμησή του αναστέλλεται λόγω της δημιουργία συσσωματωμάτων. Παραδείγματα έδειξαν ότι ανεξάρτητα από την ποσότητα του πετρελαίου, η ρύπανση επέμενε μετά από 1 χρόνο (Chevron Main Pass), μετά από 6 χρόνια (Nova Scotia), μετά από 4 χρόνια (Vancouver), μετά από 5 χρόνια είχε αποικοδομηθεί το 20% του πετρελαίου στον πυθμένα της ρυπασμένης θάλασσας (Seaport Maine)^[46].

1.9 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες (surfactants) είναι οργανικές ενώσεις που δρουν στην επιφάνεια διαφόρων συστατικών μειώνοντας την επιφανειακή τους τάση. Έτσι, είναι ευκολότερο να αναμιχθούν ή διασκορπιστούν ως γαλάκτωμα στο νερό ή σ' άλλα υγρά. Σχετικά με τη μοριακή τους δομή, αποτελούνται από το υδρόφοβο τμήμα που περιέχει κορεσμένα, ακόρεστα, υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες και το υδρόφιλο τμήμα που αποτελείται από (μόνο-), (ολίγο-) και (πολύ-) σακχαρίτες, πεπτίδια ή πρωτεΐνες.

Ο μηχανισμός δράσης τους είναι συνδυασμός του υδρόφοβου και υδρόφιλου μέρους.

Για την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιούνταν το πετρέλαιο ως πρώτη ύλη. Αυτές, ωστόσο, ήταν τοξικές για το περιβάλλον γιατί πολλές απ' αυτές τις ουσίες σχημάτιζαν επικίνδυνες ενώσεις που δεν μπορούσαν να διασπαστούν πλήρως στο νερό ή το έδαφος. Επίσης, είχαν φανερωθεί προβλήματα υγείας και στους χρήστες. Έτσι, αυξήθηκε το ενδιαφέρον για τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) έναντι των χημικών ουσιών.

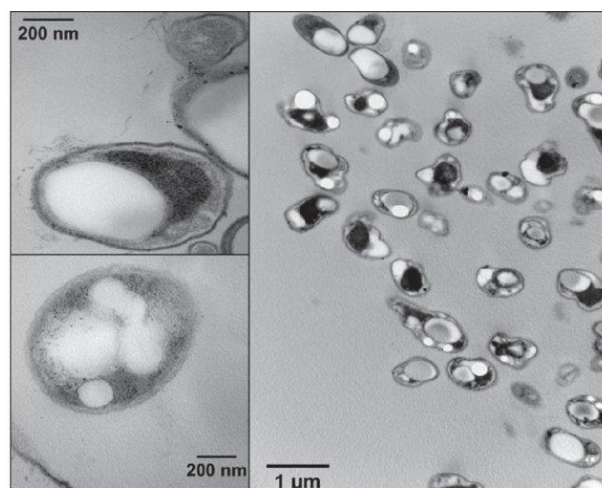
Οι βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη, όπως *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Paracoccus*, κ.α., που αποικοδομούν ή μετασχηματίζουν τα συστατικά του πετρελαίου. Είναι ενώσεις μη τοξικές, μη επικίνδυνες, βιοδιασπώμενες και φιλικές προς το περιβάλλον.

1.10 Μικροοργανισμοί-αποικοδομητές

Οι μικροοργανισμοί με τους οποίους ασχολείται η παρούσα διπλωματική εργασία είναι βακτήριο του γένους *Paracoccus* και δύο στελέχη του γένους *Alcanivorax*.

Paracoccus sp.

Το *Paracoccus* είναι ένα γένος βακτηρίων που ανήκει στην οικογένεια των *Rhodobacteraceae*^[59]. Είναι gram αρνητικό βακτήριο^[14] και είναι μακρινός συγγενής των πρωτοβακτηρίων μαζί με το *E. coli*, όπως φαίνεται από την αλληλουχία 16S rRNA^[59]. Για πολλά χρόνια, εκπρόσωπος του γένους ήταν το *Paracoccus denitrificans* (Εικόνα 1.16), που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1908 από τον Beijerinck ως *Micrococcus denitrificans*^[59]. Η αρχική επιλογή αυτού του είδους βασίστηκε στην ικανότητά του να μετατρέπει τα νιτρικά σε μοριακό άζωτο^[59]. Πρόσφατα, δύο νέα είδη του γένους *Paracoccus* τακτοποιήθηκαν με βάση την αλληλουχία 16S rRNA, χωρίς να έχουν δημοσιευτεί άλλες ιδιότητές τους (*P. marcusii* & *P. alkenifer*)^[59]. Αυτά τα νέα είδη απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας μια σειρά από οργανικές και ανόργανες ενώσεις, όπως ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο, θειοκυανικό σαν υποστρώματα.



Εικόνα 1.16: *Paracoccus denitrificans*. Πηγή: <https://microbiomology.org/microbe/paracoccus/>

Τα περισσότερα απομονωμένα στελέχη του γένους χρησιμοποιούν τα νιτρικά και τα προϊόντα αναγωγής τους ως εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων του οξυγόνου κατά την αναερόβια αναπνοή. Οργανισμοί σαν το *Paracoccus*, αντιμετωπίζουν μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του O_2 ^[59]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μ/ο αυτός προσκολλάται στην ελαιώδη φάση περισσότερο από την υδάτινη. Ο μ/ο αυτός αποτελεί τη βέλτιστη λύση για τη βιοδιάσπαση ρυπασμένων θαλάσσιων περιοχών, αφού η βιομάζα είναι προσκολλημένη στην ελαιώδη φάση και δεν αραιώνεται λόγω των κυματισμών^[14].

Alcanivorax sp.

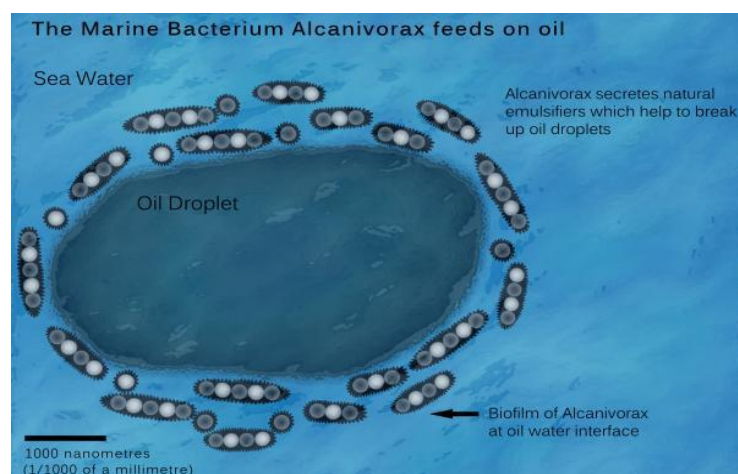
Το *Alcanivorax borkumensis* είναι θαλάσσιο βακτήριο που αποικοδομεί τα αλκάνια. Κυριαρχεί σε θαλασσινό νερό που περιέχει πετρέλαιο και είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο^[44]. Αποικοδομεί με γρήγορους ρυθμούς το πετρέλαιο όταν συμπληρώνονται θρεπτικά αζώτου και φωσφόρου^[16]. Το γονιδίωμα του *A. borkumensis* είναι ένα μονό κυκλικό χρωμόσωμα που περιέχει 3120143 ζεύγη βάσεων^[17]. Είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένο στην αποικοδόμηση του πετρελαίου^[17]. Το γονιδίωμά του έχει πολλές ακολουθίες που κωδικοποιούν ένζυμα για τη διάσπαση πολλών τύπων αλκανίων, καθιστώντας το έτσι εξαιρετικά προσαρμόσιμο και ευέλικτο^[17]. Επίσης, το γονιδίωμα περιέχει οδηγίες για το σχηματισμό βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών που βοηθούν στη διαδικασία της αποδόμησης (Εικόνα 1.17). Με σκοπό την αντιμετώπιση εξωτερικών απειλών το βακτήριο διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς. Τέτοιες εξωτερικές απειλές είναι η υψηλή συγκέντρωση ιόντων νατρίου, που βρίσκεται στο νερό των ωκεανών και η υπεριώδης ακτινοβολία στη γήινη επιφάνεια^[17].

Το *A. borkumensis* χρησιμοποιεί κυρίως αλκάνια ως πηγή άνθρακα και συνεπώς ενέργειας, ωστόσο κάποιες φορές χρησιμοποιεί και άλλες οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα^[18]. Σ' αντίθεση μ' άλλα βακτηριακά κύτταρα, δεν μπορεί να καταναλώσει πιο κοινές ουσίες, όπως αμινοξέα και σάκχαρα ως πηγή ενέργειας^[18]. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη γονιδίων που κωδικοποιούν ενεργούς ή παθητικούς μεταφορείς υδατανθράκων, εξ ου και η αδυναμία κατανάλωσης μονομερών σακχάρων^[18]. Ένας αριθμός από διαφορετικά ένζυμα είναι επιφορτισμένα με την οξείδωση αλκανικών μορίων. Ο αερόβιος μεταβολισμός των αλκανίων πραγματοποιείται μέσω της τερματικής οδού οξείδωσης των αλκανίων, όπου οι μονοξυγενάσες ξεκινούν την οξείδωση των τελικών μορίων άνθρακα^[19]. Αυτή η διαδοχική οδός παράγει πρώτα

αλκοόλες, μετά αλκοόλη και αφυδρογονάσες αλδεΐδης, και τελικά αλδεΐδες και λιπαρά οξέα, αντίστοιχα^[19].

Το *Alcanivorax venustensis* αποτελεί ένα θαλάσσιο βακτήριο το οποίο αποικοδομεί αλκάνια. Βρίσκεται συνήθως σε βαθύτερα νερά και επικρατεί σε θάλασσες ρυπασμένες από πετρέλαιο^[20]. Είναι αερόβιο, gram αρνητικό βακτήριο^[20]. Κινείται με τη βοήθεια μαστίγιων και αναπτύσσεται μικρό, κανονικού σχήματος (κυκλικό) σχηματίζοντας μη χρωματιζόμενες αποικίες. Επίσης, είναι δυνατή η ανάπτυξή του σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών. Έχει σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών για την ανάπτυξή του, που κυμαίνεται από 4°C έως 40°C. Τα θαλάσσια άλατα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και δεν αντικαθίστανται από NaCl (εργαστηριακό) σε ισοδύναμη συγκέντρωση. Τα στέλεχος αυτό αποικοδομεί το Tween 80, αλλά δεν μπορεί να υδρολύσει καζεΐνη, ζελατίνη, άμυλο και άγαρ. Τα νιτρικά δεν ανάγονται σε νιτρώδη ούτε σε αέριο άζωτο. Οι πηγές άνθρακα που υποστηρίζουν την καλή ανάπτυξη του στελέχους είναι το πυροσταφιλικό οξύ, το προπιονικό οξύ, 3-υδροξυβουτυρικό οξύ και τετραμεθυλοπενταδεκάνιο.

Η ανάπτυξή του συνοδεύεται με το σχηματισμό βλεννογόνων αποικιών όταν η πηγή άνθρακα είναι η ελάχιστη δυνατή^[20]. Η περιεκτικότητα των βάσεων G+C στο DNA του είναι 66%^[20].



Εικόνα 1.17: Αποικοδόμηση του πετρελαίου από το *Alcanivorax borkumensis*. Πηγή: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Eating.jpg>

2. Σκοπός πειράματος

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εργαστηριακή μελέτη της απομάκρυνσης του πετρελαίου από το θαλασσινό νερό με τη χρήση μικροοργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Paracoccus* με την αντίστοιχη του *Alcanivorax venustensis* και του *Alcanivorax borkumensis*, αλλά και των δύο στελεχών *Alcanivorax* μεταξύ τους.

Αναφέρεται περιληπτικά ο σκοπός του κάθε πειράματος.

- Πείραμα 1. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων από το στέλεχος *Paracoccus* sp. Στόχος του πρώτου πειράματος ήταν να μελετηθεί το βακτήριο *Paracoccus marcusii* ως προς την ικανότητά του να αναπτυχθεί οπότε και να αποικοδομήσει τόσο αλειφατικούς όσο και αρωματικούς υδρογονάνθρακες με τη χρήση 4 διαφορετικών υποστρωμάτων. Επίσης, μελετήθηκε και το ποσοστό αποικοδόμησης του πετρελαίου από το ίδιο στέλεχος.

