



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Διπλωματική Εργασία με θέμα: «Αξιολόγηση  
ρυπασμένης άμμου από πετρελαιοειδή με τη τεχνική του**

**Μπουλμπασάκος Μαρίνης**

**Επιβλέπων Καθηγητής:  
Δρ. Νικόλαος Καλογεράκης**

[Σεπτέμβριος 2011]

## Εξεταστική Επιτροπή

Δρ. Νικόλαος Καλογεράκης(επιβλέπων καθηγητής), Καθηγητής Π.Κ.  
Δρ. Νίκος Πασαδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Κ.  
Δρ. Δανάη Βενιέρη, Λέκτορας Π.Κ.



Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στα πλαίσια της φοίτησης μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης, στο τμήμα των Μηχανικών Περιβάλλοντος και για την απόκτηση του διπλώματος του Μηχανικού Περιβάλλοντος, το έτος 2011.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς, τον καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα(διπλωματικής) και κατ' επέκταση με τον αντίστοιχο τομέα που με ενδιαφέρει και τελικά θα ακολουθήσω στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο πανεπιστήμιο του Λάνκαστερ.

Στη συνέχεια,την Μαρία Νικολοπούλου, η οποία μας βοήθησε στο μέγιστο βαθμό παρέχοντας μας τις γνώσεις της πάνω στο αντικείμενο και φυσικά στην ασφαλή και κατά μεγάλο ποσοστό την επιτυχή ολοκλήρωση των εργαστηριακών διαδικασιών που απαιτούσε ο στόχος της διπλωματικής.

Οφείλω ακόμα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Νίκο Πασαδάκη για την παραχώρηση του χώρου του εργαστηρίου τού οποίου είναι υπεύθυνος, ώστε να εκτελέσουμε μεγάλο μέρος των εργασιών μας, και φυσικά για την βοήθεια του, σε όποιο στάδιο κι αν τη χρειαστήκαμε.

Τέλος, θα πρέπει να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Δανάη Βενιέρη, για τις παρατηρήσεις της όσον αφορά στη σωστή και ασφαλή διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της εργασίας.

Αφιερώνω αυτή την εργασία σε όλους όσους με βοήθησαν στην διαφανόμενη απόκτηση του διπλώματος του Μηχανικού Περιβάλλοντος και φυσικά σε αυτούς που συντέλεσαν στη λήψη και τη στήριξη της απόφασής μου να συνεχίσω τις σπουδές μου στο εξωτερικό.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη και τη διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στην απορρύπανση άμμου που έχει ρυπανθεί από πετρελαιοειδή με τη τεχνική του *Landfarming*, μία τεχνική που εφαρμόζεται γενικότερα σε ρυπασμένα εδάφη, και περιλαμβάνει την προσθήκη θρεπτικών, νερού ώστε να επιτυγχάνεται το επιθυμητό ποσοστό υγρασίας στο έδαφος, και τη συχνή ανάδευση του προς εξυγίανση χώματος.

Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα θρεπτικών μέσων και παραγόντων βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου στα εργαστηριακά δείγματα της άμμου. Τα διαφορετικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, αντιστοιχούν σε διαφορετικούς συνδυασμούς θρεπτικών(πηγές αζώτου και φωσφόρου), με το ένα δείγμα(Control), χωρίς την προσθήκη θρεπτικών, να αποτελεί «οδηγό» για την αποτελεσματικότητα των βιοαποδομητών μικροοργανισμών και τον απαιτούμενο χρόνο βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου. Η προσθήκη θρεπτικών έγινε με σκοπό να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία C:N:P, και να επιταχυνθεί η διαδικασία βιοαποδόμησης των συστατικών του πετρελαίου. Τα δύο δείγματα στα οποία γίνεται προσθήκη θρεπτικών μέσων (NPK, ULR) εξετάζονται και συγκρίνονται(μέσω των διαφόρων τύπων γραφημάτων) ως προς τον χρόνο και τον βαθμό βιοαποδόμησης, αλλά και σε συνδυασμό με το Control.

Η μέθοδος για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης που ανέπτυξε η EPA (“Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test”/40 CFR Part 300 Appendix C). Το πρωτόκολλο δοκιμής επιδιώκει να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο μέσω της ποσοτικοποίησης των αλλαγών στη σύνθεση του πετρελαίου. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα (μέσω των μικροβιακών αναλύσεων – CFUs και MPN) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs).

## Abstract

This thesis aims to study and conduct conclusions regarding the remediation of sand that has been contaminated with petroleum. The technique used is Landfarming, a technique generally applied to contaminated soils that includes the addition of nutrients and water in order to achieve the desired moisture percentage in soil, and its frequent stirring for its remediation.

More specifically, in this thesis it has been examined the effectiveness of nutrient media and factors of oil's biotic degradation in laboratory samples of the sand. The different samples used, correspond to different combinations of nutrients (sources of nitrogen and phosphorus), with a sample (Control), without adding nutrients, to be a "guide" for the effectiveness of biotic degraded microorganisms and the time required for the oil's biotic degradation. The addition of the nutrients happened in order to be achieved both the desired ratio of C:N:P, and the biotic degradation of petroleum components. In the two samples added nutrients (NPK, ULR) and then they are been examined and compared (via various types of graphs) in regard with the time and degree of biodegradation, but also in conjunction with Control sample.