- Πείραμα 2. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων με προσθήκη πεπτόνης σε καλλιέργειες *Alcanivorax venustensis*. Σκοπός της δεύτερης πειραματικής διεργασίας ήταν να μελετηθεί αν το στέλεχος *A. venustensis* μπορεί να αποικοδομήσει το πετρέλαιο ευκολότερα με την παρουσία μιας άλλης πηγής άνθρακα, της πεπτόνης.

- Πείραμα 3. Σύγκριση δύο στελεχών του γένους *Alcanivorax* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Σκοπός του τρίτου και τελευταίου πειράματος είναι η σύγκριση των δύο στελεχών του *Alcanivorax* σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ($T=14^{\circ}\text{C}$ & $T=25^{\circ}\text{C}$), ώστε να διαπιστωθεί ποιο από τα δύο αποικοδομεί σε μεγαλύτερο βαθμό τους υδρογονάνθρακες και το πετρέλαιο.

3. Υλικά και Μέθοδοι

Όλα τα όργανα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή όλων των πειραμάτων αποστειρώθηκαν πριν τη χρήση τους.

Τα στελέχη των βακτηρίων του γένους *Paracoccus* και του *Alcanivorax borkumensis* (στέλεχος KmYd) που χρησιμοποιήθηκαν είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από τον κόλπο της Ελευσίνας ενώ το *Alcanivorax venustensis* (στέλεχος HP CEWAF) απομονώθηκε από δείγμα θαλασσινού νερού σε βάθος 1000m στην ανατολική Μεσόγειο και συγκεκριμένα στη Γαύδο.

Σ' όλες τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ONR7 για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα βήματα παρασκευής του αναλύονται παρακάτω.

3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

ONR7

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τρία ξεχωριστά πυκνά διαλύματα, των οποίων η ανάμιξη οδηγεί στη δημιουργία του ONR7. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώθηκαν στον κλίβανο για 50 λεπτά.

Διάλυμα 1 (σε 1L H ₂ O)	
NaCl	113.95g
Na ₂ SO ₄	19.9g
KCl	3.6g
NaBr	415mg
NaHCO ₃	155mg
H ₃ BO ₃	135mg
NaF	13mg
NH ₄ Cl	0.35g
NaHPO ₄ x 7H ₂ O	445mg
TAPSO	6.5g

Διάλυμα 2 (σε 500ml H ₂ O)	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	55.9g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	7.3g
SrCl ₂ x 6H ₂ O	120mg

Διάλυμα 3 (σε 100ml H ₂ O)	
FeCl ₂ x 4H ₂ O	10mg

Τελική παρασκευή ONR7 σε φιάλη 1L

- Ανάμιξη 200ml από το διάλυμα 1 με 133ml H₂O σ' ένα ποτήρι ζέσεως. Ρύθμιση του pH του διαλύματος μέχρι το 7.6 με διάλυμα NaOH 4M.
- Προσθήκη στη φιάλη του 1L μαζί με το διάλυμα 1, 100ml από το δεύτερο διάλυμα μαζί με 233ml H₂O.
- Προσθήκη 20ml από το τρίτο διάλυμα στη φιάλη μαζί με 313ml H₂O.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Σε 200ml απιονισμένου νερού ρίπτεται μία ταμπλέτα PBS και ανακινείται μέχρι να διαλυθεί σε μαγνητικό αναδευτήρα στους 100°C. Καλύπτεται με αλουμινόχαρτο το καπάκι της φιάλης και η φιάλη αποστειρώνεται στον κλίβανο για 50'.

3.2 Μέθοδοι πειραμάτων

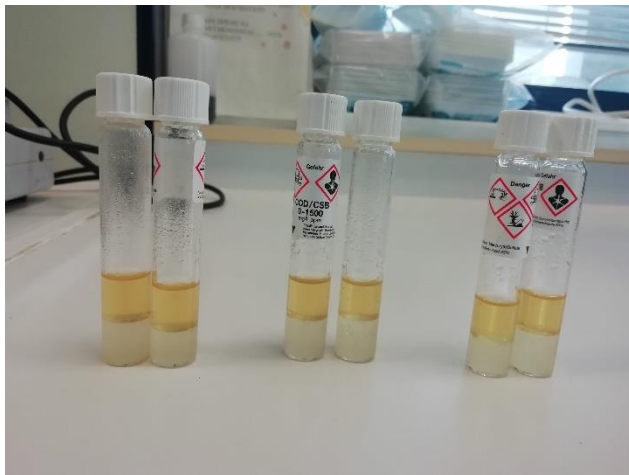
Μέτρηση βακτηριακής ανάπτυξης με τη μέθοδο της οπτικής απορρόφησης

Σε Eppendorf των 2ml προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα από τα δείγματα της βακτηριακής καλλιέργειας και τα φιαλίδια αυτά έπειτα τοποθετήθηκαν μέσα στο μηχάνημα για 10 λεπτά στα 13000rpm, ώστε να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπόλοιπο υγρό. Όταν τελείωσε η φυγοκέντριση το υπερκείμενο υγρό που έχει διαχωριστεί χύθηκε μέσα στο δοχείο αποβλήτων και στα Eppendorf προστέθηκαν 2ml PBS, ανακινήθηκαν καλά, ώστε να ξεκολλήσει η βιομάζα από τα τοιχώματα και τελικά το διάλυμα αυτό μπήκε σε κιβέτες για να μετρηθεί η βιομάζα στο φασματοφωτόμετρο στα 600nm.

Εκτίμηση της παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών (emulsification assay)

Σε γυάλινα αποστειρωμένα φιαλίδια προστίθενται 2ml από κάθε καλλιέργεια και 2ml diesel (Εικόνα 3.1). Τοποθετούνται σε γρήγορο αναδευτήρα (vortex) για 2 λεπτά. Αφότου τελειώσει η ανάδευση, αφήνονται στην ηρεμία για 1 λεπτό περίπου. Στη διάρκεια αυτού του λεπτού εμφανίζεται μία ενδιάμεση στοιβάδα, το γαλάκτωμα (emulsion) η οποία μετριέται με χάρακα για τη εύρεση του πάχους σε cm. Η στοιβάδα αυτή δεν εμφανίζεται για πολλή ώρα γι' αυτό η μέτρηση πρέπει να είναι γρήγορη και ακριβής. Μετά το πέρας του λεπτού η στοιβάδα έχει χαθεί και ξεχωρίζουν ξανά οι δύο στοιβάδες, του δείγματος και του diesel. Τέλος, μετριέται και το συνολικό ύψος του δείγματος για τους απαραίτητους υπολογισμούς.

$$\text{Δείκτης E24} = \frac{\text{Ύψος στοιβάδας γαλακτώματος}}{\text{Συνολικό ύψος δείγματος}} * 100$$

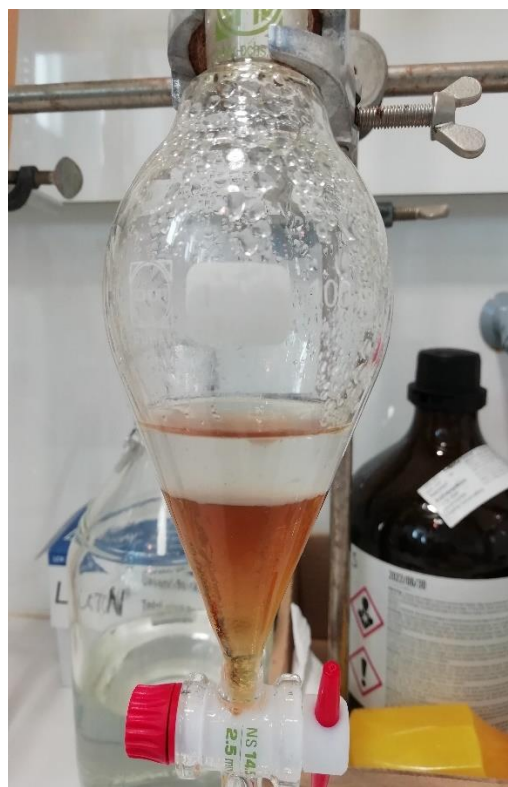


Εικόνα 3.1: Φιαλίδια παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών (emulsification assay)

Εκχύλιση υδρογονανθράκων

Σε 20 ml καλλιέργειας προστέθηκαν 20ml DCM suprasoln, ανακινείται και χύνεται στη χοάνη η οποία πρέπει να είναι κλειστή για να μην φύγει όλο το δείγμα (βάνα σε οριζόντια θέση) με κλειστό καπάκι και ανακινείται καλά (Εικόνα 3.2) και (Εικόνα 3.3). Αφήνεται για λίγο στην ηρεμία, ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση, ανοίγεται το καπάκι για να εκτονωθεί και σιγά σιγά γυρίζει η βάνα προς την κατακόρυφη θέση για να τρέξει το υγρό (οργανική φάση) στη στρογγυλή φιάλη που βρίσκεται από κάτω. Κατά τη δεύτερη εκχύλιση προστίθενται 5ml DCM suprasoln σε κάθε μία φιάσκα, ανακινείται, ώστε να φύγει το πετρέλαιο από τα τοιχώματα και ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως την πρώτη φορά. Τέλος, στην τρίτη εκχύλιση προστίθενται 5ml DCM suprasoln και ομοίως με τις άλλες δύο εκχυλίσσεις. Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε τόσο για τα δείγματα με τις καλλιέργειες όσο και για τα δείγματα control (τυφλά).

Τα δείγματα control περιέχουν το πετρέλαιο και το ONR7 χωρίς ωστόσο να περιέχονται οι μικροοργανισμοί. Σκοπός είναι να συγκριθούν οι φιάσκες αυτές με τις φιάσκες των μικροοργανισμών για να διαπιστωθεί σε τι συγκέντρωση έχουν καταναλωθεί τα συστατικά του πετρελαίου, δηλαδή σε τι συγκέντρωση είναι οι αλειφατικοί (αλκάνια) και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες στο control σε σχέση με τα δείγματα των μικροοργανισμών. Επίσης, με τα δείγματα control βρίσκονται οι απώλειες στις ποσότητες των υδρογονανθράκων που μελετώνται από τους αβιοτικούς παράγοντες, όπως είναι η εξάτμιση.



Εικόνα 3.2: Εκχύλιση υδρογονανθράκων. Στήσιμο πειράματος. Εικόνα 3.3: Χοάνη εκχύλισης.

Απόσταξη υδρογονανθράκων

Η οργανική φάση που έχει προκύψει από την εκχύλιση τοποθετείται σε μια συσκευή που ονομάζεται ρότορας και η φιάλη αυτή κουμπώνει σε ειδική λαβή η οποία έχει τη δυνατότητα να ανεβοκατεβαίνει και να στριφογυρίζει. Έτσι, κατεβάζοντας τη φιάλη μέσα σε δοχείο με νερό το οποίο ζεσταίνεται στους 55-60°C, αρχίζει να γυρίζει η φιάλη στα 90-120rpm με σκοπό το διαχωρισμό του πετρελαίου από το DCM μέσω της απόσταξης. Το DCM καθώς εξατμίζεται μέσω κυκλώματος που ρέει παγωμένο νερό, συγκεντρώνεται ως υγρό ξανά μέσα σε στρογγυλό δοχείο. Στο τέλος της διαδικασίας της απόσταξης χρειάζεται στο πετρέλαιο να έχει μείνει και λίγο DCM για να είναι πιο εύκολη η μεταφορά του σε φιαλίδια (vials) των 4ml. Αν η μεταφορά δεν πραγματοποιηθεί αμέσως, τοποθετούνται οι φιάλες με το πετρέλαιο μέσα στον ξηραντήρα και το DCM εξατμίζεται εκεί για την αποφυγή υγρασίας.

Μεταφορά πετρελαίου σε φιαλίδια (vials) των 4ml

Έχοντας τις φιάλες με το πετρέλαιο από την απόσταξη και τα φιαλίδια των 4ml αρχίζει η μεταφορά (Εικόνα 3.4). Με τη γυάλινη πιπέτα του DCM suprasoln πέφτουν μερικές σταγόνες μέσα στη στρογγυλή φιάλη ενώ με μια άλλη γυάλινη πιπέτα συλλέγεται το πετρέλαιο-DCM και το μεταφέρεται στο φιαλίδιο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5-6 φορές έως ότου καθαρίσει το υγρό από τη φιάλη και την πιπέτα και είναι διάφανη. Μετά την τρίτη επανάληψη περιχύνονται και τα τοιχώματα με DCM για να φύγει το πετρέλαιο. Στη συνέχεια, τα γεμάτα φιαλίδια με πετρέλαιο και DCM τοποθετούνται πάνω σε ηλεκτρικό μάτι το οποίο ζεσταίνεται στους 55-60°C και στο στόμιό τους τοποθετούνται συρμάτινα σωληνάκια απ' όπου περνάει αέριο άζωτο ($N_{2(g)}$) για να εξατμίζει το DCM και να μην σχηματίζονται υδρατμοί. Όταν εξατμιστεί το DCM, τα φιαλίδια μπαίνουν στον ξηραντήρα, όπου ανάλογα την ποσότητα των δειγμάτων εφαρμόζεται κενό αέρος για 10-30 λεπτά. Το κενό αέρος εφαρμόζεται για να μην υπάρχει υγρασία και αλλοιωθούν τα δείγματα.



Εικόνα 3.4: Φιαλίδια (vials) των 4ml με πετρέλαιο-DCM.

Solid Phase Extraction (Εκχύλιση Στερεάς Φάσης)

Τα όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Εξάνιο C6 suprasolv
- DCM suprasolv
- 2 ογκομετρικοί κύλινδροι των 10ml
- Γυάλινες μικροπιπέτες
- Φιαλίδια των 4ml για το DCM
- Φιαλίδια των 10ml για το C6
- Φιαλίδια των 2ml για την αέρια χρωματογραφία
- SPE συσκευή, σύριγγες SPE και αντλία κενού

Μέθοδος

Από το εξάνιο C6 suprasolv χρειάζονται 6ml για την πρώτη έκπλυση, ώστε να περάσουν οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες και 4ml DCM suprasolv για τη δεύτερη έκπλυση.

Με τη χρήση της σύριγγας για το C6 βρέχεται η στήλη με 0.5ml C6. Πρέπει η στήλη να είναι υγρή πριν την έκπλυση του δείγματος. Γυρίζεται η βάνα στην οποία έχει τοποθετηθεί η στήλη προκειμένου ν' ανοίξει και να αρχίσει να τρέχει το υγρό. Κάτω από τη στήλη μέσα στην SPE συσκευή (Εικόνα 3.5) έχει τοποθετηθεί φιαλίδιο των 10ml για τη συλλογή του δείγματος, δηλαδή των αλειφατικών υδρογονανθράκων. Μόλις αρχίσει να κατεβαίνει το υγρό και λίγο πριν αγγίξει το πάνω μέρος του υλικού προσρόφησης, προστίθενται 0.5ml εξάνιο στο δείγμα (φιαλίδιο 4ml, που έχουν εξατμιστεί από τη διαδικασία της εκχύλισης) με μια γυάλινη μικροπιπέτα. Γίνονται εκπλύσεις με τη μικροπιπέτα για να ξεκολλήσει το δείγμα από τα τοιχώματα και ρίπτεται στη στήλη.



Εικόνα 3.5: SPE συσκευή.

Στην περίπτωση που είναι πολύ αργή η έκπλυση, εφαρμόζεται κενό στη στήλη, ώστε να κατέβει πιο γρήγορα το υγρό. Όταν αρχίσει πάλι να πέφτει η στάθμη του υγρού πάνω από το υλικό προσρόφησης, ξεπλένεται το δείγμα με εξάνιο και προστίθεται στη

στήλη. Με τον ίδιο τρόπο ρίχνονται και τα υπόλοιπα ml εξανίου με βήμα 1ml. Λίγο πριν πέσει η τελική ποσότητα εξανίου και πριν στεγνώσει η στήλη, προστίθενται 0.5ml DCM suprasolv και κλείνεται καλά η βρύση. Ανοίγεται με προσοχή το καπάκι της συσκευής και αλλάζονται τα φιαλίδια. Τοποθετείται φιαλίδιο των 4ml. Έπειτα, ξεπλένεται το δείγμα (το ίδιο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε και στην έκπλυση με το C6) με 0.5ml DCM suprasolv κι προστίθεται στη στήλη. Ξεπλένεται ξανά με 0.5ml DCM suprasolv και ρίπτεται στη στήλη.

Αν η ροή είναι αργή, εφαρμόζεται μεγαλύτερο κενό στη στήλη προσέχοντας να μην τρέξει πολύ γρήγορα το υγρό και στεγνώσει η στήλη. Ομοίως, προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα DCM suprasolv, σταδιακά με βήμα 1ml. Όταν η ροή τελειώσει, το κενό κλείνει, ανοίγεται το καπάκι της συσκευής και ξεπλένονται τα βрусάκια με μερικές σταγόνες DCM suprasolv, ώστε να πέσουν τυχόν υπολείμματα του δείγματος που έχουν κολλήσει εκεί. Τα δείγματα οδηγούνται προς εξάτμιση με ταυτόχρονο φύσημα μ' άζωτο. Τέλος, αφαιρείται το καπάκι της συσκευής και τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί, οι στήλες πετιούνται και ξεπλένεται η διάταξη με τα βрусάκια με DCM.

Μετά το τέλος της εξάτμισης των φιαλιδίων πραγματοποιείται η μεταφορά των δειγμάτων στα φιαλίδια των 2ml. Το αρχικό δείγμα, όπως έχει αναφερθεί χωρίστηκε σε δύο επιμέρους δείγματα, σε αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Ωστόσο, στο vial των 2ml πρέπει να μπει η αρχική ποσότητα, δηλαδή οι ποσότητες από τα δύο φιαλίδια, ώστε να μετρηθεί η συνολική ποσότητα πετρελαίου στο μηχάνημα αέριας χρωματογραφίας. Γι' αυτό το λόγο η έκπλυση κάθε φιαλιδίου πρέπει να γίνεται με προσοχή για να μεταφερθεί όλο το δείγμα και από τα τοιχώματα στο νέο φιαλίδιο και με σωστή χρήση ποσοτήτων εξανίου και DCM για να μην υπερχειλίσει το δείγμα. Όταν τελειώσει η μεταφορά, τα φιαλίδια εξατμίζονται με ταυτόχρονη χρήση αέριου αζώτου. Έπειτα, μεταφέρονται στον αέριο χρωματογράφο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των συστατικών του πετρελαίου. Η συγκέντρωση μετρείται σε όγκο 1ml, οπότε γίνεται αναγωγή στον όγκο των 20ml που είναι ο αρχικός όγκος δείγματος.

Χρησιμοποιείται εξάνιο C6 suprasolv για μεταφορά και έκπλυση τοιχωμάτων των αλειφατικών υδρογονανθράκων και DCM suprasolv για μεταφορά και έκπλυση τοιχωμάτων των αρωματικών υδρογονανθράκων.

3.3 Πειράματα

 Πείραμα 1. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων από το στέλεχος *Paracoccus* sp.

Το πείραμα αποσκοπεί στην κατανόηση του κατά πόσο οι μικροοργανισμοί αυτού του γένους έχουν ικανότητα αποικοδόμησης αλειφατικών ή/και αρωματικών υδρογονανθράκων πετρελαίου καθώς και την ικανότητα παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών (γαλακτωματοποίηση).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν η οπτική απορρόφηση του διαλύματος για τη μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω του φασματοφωτόμετρου. Επίσης, άλλη μέθοδος ήταν η ποιοτική μέτρηση για την ανίχνευση παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και η εκχύλιση του πετρελαίου με ακόλουθες μεθόδους την απόσταξη, την εκχύλιση στερεάς φάσης για το διαχωρισμό του πετρελαίου στα συστατικά του και την αέρια χρωματογραφία για την ανίχνευση αυτών των συστατικών.

Τα όργανα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml (x2)
- 12 φλάσκες των 250ml
- 6 φλάσκες των 50ml
- 3 χοάνες με τα βρυσάκια
- Γυάλινη σύριγγα
- Πιπέτα ακριβείας
- Κιβέτες
- Eppendorf για τη φυγοκέντρωση
- Διάλυμα ONR7
- Διάλυμα PBS
- Marine Broth
- Εξαδεκάνιο (Hexadecane)
- Διάλυμα ναφθαλινίου σε ακετόνη (Naphthalene)
- Φιλτραρισμένο πετρέλαιο (Crude Oil)
- DCM suprasolv
- Μικροοργανισμοί του γένους *Paracoccus*

Προετοιμασία πειράματος

Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 100ml Marine Broth, το οποίο είναι ένα διάφανο-κιτρινωπό θρεπτικό κατάλληλο για θαλάσσιους μ/ο για την ανάπτυξη και «ενεργοποίησή» τους, καθώς βρίσκονται σε ειδικά Eppendorf στους -82°C σε αδράνεια. Το Marine Broth τοποθετήθηκε σε φλάσκα μαζί με τους μ/ο του γένους *Paracoccus*. Η φλάσκα έκλεισε με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και μπήκε σε αναδευτήρα στα 100rpm για την επώασή τους σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώασή τους το χρώμα της καλλιέργειας από διάφανο-κιτρινωπό υγρό έγινε έντονο κίτρινο-πορτοκαλί (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Ανάπτυξη του βακτηρίου *Paracoccus marcusii* σε θρεπτικό Marine Broth.

Διεξαγωγή πειράματος

Παρακάτω αναφέρονται οι όροι «μικροβιακές φλάσκες» και «φλάσκες υδρογονανθράκων». Με τον πρώτο όρο εννοούνται οι φλάσκες που περιέχουν τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών σε διαφορετικά υποστρώματα και μετρίεται η αύξηση του πληθυσμού στο φασματοφωτόμετρο. Με το δεύτερο όρο εννοούνται οι φλάσκες που περιέχουν τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών μόνο σε πετρέλαιο και πραγματοποιείται εκχύλιση αυτού.

Μικροβιακές φλάσκες

Στις φλάσκες των 250ml μπήκε σε κάθε μία ένα διαφορετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αυτά είναι εξαδεκάνιο (αλειφατικός υδρογονάνθρακας), (Εικόνα 3.7) ναφθαλίνιο (αρωματικός υδρογονάνθρακας), marine broth και crude oil (αργό πετρέλαιο) (Εικόνα 3.8). Κάθε φλάσκα περιείχε 75ml ONR7 + 0.5%v/v Hexadecane (ή crude oil ή Naphthalene) + 1% v/v μικροοργανισμούς (Πίνακας 3.1). Για κάθε ένα υπόστρωμα αντιστοιχούσαν 3 φλάσκες, δηλαδή συνολικά μετρήθηκαν 12 φλάσκες. Οι 12 φλάσκες αποτέλεσαν τις μικροβιακές φλάσκες (microbial flasks) όπου μετρήθηκε ο πληθυσμός των μικροβίων. Η προετοιμασία των φλασκών έγινε μέσα σε απαγωγό και θερμοκρασία $T=20^{\circ}\text{C}$. Η μέτρηση

πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 1, 2, 3, 7, 10, 14 από την έναρξη του πειράματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα $\lambda=600\text{nm}$

Αρχικά, μετρήθηκε η βιομάζα της αρχικής καλλιέργειας, όπου για τη μέτρηση χρειάστηκαν 2ml από το δείγμα τα οποία προστέθηκαν σε κιβέτα. Μ' όμοιο τρόπο έγινε και η μέτρηση των υπόλοιπων δειγμάτων, εκτός του πετρελαίου. Ωστόσο, πριν τη μέτρηση της βιομάζας των καλλιεργειών, μετρήθηκαν τα «τυφλά» δείγματα για τη βαθμονόμηση του οργάνου. Αυτά ήταν ONR7 για τη μέτρηση των καλλιεργειών με εξαδεκάνιο και ναφθαλίνιο και Marine Broth για τα δείγματα με Marine Broth. Έπειτα, οι φλάσκες με τις καλλιέργειες επέστρεψαν στον αναδευτήρα στα 100rpm.

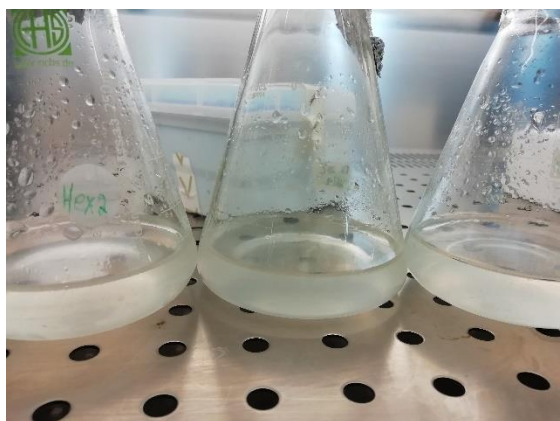
Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιούταν σε κάθε μέτρηση.

Η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων με το πετρέλαιο έγινε αφού τα δείγματα μπήκαν στη φυγοκέντριση.