The method used for examining the bioremediation factors, is based on the modified protocol that is testing the effectiveness of these factors developed by EPA ("Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test" / 40 CFR Part 300 Appendix C). This protocol seeks to determine the ability of a product to biodegrade oil by quantifying changes in the composition of oil. More specifically, it both examines the microbial activity (through the microbial analysis methods CFUs and MPN) and quantifies the removal of Saturated Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).

|                                                                       |                                                                                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>                                                              | <b>Εισαγωγή.....</b>                                                                                             | <b>11</b> |
| <b>2</b>                                                              | <b>Θεωρητικό Υπόβαθρο.....</b>                                                                                   | <b>12</b> |
| 2.1                                                                   | Εισαγωγή.....                                                                                                    | 12        |
| 2.2                                                                   | Τεχνική του <i>Landfarming</i> .....                                                                             | 13        |
| 2.3                                                                   | Κύρια Στοιχεία.....                                                                                              | 14        |
| 2.3.1                                                                 | Λειτουργικές Παράμετροι.....                                                                                     | 14        |
| 2.3.2                                                                 | Σχεδιαστικά Στοιχεία.....                                                                                        | 17        |
| 2.4                                                                   | Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Μεθόδου.....                                                                 | 18        |
| 2.5                                                                   | Εφαρμογή της τεχνικής του <i>Landfarming</i> στις ακτές.....                                                     | 19        |
| 2.5.1                                                                 | Προσεγγίσεις για τον στόχο.....                                                                                  | 19        |
| 2.5.2                                                                 | Επιρροή της μορφής της παραλίας στην διαδικασία.....                                                             | 20        |
| <b>3</b>                                                              | <b>Μεθοδολογία.....</b>                                                                                          | <b>22</b> |
| 3.1                                                                   | Εισαγωγή.....                                                                                                    | 22        |
| 3.2                                                                   | Βήματα /Προετοιμασία.....                                                                                        | 22        |
| 3.3                                                                   | Γενική Αναφορά στην Μέθοδο.....                                                                                  | 26        |
| 3.4                                                                   | Αναλύσεις.....                                                                                                   | 27        |
| 3.4.1                                                                 | Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....                                                                                   | 27        |
| 3.4.2                                                                 | Χημικές Αναλύσεις.....                                                                                           | 29        |
| 3.4.2.1                                                               | Εκχύλιση δειγμάτων με συσκευή Soxhlet.....                                                                       | 29        |
| 3.4.2.2                                                               | Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE) – Κλασματοποίηση Πετρελαίου.....                                                    | 31        |
| 3.4.2.3                                                               | GC/MS Ανάλυση.....                                                                                               | 32        |
| <b>4</b>                                                              | <b>Επεξεργασία Μετρήσεων – Παρουσίαση Αποτελεσμάτων.....</b>                                                     | <b>35</b> |
| 4.1                                                                   | Γραφήματα αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών αναλύσεων.....                                                       | 35        |
| 4.2                                                                   | Γραφήματα αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων.....                                                               | 41        |
| 4.2.1                                                                 | Control.....                                                                                                     | 41        |
| 4.2.2                                                                 | NPK.....                                                                                                         | 43        |
| 4.2.3                                                                 | ULR.....                                                                                                         | 45        |
| 4.3                                                                   | Συγκεντρωτικά γραφήματα (MPN, CFU, % Depletion of saturates, % Depletion of aromatics – Days) των δειγμάτων..... | 47        |
| <b>5</b>                                                              | <b>Συμπεράσματα.....</b>                                                                                         | <b>51</b> |
| <b>6</b>                                                              | <b>Βιβλιογραφία.....</b>                                                                                         | <b>53</b> |
| <b>Παράρτημα Α – Πίνακες Αναλυτών στο GC/MS.....</b>                  |                                                                                                                  | <b>56</b> |
| <b>Παράρτημα Β – Πίνακες Μετρήσεων Μικροβιολογικών Αναλύσεων.....</b> |                                                                                                                  | <b>59</b> |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Γράφημα 1: Καταγεγραμμένες Πετρελαιοκηλίδες (σε παγκόσμια κλίμακα → 1980 - 2010 _____                    | 12 |
| Γράφημα 2: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το Control_____                          | 36 |
| Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με τον χρόνο – για το Control _____            | 36 |
| Γράφημα 4: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το NPK_____                              | 37 |
| Γράφημα 5: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το NPK _____                 | 38 |
| Γράφημα 6: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το ULR_____                              | 39 |
| Γράφημα 7: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το ULR _____                 | 40 |
| Γράφημα 8: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το δείγμα ελέγχου(Control) με το χρόνο(μέρες) _____ | 41 |
| Γράφημα 9: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το δείγμα ελέγχου(Control) με τον χρόνο _____       | 42 |
| Γράφημα 10: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το NPK με τον χρόνο(μέρες) _____                   | 43 |
| Γράφημα 11: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το NPK με τον χρόνο(μέρες) _____                   | 44 |
| Γράφημα 12: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το ULR με τον χρόνο(μέρες) _____                   | 45 |
| Γράφημα 13: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το ULR με τον χρόνο(μέρες) _____                   | 46 |
| Γράφημα 14: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το Control_____                                                  | 48 |
| Γράφημα 15: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το NPK_____                                                      | 49 |
| Γράφημα 16: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το ULR_____                                                      | 50 |