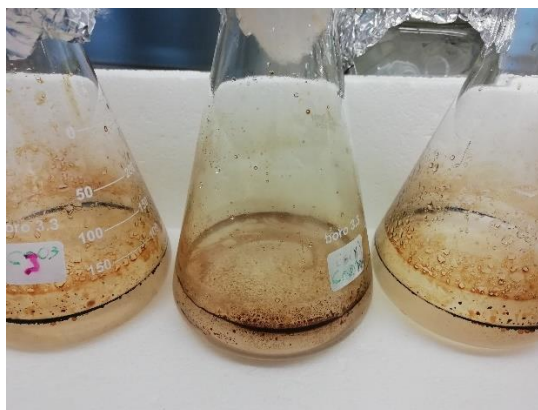
Πίνακας 3.1: Αναλυτικές ποσότητες καλλιεργειών πειράματος 1.

Καλλιέργεια 1	75ml ONR7 + 375μl Hexadecane + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 2**	75ml ONR7 + 375μl Naphthalene + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 3	75ml Marine Broth + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 4	75ml ONR7 + 375μl Crude Oil + 750μl μικροοργανισμοί

** Σ' αυτήν την περίπτωση πρώτα μπήκε το ναφθαλίνιο. Το ναφθαλίνιο είναι στερεό και για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ναφθαλινίου σε ακετόνη. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το ναφθαλίνιο παρέμεινε στη βάση της φλάσκας και κατόπιν προστέθηκαν το θρεπτικό κι οι μικροοργανισμοί. Έγινε μ' αυτόν τον τρόπο διότι η ακετόνη είναι οργανικός διαλύτης και δεν πρέπει να βρίσκεται μέσα στις καλλιέργειες αφού σκοπός είναι οι μικροοργανισμοί να χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα τους υδρογονάνθρακες και να τους αποικοδομήσουν.



Εικόνα 3.7: Φλάσκες με εξαδεκάνιο.



Εικόνα 3.8: Φλάσκες με πετρέλαιο.


Φλάσκες υδρογονανθράκων

Στις φλάσκες των 50ml προστέθηκε σε κάθε μία πετρέλαιο (crude oil) και μικροοργανισμοί. Συνολικά φτιάχτηκαν 6 φλάσκες όπου κάθε μία περιείχε 20ml ONR7 +0.5%v/v crude oil + 1%v/v μικροοργανισμούς και αποτέλεσαν τις φλάσκες υδρογονανθράκων (HC flasks). Σκοπός ήταν να εκχυλιστούν αυτές οι ποσότητες πετρελαίου, ώστε να μείνει όσο το δυνατόν καθαρό πετρέλαιο και να διαχωριστεί στα συστατικά του, δηλαδή σε μη αρωματικούς (αλκάνια) υδρογονάνθρακες και αρωματικούς. Έτσι, μέσω άλλων διαδικασιών μετρήθηκαν τα εναπομείναντα συστατικά του πετρελαίου, αυτά τα οποία δεν έχουν καταναλωθεί από τους μικροοργανισμούς. Για τις 3 πρώτες φλάσκες η εκχύλιση έγινε στις 7 μέρες και για τις επόμενες 3 στις 14 μέρες.

Η ακριβής ποσότητα που τοποθετήθηκε σε κάθε φλάσκα ήταν η εξής:

20ml ONR7 + 100μl Crude Oil + 200μl μικροοργανισμοί

Για την προσθήκη του πετρελαίου στις φλάσκες χρησιμοποιήθηκε γυάλινη σύριγγα των 100μl. Για το ξέπλυμα της σύριγγας έγινε χρήση DCM, ο οποίος είναι ένας οργανικός διαλύτης κατάλληλος για την απομάκρυνση πετρελαίου και γενικότερα των υδρογονανθράκων από τα όργανα του πειράματος.

 Πείραμα 2. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων με προσθήκη πεπτόνης σε καλλιέργειες *Alcanivorax venustensis*.

Σκοπός του πειράματος είναι η μελέτη του κατά πόσο το *Alcanivorax venustensis* (στέλεχος HP CEWAF) αποικοδομεί το πετρέλαιο ευκολότερα με την παρουσία άλλης πηγής άνθρακα.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος ήταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών για τη μέτρηση της αναπτυσσόμενης βιομάζας και η ποιοτική μέτρηση για την ανίχνευση παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών.

Τα όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml (x2)
- 16 φλάσκες των 250ml
- 1 φλάσκα των 50ml
- Πιπέτα ακριβείας
- Κιβέτες
- Eppendorf για τη φυγοκέντρωση
- Διάλυμα ONR7
- Διάλυμα πεπτόνης
- Εξαδεκάνιο (Hexadecane)
- Διάλυμα ναφθαλινίου σε ακετόνη (Naphthalene)
- Μικροοργανισμοί του γένους *Alcanivorax venustensis*

Ενεργοποίηση μικροοργανισμών από stock σε γλυκερόλη

Σε μία φλάσκα των 250ml:

75ml ONR7 + 375μl Crude Oil + μικροοργανισμοί HP CEWAF (3)

Προετοιμασία πειράματος

Η προεργασία που αναφέρθηκε παραπάνω έγινε με σκοπό να «ενεργοποιηθούν» οι μικροοργανισμοί γι' αυτό το πείραμα. Αφού πέρασαν κάποιες μέρες πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της καλλιέργειας. Επειδή οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν μέσα σε πετρέλαιο ακολουθήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρισης πριν τη μέτρηση της βιομάζας στο φωτόμετρο. Μετά το πέρας των μετρήσεων της αρχικής καλλιέργειας ξεκίνησε το κυρίως πείραμα με τους μικροοργανισμούς HP CEWAF (3) (*A. venustensis*).

Πριν την έναρξη του πειράματος έγινε προετοιμασία των μικροοργανισμών για την ανάπτυξή τους στις καλλιέργειες, αλλά και να προστεθεί η ίδια αρχική ποσότητα μικροοργανισμών σ' όλες τις φλάσκες. Αρχικά, προστέθηκαν 2ml δείγματος της αρχικής καλλιέργειας με τους μικροοργανισμούς HP CEWAF (3) σε 14 Errendorf. Έπειτα, ακολουθήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρισης η οποία όταν τελείωσε το περιεχόμενο από το πρώτο Errendorf άδειασε στο δοχείο αποβλήτων και προστέθηκαν 2ml PBS. Ανακινήθηκε ώστε ν' διαλυθεί η βιομάζα, μεταφέρθηκε σε κιβέτα και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0.5ml ONR7 στα υπόλοιπα Errendorf, ανακινήθηκαν και μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα σε φιαλιδίων των 7ml. Φτιάχτηκαν, ακόμη, 14 Errendorf λόγω της μικρής ποσότητας.

Διεξαγωγή πειράματος

Προετοιμασία φλασκών

Μικροβιακές φλάσκες

Σε φλάσκες των 250ml προστέθηκε σε κάθε μία ένα διαφορετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αυτά ήταν εξαδεκάνιο (αλειφατικός υδρογονάνθρακας), ναφθαλίνιο (αρωματικός υδρογονάνθρακας), πεπτόνη, εξαδεκάνιο+πεπτόνη και ναφθαλίνιο+πεπτόνη. Κάθε υπόστρωμα περιείχε 75ml ONR7 + 0.5%v/v Hexadecane (ή Naphthalene) + 1% v/v μικροοργανισμούς (Πίνακας 3.2). Το θρεπτικό μέσο στις καλλιέργειες με πεπτόνη παρασκευάστηκε με 1L ONR7 + 0.5%v/v peptone. Ομοίως οι καλλιέργειες με πεπτόνη περιείχαν 75ml ONR7 + 0.5%v/v Hexadecane + peptone (ή Naphthalene + peptone ή ONR7 + peptone) + 1% v/v μικροοργανισμούς. Για κάθε ένα υπόστρωμα αντιστοίχησαν 3 φλάσκες (με εξαίρεση το υπόστρωμα ναφθαλίνιο όπου παρασκευάστηκαν 2 φλάσκες με 75ml ONR7 και 1 φλάσκα με 20ml ONR7), δηλαδή συνολικά φτιάχτηκαν 14 φλάσκες (Εικόνα 3.9). Αυτές είναι οι μικροβιακές φλάσκες στις οποίες μετρήθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 1, 2, 3, 7, 10, 14 από την έναρξη του πειράματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου σε μήκος κύματος $\lambda=600\text{nm}$. Η προετοιμασία των φλασκών έγινε μέσα σε απαγωγό και θερμοκρασία $T=20^{\circ}\text{C}$.

Πίνακας 3.2: Αναλυτικές ποσότητες καλλιέργειών πειράματος 2.

Καλλιέργεια 1	75ml ONR7 + 375μl Hexadacane + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 2	<ul style="list-style-type: none"> 75ml ONR7+Peptone + 375μl Naphthalene + 750μl μικροοργανισμοί (250ml) 20ml ONR7+Peptone + 100μl Naphthalene + 200μl μικροοργανισμοί (50ml)
Καλλιέργεια 3	75ml ONR7+Peptone + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 4	75ml ONR7+Peptone + 375μl Hexadacane + 750μl μικροοργανισμοί
Καλλιέργεια 5	75ml ONR7 + 375μl Naphthalene + 750μl μικροοργανισμοί

Αφού φτιάχτηκαν οι καλλιέργειες, τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα στα 100rpm. Η σύριγγα ξεπλύθηκε με DCM.

Τις ημέρες 1, 2, 3, 7, 10 και 14 μετρήθηκε η βιομάζα των μικροβιακών φλασκών με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου στα 600nm. Αρχικά, μετρήθηκε το τυφλό δείγμα. Σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε το ONR7 για τις καλλιέργειες με εξαδεκάνιο και ναφθαλίνιο ενώ χρησιμοποιήθηκε ONR7+peptone για τις καλλιέργειες με πεπτόνη.

Κατά την τελευταία μέρα των μετρήσεων (14^η) πραγματοποιήθηκε και η διαδικασία της ποιοτικής εκτίμησης για την ανίχνευση παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών, δηλαδή η γαλακτοματοποίηση των δειγμάτων, όπως και στο πρώτο πείραμα. Για κάθε καλλιέργεια αντιστοιχούσαν 2 γυάλινα φιαλίδια, συνολικά ήταν 30 δείγματα.



Εικόνα 3.9: Φλάσκες με τις καλλιέργειες του πειράματος 2.

✚ Πείραμα 3. Σύγκριση δύο στελεχών του γένους *Alcanivorax* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.

Σκοπός του πειράματος είναι να βρεθεί αν τα δύο στελέχη του γένους *Alcanivorax* παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ανάπτυξη και την ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων, εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία (14°C vs. 25 °C). Πρόκειται για στελέχη των *A. venustensis* και *A. borkumensis* που έχουν απομονωθεί οι μεν πρώτοι από δείγμα θαλασσινού νερού από 1000m βάθος στην ανατολική Μεσόγειο ενώ οι δεύτεροι από τη θάλασσα της Ελευσίνας.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η οπτική απορρόφηση για την μέτρηση της ανάπτυξης της βιομάζας των καλλιεργειών και η εκχύλιση του πετρελαίου.

Τα όργανα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml (x2)
- 24 φλάσκες των 50ml
- 3 χοάνες με τα βρυσάκια
- Γυάλινη σύριγγα
- Πιπέτα ακριβείας
- Κιβέτες
- Eppendorf για τη φυγοκέντρωση
- Διάλυμα ONR7
- Διάλυμα PBS
- Εξαδεκάνιο (Hexadecane)
- Διάλυμα ναφθαλινίου σε ακετόνη (Naphthalene)
- Φιλτραρισμένο πετρέλαιο (Crude Oil)
- DCM suprasolv
- Μικροοργανισμοί του γένους *Alcanivorax*

Προετοιμασία πειράματος

Πρώτα μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δύο αρχικών καλλιεργειών για να διαπιστωθεί ότι ο μικροβιακός πληθυσμός επαρκεί για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Διεξαγωγή πειράματος

Προετοιμασία φλασκών

Μικροβιακές φλάσκες

Σε φλάσκες των 50ml προστέθηκε πετρέλαιο (crude oil) ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η εξέλιξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε σε δύο θερμοκρασίες, 14°C και 25°C. Τελικά δημιουργήθηκαν 4 ζευγάρια συνθηκών, όπου για κάθε ζευγάρι αντιστοιχούσαν 3 φλάσκες (Πίνακας 3.3). Κάθε καλλιέργεια περιείχε 30ml ONR7 + 0.5%v/v crude oil + 1% μικροοργανισμούς. Συνολικά δημιουργήθηκαν 12 μικροβιακές φλάσκες για τη μέτρηση της βιομάζας των καλλιεργειών. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 1, 3, 7, 10, 14 από την έναρξη του πειράματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου με μήκος κύματος $\lambda=600\text{nm}$. Αρχικά, μετρήθηκε το τυφλό δείγμα. Σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε το ONR7 για όλες τις καλλιέργειες. Πριν τη μέτρηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρωσης των δειγμάτων καθώς περιείχαν πετρέλαιο. Η προετοιμασία των φλασκών έγινε μέσα σε απαγωγό.

Οι καλλιέργειες των 14°C μπήκαν στο ψυγείο σ' αυτήν τη θερμοκρασία, ενώ οι καλλιέργειες των 25°C σε δωμάτιο αντίστοιχης θερμοκρασίας (Εικόνα 3.10). Όλες οι καλλιέργειες είχαν τοποθετηθεί πάνω σε αναδευτήρα στα 104rpm.

Πίνακας 3.3: Αναλυτικές ποσότητες καλλιεργειών πειράματος 3.

<i>Alcanivorax</i>			
14°C		25°C	
venustensis	borkumensis	venustensis	borkumensis
30ml ONR7 + 150μl crude oil + 300μl μικροοργανισμοί		30ml ONR7 + 150μl crude oil + 300μl μικροοργανισμοί	



Εικόνα 3.10: Καλλιέργεια με υπόστρωμα crude oil *Alcanivorax venustensis* 25°C.

Φλάσκες υδρογονανθράκων

Δημιουργήθηκαν 12 φλάσκες των 50ml με σκοπό την εκχύλιση των δειγμάτων κατά την τελευταία μέρα του πειράματος, δηλαδή την 14^η μέρα. Επίσης, φτιάχτηκαν και 3 φλάσκες των 50ml οι οποίες αποτέλεσαν τα δείγματα control και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία της εκχύλισης. Σε κάθε φλάσκα προστέθηκαν 30ml ONR7 + 0.5%v/v crude oil + 1% μικροοργανισμοί (Πίνακας 3.3).

Μετά το πέρας ολόκληρης της διαδικασίας της εκχύλισης, ξεκίνησε η διαδικασία διαχωρισμού του πετρελαίου στα συστατικά του μέσω στηλών.

Μετά το πέρας των χημικών και βιολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των χρωματο-γραφημάτων με το πρόγραμμα GC-MS data analysis και η εισαγωγή και περαιτέρω ανάλυση στο υπολογιστικό πρόγραμμα excel. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία εισήχθησαν στο excel και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες πράξεις για τη διεξαγωγή των διαγραμμάτων. Οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία ήταν σε ppm (parts per million) και αναφέρονταν σε 1ml δείγματος γι' αυτό έγινε η κατάλληλη αναγωγή στην αρχική ποσότητα δείγματος δηλαδή στα 20ml. Προκύπτει, επομένως, $\frac{ppm}{20ml\ extract}$. Επίσης, δεν ήταν δυνατή η παρουσίαση κάποιων

αλκανίων και αρωματικών υδρογονανθράκων καθώς είχαν προκύψει μηδενικές τιμές συγκέντρωσης.

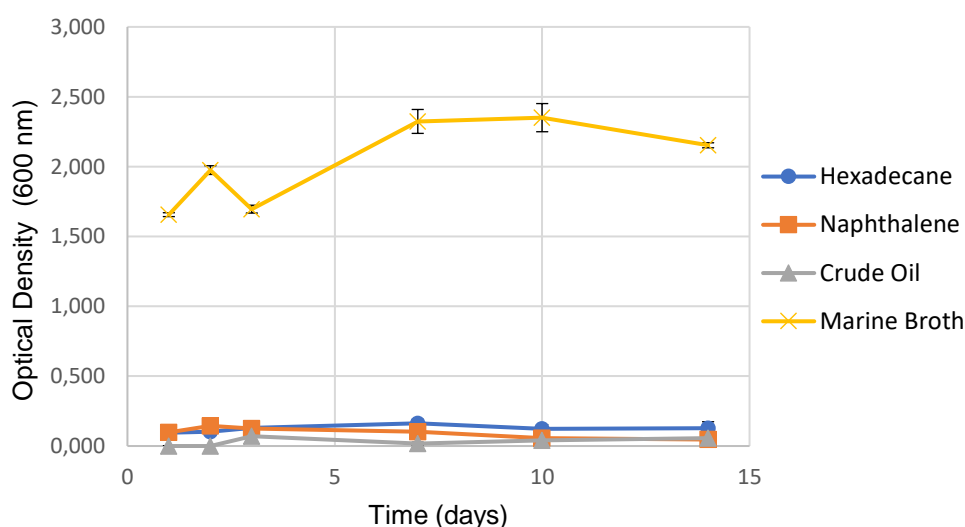
4. Πειραματικά Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων υπό τη μορφή γραφημάτων και πίνακα. Η μονάδα μέτρησης των αποτελεσμάτων είναι abs (absorbance= απορρόφηση) και ppm (particles per million ή mg/kg).

Κανένα εξεταζόμενο βακτήριο δεν αποικοδόμησε τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH), οπότε παρουσιάζονται μόνο τα διαγράμματα αποδόμησης των αλκανίων.

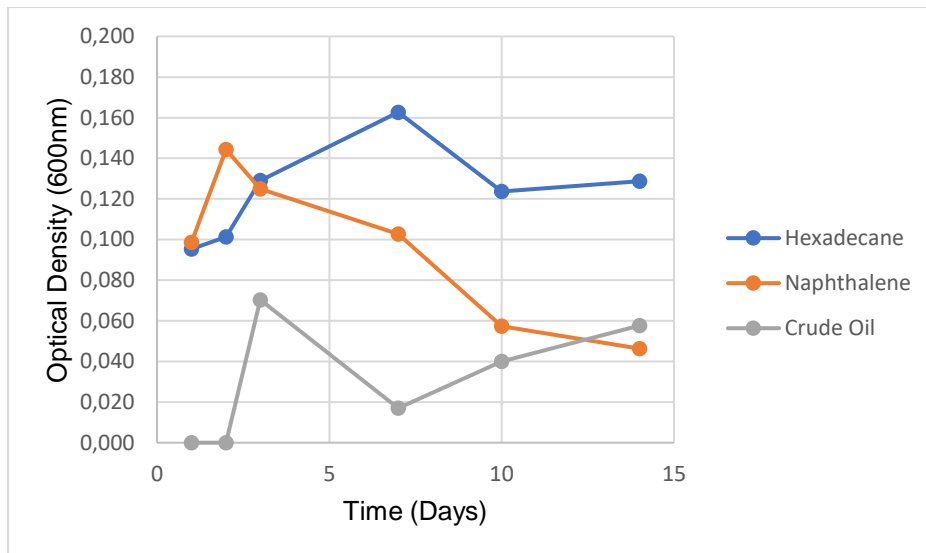
4.1 Πείραμα 1. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων από το στέλεχος *Paracoccus* sp.

Στο γράφημα 4.1.α παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε τέσσερα υποστρώματα. Όπως φαίνεται η ανάπτυξη του *Paracoccus* σε Marine Broth είναι η μέγιστη. Αυτό συμβαίνει διότι το Marine Broth είναι ένα θρεπτικό κατάλληλο για τη γρήγορη ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



Γράφημα 4.1.α: Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου *Paracoccus* sp. σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο, ναφθαλίνιο, αργό πετρέλαιο και Marine Broth.

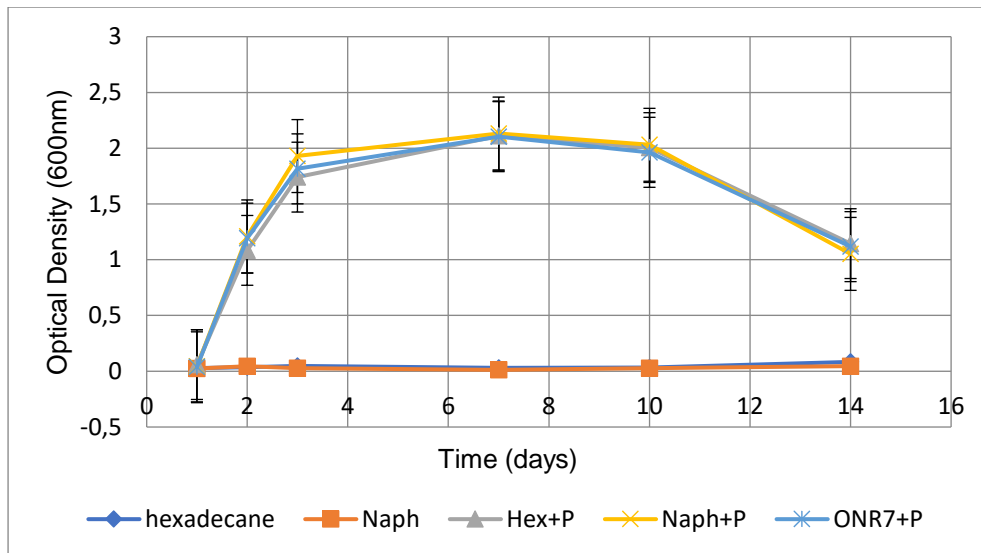
Παρατηρώντας το γράφημα 4.1.β φαίνεται πως το *Paracoccus* χωρίς την παρουσία Marine Broth η ανάπτυξη του πληθυσμού πραγματοποιείται με χαμηλότερο ρυθμό. Μεγαλύτερη ανάπτυξη φαίνεται ότι έγινε σε υπόστρωμα εξαδεκανίου με μέγιστη τιμή οπτικής απορρόφησης 0.163abs, δηλαδή στην εκθετική φάση της καμπύλης ανάπτυξης. Επίσης, παρατηρείται πως και στο πετρέλαιο (crude oil) υπάρχει ανάπτυξη του πληθυσμού του βακτηρίου, αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό όπως στο εξαδεκάνιο, αφού η μέγιστη τιμή οπτικής απορρόφησης είναι 0.07abs. Αντίθετα, δεν παρατηρείται καθόλου αύξηση στο υπόστρωμα ναφθαλινίου.



Γράφημα 4.1.β: Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου *Paracoccus* sp. σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο, ναφθαλίνιο και αργό πετρέλαιο.

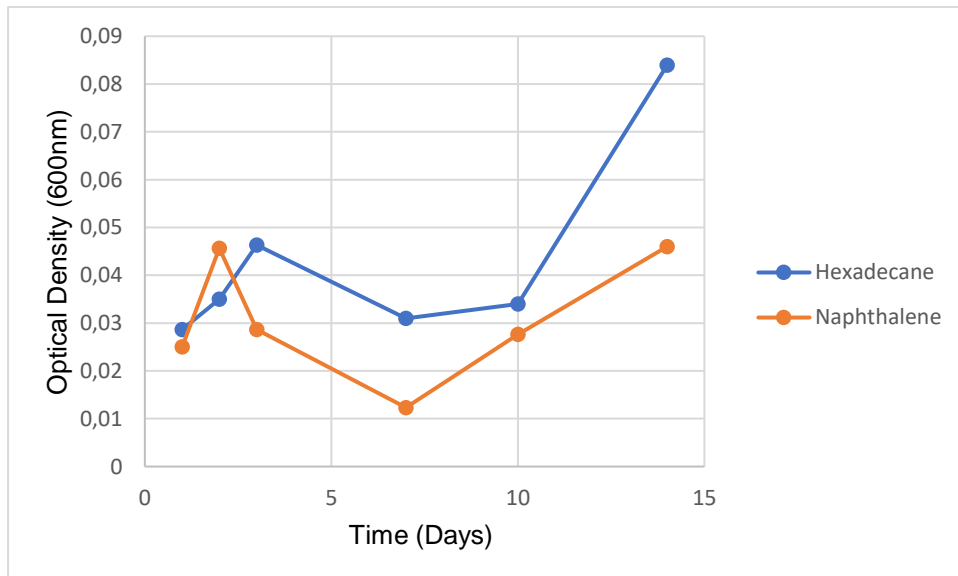
4.2 Πείραμα 2. Αποικοδόμηση υδρογονανθράκων με προσθήκη πεπτόνης σε καλλιέργειες *Alcanivorax venustensis*.