## Κατάλογος Πινάκων

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 1: Συσχέτιση αποδοτικότητας της τεχνικής με τις συγκεντρώσεις ρυπαντών                                                             | 16 |
| Πίνακας 2: Πλεονεκτήματα & Μειονεκτήματα <i>Landfarming</i>                                                                                | 19 |
| Πίνακας 3: Διαβάθμιση ευαισθησίας ακτών στο πετρέλαιο και στις επεμβάσεις για την αποκατάσταση                                             | 21 |
| Πίνακας 4: Σημαντικότερα είδη θρεπτικών – Συνοπτική αξιολόγηση                                                                             | 25 |
| Πίνακας 5: Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις μικροβιολογικές αναλύσεις                                                                      | 27 |
| Πίνακας 6: Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις χημικές αναλύσεις                                                                              | 29 |
| Πίνακας 7: Ταξινόμηση αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης | 56 |
| Πίνακας 8: Πρωτεύοντα ιόντα για κάθε αναλυτή στόχο στο GC/MS                                                                               | 57 |
| Πίνακας 9: Αναλυτές και συστατικά αναφοράς                                                                                                 | 58 |
| Πίνακας 10: Μετρήσεις CFU για τα 3 δείγματα                                                                                                | 59 |
| Πίνακας 11: Μετρήσεις MPN για τα 3 δείγματα                                                                                                | 60 |

## Κατάλογος Συντομογραφιών

- **VOCs:** Volatile Organic Compounds
- **PAHs:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
- **DCM:** Dichloromethane
- **EPA:** Environmental Protection Agency
- **CFU:** Colony Forming Unit
- **MPN:** Most Probable Number
- **SIM:** Single Ion Mode
- **GC/MS:** Gas Chromatography / Mass Spectrometry

# 1 Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία(όπως αναφέρθηκε και παραπάνω) εκπονήθηκε με στόχο την επίτευξη και την αξιολόγηση της βιοαποδόμησης δειγμάτων ρυπασμένης άμμου από πετρελαιοειδή. Η συγκεκριμένη μορφή ρύπανσης(ρύπανση ακτών από πετρέλαιο) αποτελεί φαινόμενο που έχει απασχολήσει πολλές φορές και δυστυχώς θα απασχολήσει και στο μέλλον, τοπικές κοινωνίες, φορείς και μηχανικούς που στόχο έχουν την αποκατάσταση των ρυπασμένων αυτών ακτών.

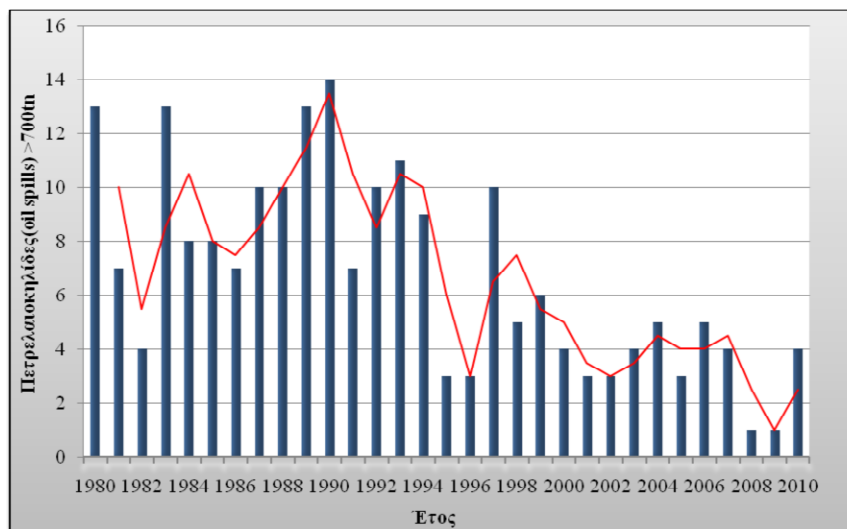
Στο ακόλουθο κεφάλαιο, γίνεται περιγραφή του θεωρητικού υποβάθρου του θέματος(με γενικότερη αναφορά στην τεχνική του Landfarming), ώστε να είναι περισσότερο κατανοητή η δυνατότητα, και κάτω από ποιες συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικός βαθμός απορρύπανσης.

Στα επόμενα κεφάλαια(3, 4), περιγράφεται το τεχνικό κομμάτι που αντιστοιχεί στη διεξαγωγή των εργαστηριακών εργασιών(όργανα, μέθοδοι κλπ) και παρουσιάζονται σε μορφή γραφημάτων τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις εργαστηριακές μετρήσεις – αναλύσεις.

Το κεφάλαιο 5 , περιέχει τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την μελέτη των γραφημάτων και των μετρήσεων, αξιολογώντας κατά αυτόν τον τρόπο την εξεταζόμενη βιοαποδόμηση των δειγμάτων.