Στο παραπάνω διάγραμμα (Γράφημα 4.2.α) παρουσιάζονται οι καμπύλες μικροβιακής ανάπτυξης σε διάφορα υποστρώματα μαζί με μια εναλλακτική πηγή άνθρακα προερχόμενη από οργανική ένωση. Παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης όπου το υπόστρωμα είναι το εξαδεκάνιο και το ναφθαλίνιο, οι δύο καμπύλες-ευθείες είναι παράλληλες και σταθερές ως προς τον άξονα του χρόνου, γεγονός που δηλώνει ότι η μικροβιακή ανάπτυξη ήταν ελάχιστη. Το αντίθετο φαίνεται στις καμπύλες όπου τα υποστρώματα εκτός από υδρογονάνθρακες περιέχουν και οργανική πηγή άνθρακα. Οι καμπύλες έχουν παρόμοια μορφή με την καμπύλη ανάπτυξης του πρώτου πειράματος που το υπόστρωμα ήταν το Marine Broth. Ξεκινάει από μία μηδενική τιμή (0.04abs), αυξάνει σταδιακά μέχρι την τιμή μέγιστης ανάπτυξης (2.103abs) και έπειτα φθίνει μέχρι τη μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών (1.117abs). Τέλος, στο γράφημα 4.2.β φαίνεται πως η ανάπτυξη του πληθυσμού, αφού η μέγιστη τιμή οπτικής απορρόφησης είναι 0.0833 στο εξαδεκάνιο.



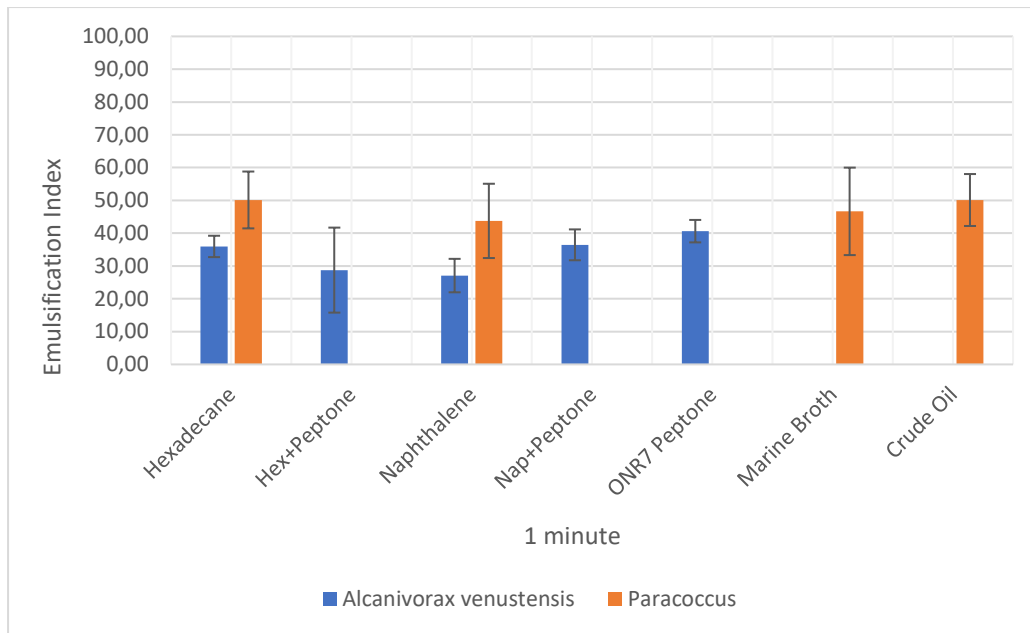
Γράφημα

4.2.α: Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου *Alcanivorax venustensis* σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο, ναφθαλίνιο, και σε ONR7 μαζί με πεπτόνη με δεκαεξάνιο και ναφθαλίνιο.



Γράφημα 4.2.β: Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών του βακτηρίου *Alcanivorax venustensis* σε θρεπτικό ONR7 με δεκαεξάνιο και ναφθαλίνιο.

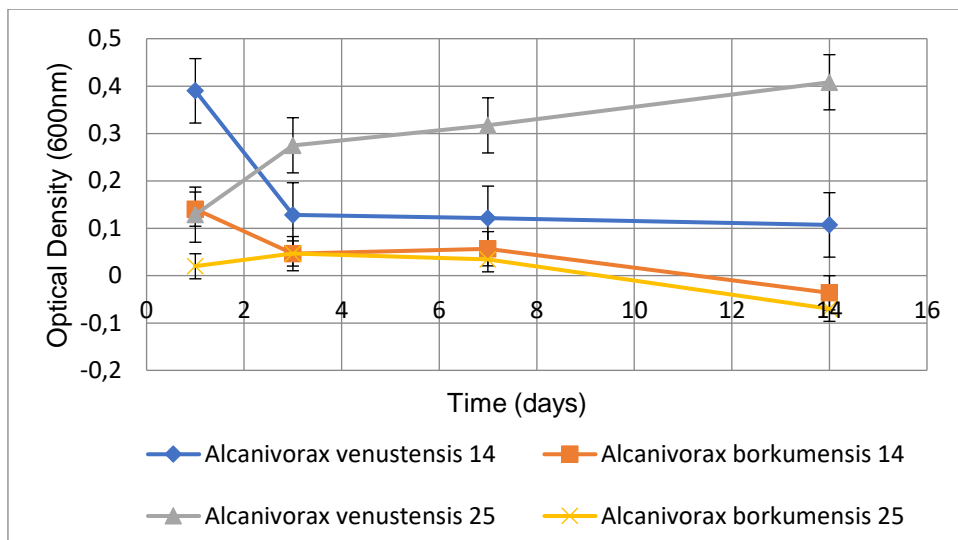
Στο γράφημα 4.3 παρουσιάζεται και συγκρίνεται ο δείκτης γαλακτωματοποίησης των υποστρωμάτων εξαδεκάνιο, εξαδεκάνιο με πεπτόνη, ναφθαλίνιο, ναφθαλίνιο με πεπτόνη, ONR7 με πεπτόνη, Marine Broth και πετρέλαιο από τους μικροοργανισμούς *Paracoccus* και *Alcanivorax venustensis*. Όπως φαίνεται το *Paracoccus* παράγει περισσότερη ποσότητα επιφανειοδραστικών ουσιών σε σχέση με το *Alcanivorax venustensis* ανεξάρτητα από το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκεται.



Γράφημα 4.3: Δείκτης γαλακτωματοποίησης των καλλιιεργειών *Paracoccus* και *Alcanivorax venustensis* σε θερμοκρασία T=25°C. Υποστρώματα: εξαδεκάνιο, εξαδεκάνιο με πεπτόνη, ναφθαλίνιο, ναφθαλίνιο με πεπτόνη, ONR7 με πεπτόνη, Marine Broth και πετρέλαιο (crude oil).

4.3 Πείραμα 3. Σύγκριση δύο στελεχών του γένους *Alcanivorax* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.

Παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης σε υπόστρωμα πετρελαίου (crude oil) (Γράφημα 4.4) φαίνεται πως η κάθε μία συμπεριφέρεται ξεχωριστά. Αρχικά, η καμπύλη που παριστάνει την οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας του *A. venustensis* σε T=14°C ξεκινάει από σχετικά υψηλή τιμή (0.39abs) το οποίο δείχνει πως ο πληθυσμός των βακτηρίων αρκετά γρήγορα τις πρώτες μέρες και έπειτα μειώνεται (0.121abs) και παραμένει σταθερός στον άξονα του χρόνου. Αυτό δείχνει πως σ' αυτήν τη θερμοκρασία ανταποκρίνεται καλά και αποικοδομεί. Επίσης, το ίδιο στέλεχος στους 25°C ακολουθεί την καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων, δηλαδή ξεκινάει από χαμηλή τιμή (φάση προσαρμογής, 0.13abs), έπειτα αυξάνει μέχρι τη μέγιστη τιμή (φάση αύξησης, 0.4abs) κι στασιμότητας. Αυτό σημαίνει πως το βακτήριο ανταποκρίθηκε εξίσου καλά και σ' αυτήν τη θερμοκρασία. Το στέλεχος *A. borkumensis* και στις δύο θερμοκρασίες παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά, αφού ξεκινάει από σχετικά υψηλή τιμή (0.14abs), που σημαίνει ότι αναπτύχθηκαν γρήγορα, αλλά έχει και απότομη πτώση το οποίο δηλώνει ότι «έφαγαν» σύντομα τους υδρογονάνθρακες.

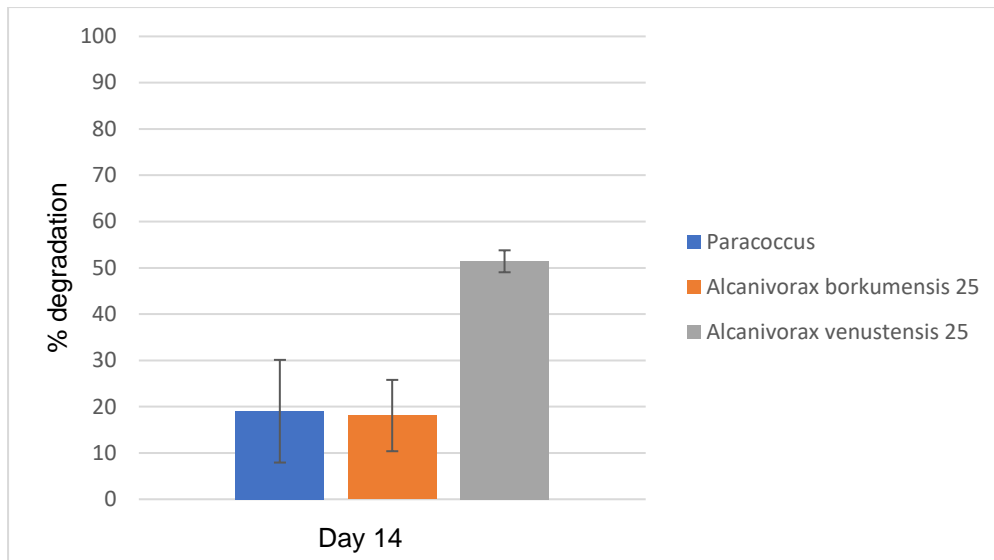


Γράφημα 4.4: Οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών των στελεχών *Alcanivorax borkumensis* & *Alcanivorax venustensis* σε crude oil και σε δύο θερμοκρασίες, $T=25^{\circ}\text{C}$ και $T=14^{\circ}\text{C}$.

4.4 Σύγκριση ικανότητας αποικοδόμησης αλκανίων από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.

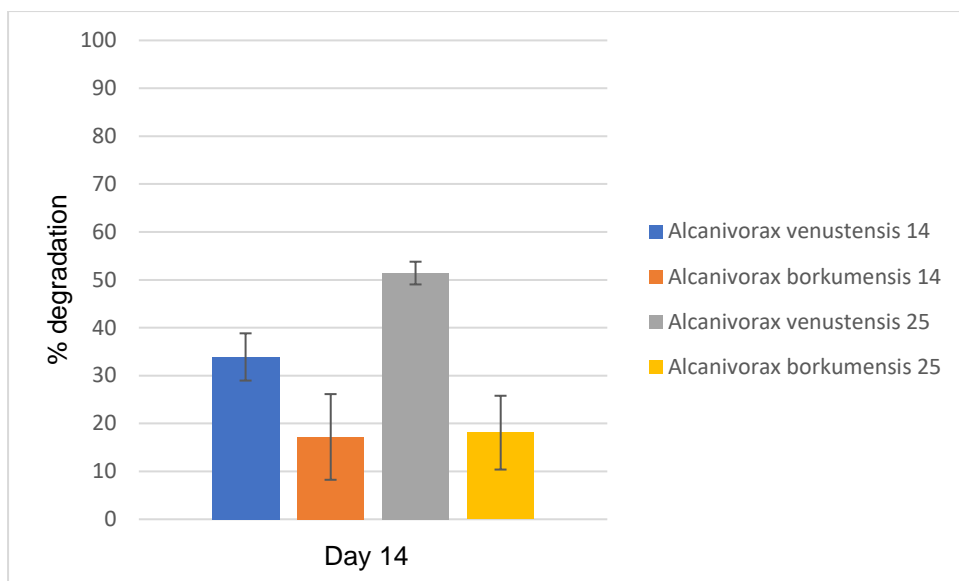
Πραγματοποιήθηκε, ακόμη, το t-test για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (one way anova $p<0,05$) και τη διεξαγωγή της τιμής p η οποία τιμή αν είναι μικρότερη του 0.05 ($p<0.05$) το ένα βακτήριο συγκριτικά με το άλλο έχει αποδομήσει μεγαλύτερο ποσοστό αλκανίων.