### 2.1 Εισαγωγή

Η ρύπανση των θαλασσών και στη συνέχεια των ακτών από πετρελαιοειδή αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο που δημιουργεί παγκόσμια ανησυχία παρά την μείωση των πετρελαιοκηλίδων που έχουν καταγραφεί τα τελευταία χρόνια. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας και η καλύτερη τεχνογνωσία πάνω στον τομέα της γεώτρησης πετρελαίου, αποθήκευσης και μεταφοράς του, δεν εμπόδισαν την ρύπανση του περιβάλλοντος, καθώς τα ατυχήματα που οφείλονται σε ένα μεγάλο βαθμό στην αστοχία των γεωτρήσεων και τα διαρροές που συμβαίνουν στα «φορτηγά» πλοία(αλλά και σε επιβατηγά στην περίπτωση ναυαγίου) συμβαίνουν σε σχετικά συχνή βάση. Το γράφημα 1, παρουσιάζει τις πιο σημαντικές πετρελαιοκηλίδες(oil spills >700 tn) που έχουν καταγραφεί από το 1980 μέχρι και το 2010, σε παγκόσμια κλίμακα.



Γράφημα 1: Καταγεγραμμένες Πετρελαιοκηλίδες (σε παγκόσμια κλίμακα) → 1980 - 2010 [1]

Οι ακτές αποτελούν ένα περιβάλλον, ιδιαίτερα σημαντικό όχι μόνο για τον άνθρωπο, αλλά και για την οικολογία ενός τόπου, δεδομένου ότι φιλοξενούν μία μεγάλη ποικιλία ζώων και οργανισμών. Η ρύπανση των ακτών, επιφέρει αρνητικές συνέπειες, και όταν το ατύχημα είναι μεγάλης κλίμακας μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένες «ζημιές» στο θαλάσσιο παράκτιο περιβάλλον.

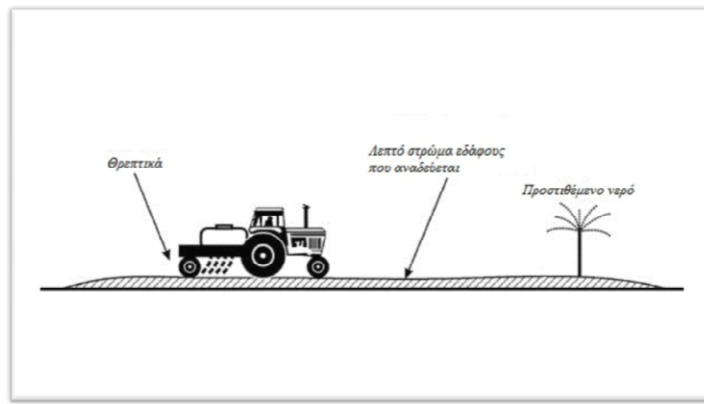
Παρά λοιπόν, τις αυστηρές προφυλάξεις που θα πρέπει να τηρούνται ώστε να προφυλάσσεται το θαλάσσιο και το παράκτιο περιβάλλον, ήταν αναγκαία η ανάπτυξη τεχνικών με σκοπό την αποκατάσταση των ρυπασμένων ακτών και επαναφορά τους(στον μέγιστο δυνατό βαθμό) στην αρχική, μη ρυπασμένη κατάσταση.

Μία από τις επιτυχημένες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον στόχο αυτό είναι η τεχνική του *Landfarming*. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις, και ειδικά για την εφαρμογή σε ρυπασμένο από πετρελαιοειδή παράκτιο περιβάλλον, καθώς παρουσιάζει ορισμένα καθοριστικά πλεονεκτήματα – π.χ. απλότητα χρήσης, αλλά το πιο σημαντικό είναι ότι συνδυάζει σχετικά χαμηλό κόστος με υψηλή απόδοση στην απορρύπανση.

### 2.2 Τεχνική του *Landfarming*

Καταρχάς, θα πρέπει να γίνει αναφορά στον καθορισμό του περιεχομένου της τεχνικής *Landfarming*.

Η τεχνική *Landfarming*, επίσης αναφέρεται και ως επεξεργασία εδάφους, πρόκειται για μία τεχνολογία που εφαρμόζεται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους(ex-situ) και επιτυγχάνει την μείωση των συγκεντρώσεων των ρυπαντών μέσω της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης[2]. Συνήθως, περιλαμβάνει την ανάμειξη και ανάδευση του ρυπασμένου χώματος με καθαρό ώστε να διατηρούνται αερόβιες συνθήκες, και την τόνωση/ενίσχυση της μικροβιακής δραστηριότητας μέσω του αερισμού, της προσθήκης θρεπτικών συστατικών και υγρασίας. Η ενισχυμένη μικροβιακή δραστηριότητα επιτυγχάνει την αποδόμηση απορροφημένων συστατικών του πετρελαίου με τη μικροβιακή αναπνοή. Επιπροσθέτως, δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στον έλεγχο ορισμένων παραμέτρων του εδάφους(υγρασία, συχνότητα αερισμού, pH) ώστε να εξασφαλίζεται ο βέλτιστος ρυθμός βιοαποικοδόμησης [2, 3].