Το γράφημα ράβδων 4.5 απεικονίζεται την αποικοδόμηση των αλκανίων από το *Paraccocus*, *A. borkumensis* και *A. venustensis* σε θερμοκρασία $T=25^{\circ}\text{C}$. Παρατηρείται πως το ποσοστό αποδόμησης των αλκανίων είναι κοντινό μεταξύ του *Paraccocus* (αποδόμηση 19%) και του *A. borkumensis* (αποδόμηση 18%) το οποίο σημαίνει πως οι δύο μικροοργανισμοί αποικοδόμησαν με παρόμοιο τρόπο τα αλκάνια στην ίδια θερμοκρασία (one-way anova $F=7.70$, $p=0.83$). Το αντίθετο φαίνεται στη σύγκριση μεταξύ του *Paraccocus* και του *Alcanivorax venustensis*, αφού το $p=0.002$ και αυτό δείχνει πως το *Alcanivorax venustensis* αποικοδόμησε σε αρκετά μεγαλύτερο βαθμό τ' αλκάνια, κατ' αντιστοιχία σε ppm αποικοδόμησε 173ppm αλκανίων. Τελικά, το *A. venustensis* το οποίο βρίσκεται στην ίδια θερμοκρασία ($T=25^{\circ}\text{C}$) με το *Paraccocus* και το *A. borkumensis*, αποικοδομεί σε μεγαλύτερο ποσοστό τα αλκάνια συγκριτικά με τα δύο βακτήρια.



Γράφημα 4.5: % αποικοδόμηση αλκανίων από το βακτήριο *Paracoccus* συγκριτικά με το *Alcanivorax borkumensis* και *Alcanivorax venustensis* σε θερμοκρασία $T=25^{\circ}\text{C}$.

Το γράφημα 4.6 παρουσιάζει την αποικοδόμηση των αλκανίων από δύο διαφορετικά στελέχη του ίδιου βακτηρίου, όπου το ένα προέρχεται από βαθιά νερά και τ' άλλο από επιφανειακά νερά. Μελετώντας το διάγραμμα φαίνεται πως το στέλεχος που προέρχεται από τα βαθιά νερά (*A. venustensis*) ανταποκρίνεται καλύτερα και αποικοδομεί σε μεγαλύτερο ποσοστό τα αλκάνια, σε ποσοστό 34% συγκριτικά με το επιφανειακό στέλεχος (17%) στην ίδια θερμοκρασία 14°C (one-way anova $F=7.70$, $p=0.045$). Ακόμη, παρατηρώντας το γράφημα φαίνεται πως το *A. venustensis* αποικοδομεί σε μεγαλύτερο βαθμό τους υδρογονάνθρακες, 51.4% συγκριτικά με το επιφανειακό στέλεχος (*A. borkumensis*), δηλαδή η τιμή του $p=0.000183$. Τέλος, μεταξύ του ίδιου στελέχους *Alcanivorax borkumensis* στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, η τιμή του $p=0.88$ που δείχνει ότι το βακτήριο ανταποκρίνεται με τον ίδιο τρόπο και στις δύο θερμοκρασίες, ενώ συγκρίνοντας το *Alcanivorax venustensis* στους 14°C και 25°C , προκύπτει ξανά πως σε θερμοκρασία 25°C ανταποκρίνεται καλύτερα καθώς το $p=0.0034$. Το γεγονός αυτό δηλώνει πως το στέλεχος από τα βαθιά νερά ανταποκρίνεται εξίσου καλά και σε συνθήκες περιβάλλοντος.



Γράφημα 4.6: % αποικοδόμηση αλκανίων από το στέλεχος *Alcanivorax venustensis* συγκριτικά με το *Alcanivorax borkumensis* σε θερμοκρασία T=14°C και T=25°C .

Πίνακας 4.1: Αποικοδόμηση αλκανίων σε ppm εντός 14 ημερών.

	Αποικοδόμηση (ppm)	% αποικοδόμηση
Paracoccus	64	19.02
Alcanivorax venustensis 14°C	114	33.9
Alcanivorax venustensis 25°C	173	51.41
Alcanivorax borkumensis 14°C	58	17.19
Alcanivorax borkumensis 25°C	61	18.07

5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την προσομοίωση της απομάκρυνσης του πετρελαίου από το θαλασσινό νερό με τη χρήση μικροοργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο. Ειδικότερα, συγκρίνονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την καλλιέργεια του βακτηρίου *Paracoccus* με την αντίστοιχη του *Alcanivorax venustensis* και του *Alcanivorax borkumensis*, αλλά και των δύο στελεχών *Alcanivorax* μεταξύ τους.

Μελετώντας και αναλύοντας τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα. Αρχικά, το βακτήριο *Paracoccus* αναπτύσσεται ταχύτερα στο Marine Broth, αφού η μέγιστη τιμή της οπτικής απορρόφησης ήταν 2.35abs στη 10^η μέρα των μετρήσεων, σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα κάτω το οποίο είναι αναμενόμενο, αφού είναι θρεπτικό που επιτρέπει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το ίδιο βακτήριο δεν έχει αποικοδομήσει καθόλου τα PAH όπως και τα δύο στελέχη του *Alcanivorax*.

Μελετώντας το δεύτερο πείραμα προκύπτει το συμπέρασμα πως το στέλεχος *Alcanivorax venustensis* αναπτύσσεται γρηγορότερα χωρίς ωστόσο, να είναι γνωστό αν αποικοδομεί τους εξεταζόμενους υδρογονάνθρακες με τη χρήση έξτρα πηγής άνθρακα, της πεπτόνης ή απλά καταναλώνει την πηγή αυτή.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί μια νέα ομάδα θαλάσσιων βακτηρίων που διασπούν τους υδρογονάνθρακες, τα υποχρεωτικά υδρογονανθρακοκλαστικά βακτήρια (obligate hydrocarbonoclastic bacteria-OHCB) που με τον όρο αυτό εννοούνται τα βακτήρια που «τρέφονται» αποκλειστικά και μόνο με υδρογονάνθρακες. Όπως έχει αποδειχθεί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική απομάκρυνση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων από τα μολυσμένα θαλάσσια ύδατα^[18]. Οι τύποι OHCB που αναπτύσσονται εξαρτώνται από το γεωγραφικό πλάτος, τη θερμοκρασία, την αλατότητα, την οξειδοαναγωγή και άλλους φυσικοχημικούς παράγοντες που επικρατούν. Οι μικροοργανισμοί αυτοί όταν αναπτύσσονται στις βέλτιστες συνθήκες που αντιστοιχούν στο καθένα, έχουν ως αποτέλεσμα την ταχεία αποικοδόμηση πολλών συστατικών του πετρελαίου, μια διαδικασία που μπορεί να επιταχυνθεί με τη συμπλήρωση θρεπτικών συστατικών^[18]. Η αλληλουχία του γονιδιώματος και η λειτουργική γονιδιωματική ανάλυση του *Alcanivorax*, έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη γονιδιωματική βάση της αποτελεσματικότητας και της ευελιξίας του

στην αποικοδόμηση υδρογονανθράκων, τις μεταβολικές οδούς που διέπουν την ειδική «διατροφή» του στους υδρογονάνθρακες και την οικολογική επιτυχία στην εξυγίανση των θαλασσών^[18].

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2019^[23] έδειξε ότι 4 είδη *Alcanivorax*, 3 *Marinobacter* και *Planomicrobium* δεν αποτέλεσαν υποχρεωτικά ΟΗCB. Παρ' όλο που και τα 8 στελέχη αναπτύχθηκαν σε πετρέλαιο, ν-οκταδεκάνιο και φαιναθρένιο, η ανάπτυξή τους ήταν πιο αργή σε σχέση με την ανάπτυξη τους σε υποστρώματα που δεν υπήρχαν υδρογονάνθρακες ή υπήρχε ως θρεπτικό υλικό οργανική ένωση, όπως η πεπτόνη, πυροσταφυλικό οξύ, σακχαρόζη κ.α^[23]. Η πεπτόνη και το πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν και από τα 8 στελέχη ενώ η σακχαρόζη από 6 και το γαλακτικό οξύ από 5. Σε καλλιέργειες με αρκετά αντίγραφα (replicate) για κάθε στέλεχος, όλα τα βακτήρια κατανάλωσαν υψηλότερες ποσότητες πεπτόνης απ' ό,τι ν-αλκανίων ή φαιναθρενίου^[23]. Όταν προστέθηκε πεπτόνη και πετρέλαιο στην εκάστοτε καλλιέργεια, οι μικροοργανισμοί πρώτα «έφαγαν» την πεπτόνη και εμπλουτισμένοι πλέον αποικοδόμησαν και το πετρέλαιο. Η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα πως με την προσθήκη μη-υδρογονάνθρακα (πχ πεπτόνης) ως θρεπτικό μέσο στις καλλιέργειες βιο-διεγείρεται η αποικοδόμηση του πετρελαίου απ' όλα τα είδη ΟΗCB^[23].

Συγκρίνοντας την έρευνα με τη διπλωματική εργασία προκύπτουν παρόμοια συμπεράσματα αφού και στις δύο περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν ταχύτερα με την προσθήκη οργανικής ένωσης ως πηγή άνθρακα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του τρίτου πειράματος προκύπτουν συμπεράσματα σχετικά με τη συμπεριφορά των στελεχών του *Alcanivorax*. Αρχικά, το *Alcanivorax venustensis* αποικοδομεί ταχύτερα τους υδρογονάνθρακες σχετικά με το *Alcanivorax borkumensis* και στις δύο θερμοκρασίες. Το στέλεχος από τα βαθιά νερά (*A. venustensis*) αποικοδομεί υδρογονάνθρακες εξίσου καλά και στις δύο θερμοκρασίες, αλλά ανταποκρίνεται καλύτερα στους 25°C και αυτό γιατί δεν αποτελεί ψυχρόφιλο βακτήριο, αφού όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνονται και οι μεταβολικές του δραστηριότητες. Αντίθετα, το *Alcanivorax borkumensis* και στις δύο θερμοκρασίες, T=14°C & T=25°C ανταποκρίνεται με τον ίδιο τρόπο.

Το *A. venustensis* είναι ένα βακτήριο που ζει σε μεγάλα βάθη στα οποία επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες όπου και ανταποκρίνεται και αναπτύσσεται, έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη βιοεξυγίανση περιβάλλοντος σ' αυτά τα βάθη (πχ. φυσικές διαρροές).

Ακόμη, έχει αναφερθεί και διαπιστωθεί πως κανένα βακτήριο δεν ήταν ικανό να αποικοδομήσει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες^[24]. Ωστόσο, παλαιότερη έρευνα έδειξε ότι συγκεκριμένο στέλεχος του *Paracoccus*, το στέλεχος *HPD-2*, ήταν ικανό να αποικοδομήσει PAH από γερασμένο και ρυπασμένο έδαφος. Αυτός ο μικροοργανισμός χρησιμοποίησε φθορανθένιο, πυρένιο και βενζο[a]πυρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξή του^[24]. Τα PAH αποικοδομήθηκαν εντός 28 ημερών από 9942 σε 7638 µg/kg ξηρό έδαφος ενώ με την αύξηση των δακτυλίων των PAH το ποσοστό αποικοδόμησης μειωνόταν. Έτσι, προέκυψε πως αυτός ο μικροοργανισμός αποτελεί κατάλληλο μέσο για τη βιοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών^[24].

Ωστόσο, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τη βιοεξυγίανση θαλάσσιου περιβάλλοντος από πετρελαιοκηλίδα που περιείχε PAH τα αποτελέσματα διέφεραν. Έδειξε πως το στέλεχος *Paracoccus marcusii* το οποίο απομονώθηκε από τον κόλπο της Ελευσίνας παρήγαγε βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες σε χαμηλό βαθμό. Όμως,

αυτή η συνθήκη δεν αποτέλεσε εμπόδιο καθώς το *Paracoccus* βρισκόταν στο σύνολο της μάζας του μέσα στην ελαιώδη φάση του πετρελαίου. Έτσι, προέκυψε πως το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σκοπούς βιοαύξησης και βιοαποκατάστασης των ρυπασμένων από πετρέλαιο περιοχών^[14]. Έχει αναφερθεί πως το στέλεχος *Paracoccus marcusii* βρίσκεται σε περιοχές οι οποίες είναι ρυπασμένες από υδρογονάνθρακες, ως αποικοδομητές αλκανίων αλλά και ως πολλά υποσχόμενος αποικοδομητής των PAH μέσω των παραγόμενων επιφανειοδραστικών ουσιών^[14].

Σε πετρελαιοκηλίδες όπου κυριαρχούν τα PAH, με σκοπό τη βιο-αποκατάσταση του περιβάλλοντος, η βέλτιστη λύση είναι το *Paracoccus marcusii* καθώς παράγει επιφανειοδραστικές ουσίες, βρίσκεται στο σύνολο της βιομάζας του στο πετρέλαιο χωρίς να κινδυνεύει από τα θαλάσσια ρεύματα^[14].