Εικόνα 1: Τυπική μορφή της εφαρμογής της τεχνικής Landfarming [4]

## 2.3 Κύρια Στοιχεία

### 2.3.1 Λειτουργικές Παράμετροι

Η ορθή λειτουργία και πιθανότητα η επιτυχής αποκατάσταση του ρυπασμένου εδάφους με τη δεδομένη τεχνική εξαρτάται από ορισμένες καθοριστικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα της εξαρτάται από τις παραμέτρους οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες:

#### ■ Χαρακτηριστικά του εδάφους:

- Ο τύπος του εδάφους επηρεάζει την διαπερατότητα, την περιεκτικότητα σε υγρασία καθώς και την πυκνότητα του. Ο τύπος του εδάφους είναι καθοριστικός και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ώστε να μπορεί ο καθορισμός της προσθήκης οξυγόνου, των θρεπτικών και της υγρασίας να βρίσκεται σε αποτελεσματικά επίπεδα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελούν τα αργιλικά εδάφη, τα οποία είναι δύσκολο να αεριστούν σωστά με αποτέλεσμα την χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στο χώμα, αλλά παρουσιάζουν και δυσκολία στην ομοιόμορφη διανομή και ανάμειξη των θρεπτικών συστατικών.
- Όσον αφορά στο pH του εδάφους, αυτό θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8, με το ουδέτερο pH (7) να είναι το βέλτιστο[2]. Εάν το προς επεξεργασία έδαφος δεν παρουσιάζει pH εντός του εύρους αυτού, θα πρέπει να ρυθμιστεί πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απορρύπανσης. Η μεταβολή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αυξάνοντας το pH συνήθως με την προσθήκη ασβέστη, είτε μειώνοντας το με την προσθήκη στοιχείου θείου.
- Τα επίπεδα υγρασίας στο χώμα, τα οποία θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να επιδρούν θετικά στην συνολική διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, η υπερβολική υγρασία περιορίζει την κίνηση του αέρα μέσα από το υπέδαφος μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, καθοριστικού για την βιοαποικοδόμηση. Η ιδανική ποσότητα υγρασίας είναι 40-85 % της ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους, ή διαφορετικά 12 – 30 % w.w. . Το ποσοστό της υγρασίας θα πρέπει να ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, καθώς είναι έντονο το φαινόμενο της εξάτμισης, το οποίο είναι αυξημένο λόγω της μηχανικής ανάδευσης που γίνεται.
- Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών-βακτηρίων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του εδάφους. Η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά όταν η θερμοκρασία γίνεται μικρότερη των 10 °C και σχεδόν σταματάει χαμηλότερα από 5 °C, ενώ επίσης μειώνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 45 °C. Σε πολύ ψυχρό κλίμα, υπάρχει η λύση της κατασκευής μιας δομής παρόμοιας με του θερμοκηπίου ή η προσθήκη εξειδικευμένων ψυχρόφιлов βακτηρίων.
- Για την ενίσχυση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και της δραστηριότητας, απαιτείται η παρουσία ανόργανων θρεπτικών(π.χ. Άζωτο και Φόσφορος). Συνήθως, γίνεται προσθήκη των θρεπτικών στο χώμα, παρότι σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ποσότητες αυτών στο χώμα είναι ικανοποιητικές. Η επιθυμητή φόρτιση είναι C:N:P = 100:10:1 ή 300:100:1 και επιτυγχάνεται με την προσθήκη λιπασμάτων (π.χ.,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  κ.α.)[3]. Η υπερβολική συσσώρευση των θρεπτικών βέβαια, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα αποτελέσματα στον μικροβιακό μεταβολισμό.

#### ■ Χαρακτηριστικά των ρυπαντών(συστατικών του πετρελαίου)

- Πτητικότητα: Είναι ιδιαίτερος σημαντική καθώς οι πτητικές ουσίες(συστατικά) του πετρελαίου παρουσιάζουν την τάση να εξατμιστούν ιδιαίτερος λόγω της διαδικασίας της ανάδευσης του χώματος, και όχι να βιοαποδομηθούν από τους μικροοργανισμούς. Τα προϊόντα του πετρελαίου περιέχουν συστατικά τα οποία καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα, όσον αφορά στην πτητικότητα. Για παράδειγμα, η κηροζίνη, η βενζίνη και το ντίζελ περιέχουν συστατικά τα οποία εμφανίζουν μεγάλη πτητικότητα στη διάρκεια της διαδικασίας.
- Χημική σύσταση: Είναι σημαντική για τον προσδιορισμό του ρυθμού βιοαποικοδόμησης των ρυπαντών. Κατά κανόνα, όσο περισσότερο πολύπλοκη είναι η μοριακή δομή των συστατικών, τόσο πιο αργός είναι ο ρυθμός και τόσο πιο δύσκολα βιοαποδομούνται . Οι εκτιμήσεις για τον χρόνο αποκατάστασης, οι μελέτες που έχουν γίνει στη δυνατότητα βιο-εξυγίανσης, καθώς και ο σχεδιασμός της διαδικασίας και της παρακολούθησης της εστιάζουν στα συστατικά τα οποία είναι δυσκολότερο να αποδομηθούν.

Το αργό πετρέλαιο(crude oil – το οποίο χρησιμοποιήσαμε στην πειραματική διαδικασία που εκτελέσαμε) αποτελείται από ενώσεις υδρογονανθράκων (αποτελούν 50-98% της συνολικής σύνθεσης) αλλά και από ενώσεις διαφορετικές των υδρογονανθράκων(π.χ. ενώσεις που περιέχουν θείο, άζωτο, οξυγόνο, και διάφορα μεταλλικά ιχνοστοιχεία). Τα συστατικά του πετρελαίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες βάσει της διαλυτότητας τους σε οργανικούς διαλύτες:

- Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες: κανονικά αλλά και διακλαδισμένα αλκάνια με δομή αλφατικών και κυκλικά αλκάνια με δομή αλκυκλικών, τα οποία διαφέρουν στη δομή της αλυσίδας από 1 μέχρι και 40 άνθρακες.
- Αρωματικοί υδρογονάνθρακες: μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις (π.χ. βενζόλιο, τολουόλιο, και ξυλόλιο) και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες(PAHs)(π.χ., ναφθαλίνη, ανθρακένιοκαι φαινανθρένιο). Τα PAHs παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το περιβάλλον επειδή είναι πιθανό να προκαλέσουν καρκίνο (μπορεί να μετατραπούν σε καρκινογόνες ουσίες λόγω του μεταβολισμού των μικροοργανισμών).
- Ρητίνες: συμπεριλαμβάνονται πολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, θείο και οξυγόνο.
- Ασφαλτένια: αποτελούνται από όχι τόσο καλά χαρακτηρισμένες μεγάλου MB ενώσεις.

- Συγκεντρώσεις και τοξικότητα: Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις των οργανικών ή βαρέων μετάλλων μπορεί να είναι τοξικές ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη και τη δράση των μικροοργανισμών που ευθύνονται για την βιοαποικοδόμηση. Οι χαμηλές επίσης, συγκεντρώσεις των οργανικών συστατικών έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας αυτής. Ακολουθώντας, παρατίθενται ένας συγκεντρωτικός πίνακας που συσχετίζει τις συγκεντρώσεις των συστατικών των ρυπαντών με την πιθανή αποδοτικότητα της διαδικασίας.

Πίνακας 1: Συσχέτιση αποδοτικότητας της τεχνικής με τις συγκεντρώσεις ρυπαντών, [2]

| Συγκέντρωση συστατικών                                                       | Αποδοτικότητα <i>Landfarming</i>                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Συστατικά πετρελαίου $\leq 50.000$ ppm<br>Και βαρέα μέταλλα $\leq 2.500$ ppm | Αποδοτική – στην περίπτωση που η συγκέντρωση των ρυπαντών $>10.000$ ppm, υπάρχει πιθανότητα ανάμειξης του ρυπασμένου με καθαρό χώμα για μείωση της συγκέντρωσης |
| Συστατικά πετρελαίου $>50.000$ ppm<br>Και βαρέα μέταλλα $>2.500$ ppm         | Μη αποδοτική – επικρατούν τοξικές ή παρεμποδιστικές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών συνθήκες                                                               |

- Κλιματολογικές συνθήκες: Οι συνθήκες, δεδομένου ότι δε μπορούν να ελεγχθούν (π.χ. θερμοκρασία, βροχοπτώσεις) επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιολογική αποδόμηση των ρυπαντών, και κατά συνέπεια τον απαιτούμενο χρόνο για την ολοκλήρωση της απορρύπανσης. Πιο συγκεκριμένα,
  - Θερμοκρασία περιβάλλοντος: Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει τη θερμοκρασία του εδάφους(έγινε αναφορά προηγουμένως σχετικά με τις μεταβολές που επιφέρει).
  - Βροχοπτώσεις: Επηρεάζουν τα επίπεδα υγρασίας στο χώμα.
  - Άνεμος: Η διάβρωση των προς εξυγίανση εδαφών μπορεί να συμβεί σε περιόδους που παρουσιάζονται δυνατοί, συνεχείς άνεμοι, σε συνδυασμό ειδικότερα με το όργωμα(για την ανάδευση του χώματος).
- 

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθούμε και σε άλλους παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη καθώς μπορούν να επηρεάσουν όχι μόνο το κατά πόσο μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική αυτή αλλά και την αποτελεσματικότητα της.

- Η διαθέσιμη προς επεξεργασία έκταση(συνήθως απαιτείται μεγάλη έκταση ώστε να είναι δυνατή η επιθυμητή ανάδευση του χώματος, ειδικά στις περιπτώσεις όπου ο όγκος του ρυπασμένου χώματος είναι μεγάλος).
- Ανόργανοι ρύποι δε θα βιοαποδομηθούν.
- Πτητικές προσμίξεις, όπως οι διαλύτες, θα πρέπει να έχουν προεπεξεργαστεί έτσι ώστε να μη διαφύγουν στην ατμόσφαιρα, όντας ιδιαίτερα πτητικές.