Συγκρίνοντας την παρούσα εργασία με την έρευνα^[14] προκύπτει πως το *Paracoccus marcusii* έχει τη δυνατότητα να παράγει επιφανειοδραστικές ουσίες ανεξαρτήτως υποστρώματος (αλκάνια και PAH), χωρίς να είναι γνωστό αν έχει τη δυνατότητα να καταναλώσει και ν' αναπτυχθεί σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Όσον αφορά τη δημιουργία της στοιβάδας γαλακτώματος η καλλιέργεια που περιέχει το *Paracoccus*, το ύψος της στοιβάδας (emulsion) που εμφανίστηκε μετά την ανάδευση ήταν μεγαλύτερο συγκριτικά με την καλλιέργεια του *Alcanivorax venustensis*. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε διάρκεια ενός λεπτού ενώ στο διάστημα των 24 ωρών δεν παρέμεινε το emulsion αλλά είχαν χωριστεί ξανά οι δύο φάσεις.

Καταλήγοντας, κανένα εξεταζόμενο βακτήριο δεν αποικοδόμησε τα PAH. Το *Alcanivorax venustensis* ενώ ζει σε χαμηλές θερμοκρασίες, με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνονται και οι μεταβολικές δραστηριότητές του γεγονός που το καθιστά ευέλικτο για τη χρήση του για τη βιοεξυγίανση ρυπασμένων θαλάσσιων περιβαλλόντων από πετρέλαιο.

6. Βιβλιογραφία

6.1 Ξένη βιβλιογραφία

[1] GESAMP (Group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection), 'Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities', 2007.

[2] Martina Schedler, Robert Hiessl, Ana Gabriela Valladares Juárez, Giselher Gust and Rudolf Müller, 'Effect of high pressure on hydrocarbon-degrading bacteria', Schedler et al. AMB Express 2014.

[3] Atlas, R.M. & Hazen, T.C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. Environmental Science & Technology, (2011), 45 (16), 6709-6715.

[4] Pallardy, R. April 13, 2018. Deepwater Horizon oil spill of 2010. In Britanica Encyclopedia Britanica, inc.

[5] Shigenaka, Gary. Oil and Sea Turtles BIOLOGY, PLANNING, AND RESPONSE. s.l.: National Oceanic and Atmospheric Administration, US DEPARTMENT OF COMMERCE, 2010.

[6] Fate of oil and weathering, 26/9/2016, SpillPrevention.org.

[7] Haritash, A. K., and C. P. Kaushik. "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review." Journal of hazardous Materials 169.1 (2009): 1-15.

[8] Sayara, Tahseen, et al. "Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation." International Biodeterioration & Biodegradation 65.6 (2011): 859-865.

[9] Helmenstine, Anne Marie, 'Τι είναι ένας αλειφατικός υδρογονάνθρακας, Αναθεωρείστε τις έννοιες της χημείας σας'. Thought Co. (el.strephonsays.com/difference-between-aliphatic-and-aromatic-hydrocarbons).

[10] SCHAUM'S OUTLINE SERIES, 'ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ', Μτφ: Α. Βάρβογλη, 1999.

[11] Scow, K.M.; Hicks, K.A (2005). Curr. Opin. Biotech. 16, 246-253.

[12] Zobell, C.E. (1973). Microbial degradation of oil: Present statue, problems, and perspectives. In Ahearn and Meyers (Eds.), The Microbial Degradation of Oil Pollutants, Publication No. LSU-SG-73-01, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, 3-16.

[13] Office of Technology Assessment, Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies, (1991), OTA-BP-O-70, Washington, DC.

[14] Eleftheria Antoniou, Stillianos Fodelianakis, Emmanouela Korkakaki and Nicolas Kalogerakis. Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. frontiers in Microbiology. 2015, 10.3389/fmicb.2015.00274.

[15] Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M., & van Spanning, R. J. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 62(4), 1046–1078.

[16] Martins VAP; et al. (2008). ["Genomic Insights into Oil Biodegradation in Marine Systems"](#). Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press.

[17] Schneiker, Susanne, et al. "Genome Sequence of the Ubiquitous Hydrocarbon-degrading Marine Bacterium *Alcanivorax Borkumensis*." *Nature Biotechnology* 24.8 (2006): 997-1004.

[18] Yakimov, Michail M; Timmis, Kenneth N; Golyshin, Peter N (June 2007). "Obligate oil-degrading marine bacteria". *Current Opinion in Biotechnology*.

[19] Sabirova, Julia S.; Ferrer, Manuel; Lünsdorf, Heinrich; Wray, Victor; Kalscheuer, Rainer; Steinbüchel, Alexander; Timmis, Kenneth N.; Golyshin, Peter N. (2006-12-15). "Mutation in a "tesB-Like" Hydroxyacyl-Coenzyme A-Specific Thioesterase Gene Causes Hyperproduction of Extracellular Polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2". *Journal of Bacteriology*. 188 (24): 8452–8459.

[20] Javier Fernández-Martínez, María J Pujalte, Jesús García-Martínez, Manuel Mata, Esperanza Garay, Francisco Rodríguez-Valera (2003). Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178T (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*.

[21] Rodrigo A. Cammie H., Edward J.B., Toxicity of dispersant Corexit9500A and crude oil to marine microzooplankton, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2014), 106, 76-85.

[23] Samir S. Radwan, Majida M. Khanafer & Husain A. Al-Awadhi (2019). "Ability of the So-Called Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria to Utilize Nonhydrocarbon Substrates Thus Enhancing Their Activities Despite their Misleading Name". *BMC Microbiology*.

[24] Ying Teng, Yongming Luo, Mingming Sun, Zengjun Liu, Zhengao Li & Peter Christie (May 2010). "Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged, contaminated soil". *Bioresource Technology*.

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

[25] Κατερίνα Ζανέλη, 'Βιοεξυγίανση στερεών αποβλήτων διυλιστηρίου μέσω βιοδιέγερσης και βιοενίσχυσης', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2015.

[26] Χανιώτης Πέτρος, 'Βιοεξυγίανση ρυπασμένης άμμου από πετρελαιοειδή με χρήση αυτόχθονων μικροοργανισμών', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2011.

[27] Οικονομοπούλου Ευγενία, 'Αποδόμηση πετρελαιοειδών σε αντιδραστήρα υψηλής πίεσης με θαλάσσιους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2016.

[28] Αυγερόπουλος, Α.Θ., 'Χημεία του Πετρελαίου: Πετρέλαια, Πετροχημικά & Λιπαντικά', Εργαστήριο Πολυμερικών Υλικών, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2014.

[29] Αχιλιάς, Δ.Ι. Ελευθεριάδης & Ν. Νικολαΐδης, 'Υγροί υδρογονάνθρακες. Βιομηχανική οργανική χημεία.' Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.

- [30] Τεχνολογία Πετρελαίου και Φυσικού Αερίου. Αργό Πετρέλαιο, Χαρακτηριστικά-Ιδιότητες. Εργαστήριο τεχνολογίας καυσίμων και λιπαντικών, ΕΜΠ.φ
- [31] Γιώργος Ρούσσος, 'Deerwater Horizon: Η απληστία του ανθρώπου απέναντι στη φύση' 4/10/2016 (<https://tvxs.gr/news/sinema/i-aplistia-toy-anthropoy-apenanti-sti-fysi-deerwater-horizon>).
- [32] Κεχαγιά Μαρία, 'Αποδοτικότητα (βιο)τασιενεργών ουσιών στη διασπορά πετρελαίου υπό συνθήκες υψηλής πίεσης', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Σεπτέμβριος 2018.
- [33] Θάνος Κουλουβάκης, 'Η ρύπανση της Μεσογείου που όλοι αγνοούμε' 2/10/2019 (<https://www.offlinepost.gr/2019/10/02/η-ρύπανση-της-μεσογείου-που-όλοι-αγνοο/>).
- [34] Μάχη Τράτσα & Γ. Τρύφωνας, 'Οι πετρελαϊκές βόμβες της Μεσογείου', 24/11/2008 (<https://www.tovima.gr/2008/11/24/archive/oi-petrelaikies-bombes-tis-mesogeioy/>).
- [35] Κορρός Κωνσταντίνος, 'Μοντέλο τύξης/γήρανσης κηλίδων πετρελαίου', τεύχος Α, Διπλωματική εργασία, Σχολή Ναυπηγών Μηχανολόγων Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα Ιούλιο 2008.
- [36] 'ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ', Greenpeace Greece, Αύγουστος 2006.
- [37] Ιωσήφ Μαρκής, Βιολόγος-Ωκεανογράφος, 'Ωκεανοί και πετρέλαιο-Θαλάσσια ρύπανση.' Η ΡΟΔΙΑΚΗ 29/1/2012 (<https://www.rodiaki.gr/article/158521/wkeanoi-kai-petrelaio-thalassia-rypansh>).
- [38] Νίκος Καλογεράκης, 'Σημειώσεις: Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, Μέρος II', Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2013.
- [39] Τσαχουρίδης Άγγελος, 'Βιοαποδόμηση πετρελαϊκών υδρογονανθράκων στο περιβάλλον – η επίδραση των θρεπτικών', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2015.
- [40] Αντιγόνη Χελιώτη – Χατζηδημητρίου, χημικός. 'Προσδιορισμός ΠΑΥ σε σωματίδια PM₁₀ στην ατμόσφαιρα του λιμανιού του Βόλου.' Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, Χημεία Περιβάλλοντος, Διπλωματική εργασία, ΑΠΘ, 2015.
- [41] Παπαγεωργίου Β.Π., Εφαρμοσμένη Οργανική Χημεία. 'Άκυκλες ενώσεις', εκδόσεις Παρατηρητής, Θεσσαλονίκη, 1986.
- [42] Διάλεξη 5, 'Βιολογική απομάκρυνση οργανικών ρύπων', Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- [43] Δάβρης Μάνος, 'Βελτιστοποίηση παραγωγής επιφανειακά δραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης', διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2013.
- [44] Κορκακάκη Εμμανουέλα, 'ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ', Μεταπτυχιακή Διατριβή, Χανιά 2013.
- [45] Μαρία Π. Νικολοπούλου, 'Ενισχυμένη βιοδιέγερση εγγενών θαλάσσιων μικροοργανισμών με τη χρήση λιπόφιλων λιπασμάτων σε συνδυασμό με επιφανειοδραστικές βιολογικές ουσίες για αποικοδόμηση πετρελαιοκηλίδων',

Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Οκτώβριος 2005.

[46] Αμαλία Δ. Καραγκούνη, 'Τα βακτήρια χορεύουν στη μολυσμένη από αργό πετρέλαιο Αθηναϊκή Ριβιέρα', 24/9/2017 (<https://freesunday.gr/apopseis/item/13468-ta-bakthria-choreyoun-sth-molysmenh-apo-argo-petrelaio-athhnaikh-ribiera>).

[47] Μανδαλενάκη Αθηνά, 'Παραγωγή βιοτεσιενεργών ουσιών με χρήση βαρέων κλασμάτων αργού πετρελαίου ως πηγή άνθρακα', Διπλωματική εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2016.

[48] Δημήτριος Β. Βαγενάς, Επίκουρος καθηγητής, 'Αρχές βιολογικής αποκατάστασης εδάφους και υπόγειων νερών', Τμήμα διαχείρισης περιβάλλοντος και φυσικών πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αγρίνιο 2003.

6.3 Ιστοσελίδες

[49] http://oil-evolution.blogspot.com/2007/10/blog-post_2582.html

[50] <http://11lyk-patras.ach.sch.gr/autosch/joomla15/images/projects/P3.pdf>

[51] <http://www.mentality10.com/matrix-1984-category/kosmos-category/item/1820-pos-dimiourgithike-to-petrelaio-sta-vathi-tis-qis>

[52] http://oil-evolution.blogspot.com/2007/10/blog-post_5860.html

[53] http://oil-evolution.blogspot.com/2007/10/blog-post_6118.html

[54] tvxs.gr/news/περιβάλλον/η-πετρελαιοκηλίδα-της-βρ-σκότωσε-τουλάχιστον-5000-κήτη

[55] [Deepwater Horizon: Η περιβαλλοντική καταστροφή, ένα χρόνο μετά \(naftemporiki.gr\)](http://naftemporiki.gr/Deepwater_Horizon:_Η_περιβαλλοντική_καταστροφή,_ένα_χρόνο_μετά)

[56] www.cnn.gr/kosmos/story/170141/exxon-valdez-30-xronia-apo-tin-asyllipti-perivallontiki-katastrofi-ti-exoyme-didaxthei

[57] http://5dim-pyrgou.ilei.sch.gr/sea_web/index_1024.html (Ο κόσμος της θάλασσας)

[58] <https://www.news247.gr/koinonia/aei-gia-ton-saroniko-fysikos-katharismos-me-petrelaiofaga-vaktiria.6519379.html>

[59] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=265>