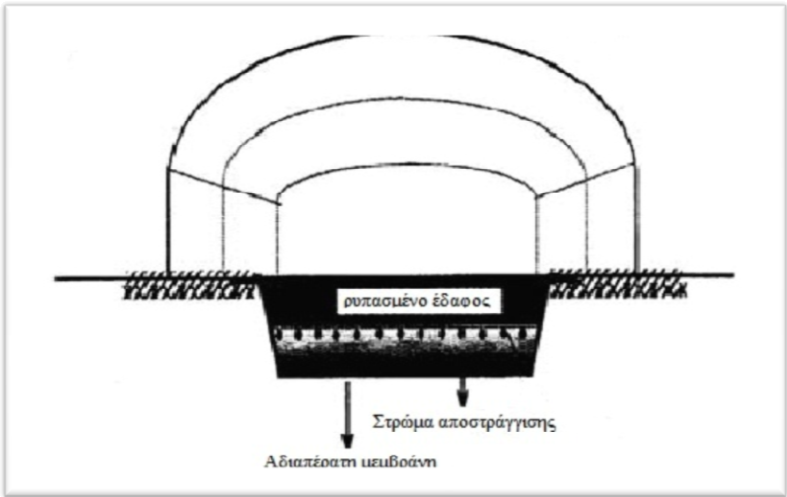
[2, 3, 5, 6]

### 2.3.2 Σχεδιαστικά Στοιχεία

Η ομαλή εφαρμογή της τεχνικής του *Landfarming* περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Την «διαμόρφωση» του χώρου: εκρίζωση και εκκαθάριση από αντικείμενα ή οτιδήποτε άλλο πρόκειται να παρεμποδίσει την διαδικασία αποκατάστασης.
- Τον σχεδιασμό για τον έλεγχο της σκόνης, η οποία δημιουργείται κατά τη διαδικασία της μηχανικής ανάδευσης του χώματος, αλλά και των πιο ελαφριών συστατικών του πετρελαίου τα οποία εξατμίζονται και έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ο σχεδιασμός αυτός προϋποθέτει τη δέσμευση των σωματιδίων και των VOCs πριν ανέλθουν στην ατμόσφαιρα και τη μεταφορά τους σε κατάλληλη μονάδα επεξεργασίας πριν τη τελική απελευθέρωσή τους.
- Την τοποθέτηση μη διαπερατής μεμβράνης (μεμβράνη υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου με πάχος  $\geq 250 \mu m$ ) για την προστασία του υδροφορέα, καθώς υπάρχει η πιθανότητα να εισχωρήσουν σε αυτόν τοξικά υγρά [7].
- Το παραπάνω θα πρέπει να συνδυάζεται με σύστημα συλλογής ομβρίων και διασταλλαγμάτων (τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια σε μονάδα επεξεργασίας λυμάτων).
- Στην περίπτωση που η προς επεξεργασία έκταση βρίσκεται σε περιοχή με μεγάλο ετήσιο ύψος βροχής (π.χ.  $\geq 75 cm$ ), τότε συνήθως είναι απαραίτητη η τοποθέτηση μιας στέγης πάνω από την έκταση, π.χ. ένα πλαστικό τούνελ ή κατασκευή δομής θερμοκηπίου (παραδείγμα της μορφής του οποίου δίνεται στο εικόνα 2 (παρακάτω), ώστε να μην μεταβάλλεται σημαντικά η περιεχόμενη στο χώμα υγρασία.
- Είναι άκρως απαραίτητο, η δημιουργία ενός συστήματος παρακολούθησης της κατάστασης του υδροφορέα, καθώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος ρύπανσης του, λόγω διάτρησης της αδιαπέρατης μεμβράνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός ή δύο πηγαδίων παρακολούθησης(μέσω των οποίων γίνεται μέτρηση για τον εντοπισμό πιθανής παρουσίας ρυπαντών σε διαφορετικά βάθη.

[2, 3, 5, 7]



Εικόνα 2:Δομή της εφαρμογής (με «greenhouse structure») του *Landfarming* [7]

### 2.4 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Μεθόδου

Η μέθοδος αυτή της απορρύπανσης του εδάφους, παρόλα τα πολλά θετικά στοιχεία τα οποία συντελούν ώστε από τις επικρατέστερες για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών από πετρελαιοειδή, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη πριν την τελική επιλογή της τεχνικής.

Παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα, συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του *Landfarming*.

Πίνακας 2: Πλεονεκτήματα & Μειονεκτήματα *Landfarming* [3, 7]

| Πλεονεκτήματα                                                                        | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Σχετική)ευκολία στον σχεδιασμό                                                      | Είναι πολύ δύσκολη η επίτευξη της μείωσης των συγκεντρώσεων > 95% και συγκεντρώσεων των συστατικών του πετρελαίου < 0,1 ppm                                             |
| Απαίτηση σχετικά λίγου χρόνου για την αποκατάσταση (6-24 μήνες σε ιδανικές συνθήκες) | Αμφίβολη η αποδοτικότητα της μεθόδου για υψηλές συγκεντρώσεις των συστατικών (> 50.000 ppm ολικών πετρελαϊκών υδρογονανθράκων(total petroleum hydrocarbons-TPH)         |
| Χαμηλό επενδυτικό και λειτουργικό κόστος                                             | Υψηλές απαιτήσεις γης                                                                                                                                                   |
| Αποδοτική σε οργανικά συστατικά με χαμηλούς ρυθμούς βιοαποδόμησης                    | Οι πτητικές ουσίες τείνουν να εξατμιστούν και όχι να βιοαποδομηθούν στη διάρκεια της διαδικασίας                                                                        |
| Μικρού βαθμού επιπτώσεις στο περιβάλλον                                              | Υπάρχει ο κίνδυνος εξάπλωσης της ρύπανσης και έκθεσης σε αυτήν<br>Προσρόφηση υδρόφοβων ουσιών στο χώμα με μείωση της δυνατότητας επεξεργασίας από τους μικροοργανισμούς |

## 2.5 Εφαρμογή της τεχνικής του *Landfarming* στις ακτές

Αρχικά, θα πρέπει να τονισθεί πως η τεχνική αυτή δεν είναι κατάλληλη για κάθε τύπο ακτής, καθώς ορισμένοι τύποι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά (μπορεί να μην είναι προσβάσιμες, να μην υπάρχει η απαιτούμενη έκταση, ή να υπάρχει ο κίνδυνος η εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής να προκαλέσει σημαντικές αρνητικές συνέπειες, κ.α.) που δεν κάνουν εφικτή την εφαρμογή αυτού του τρόπου αποκατάστασης.

### 2.5.1 Προσεγγίσεις για τον στόχο

Παρότι υπάρχουν ορισμένες μέθοδοι(π.χ. μηχανική απομάκρυνση του χρώματος που έχει ρυπανθεί, πλύσιμο της ακτής κλπ) για τον καθαρισμό των ακτών από το πετρέλαιο, υποστηρίζεται ότι μπορεί να ανακτήσουν μόνο ένα μικρό ποσοστό του πετρελαίου, της τάξης του 10- 15% [8].

Η τεχνική *Landfarming*, αντιθέτως, μπορεί να επιτύχει έναν πολύ μεγάλο βαθμό καθαρισμού της ακτής. Υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για τον σκοπό αυτό: η βιοδιέγερση (biostimulation) και η βιοενίσχυση (bioaugmentation).

#### ■ Βιοδιέγερση (biostimulation):

Εκμεταλλεύεται τον γηγενή πληθυσμό μικροοργανισμών που αποικοδομούν τα συστατικά του πετρελαίου, και επιδιώκει την αύξηση της ανάπτυξης τους, μέσω της προσθήκης λιπασμάτων έτσι ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμενη σχέση C:N:P (=120:10:1 σε mol [3]). Μέσα από πολλές δοκιμές που έχουν γίνει στο πεδίο, έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι η προσθήκη ανόργανων θρεπτικών(σε περιοδική βάση) επιτυγχάνει τη διατήρηση αυξημένων συγκεντρώσεων θρεπτικών ουσιών και κατά συνέπεια την αποτελεσματική βιοαποικοδόμηση[9]. Ο συχνός αερισμός είναι βεβαίως απαραίτητος για τη διατήρηση επιθυμητών επιπέδων οξυγόνου, διάλυση των συστατικών του πετρελαίου, και την ανάμειξη των θρεπτικών συστατικών με το ρυπασμένο έδαφος .

Μπορεί να εφαρμοστεί σε παράκτιο περιβάλλον, το οποίο είναι προσβάσιμο και οι ποσότητες των θρεπτικών είναι ανεπαρκείς ώστε να επιτευχθεί η βιοαποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου.

Παρόλα αυτά, η εφαρμογή της προσέγγισης αυτής συνίσταται μόνο όταν οι ποσότητες των θρεπτικών περιορίζουν τον βαθμό της φυσικής βιοαποικοδόμησης (natural biodegradation) [10]. Επίσης, η χρήση αυτής ενδείκνυται όταν σε ρυπασμένες ακτές, όταν άλλες τεχνικές έχουν αποδειχτεί αναποτελεσματικές.

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την εφαρμογή της είναι σημαντικές, και προκαλούνται σε μία ακτή από τα απαραίτητα μηχανήματα ή τους εργάτες που προσθέτουν τις ποσότητες των θρεπτικών(εκτός της περίπτωσης που η προσθήκη των θρεπτικών γίνει με άλλο τρόπο, π.χ. δια αέρος)[10].

#### ■ Βιοενίσχυση (bioaugmentation):

Σε αυτήν την περίπτωση, γίνεται προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών(εγκλιματισμένων στο περιβάλλον του πετρελαίου) που διασπούν τα πετρελαιοειδή, για να συμπληρώσουν τον ήδη υπάρχοντα μικροβιακό πληθυσμό, με στόχο την αύξηση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης των ρυπαντών [11]. Αυτό γίνεται σε συνδυασμό με την ανάπτυξη και διατήρηση ενός ιδανικού περιβάλλοντος, στο οποίο οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να ζήσουν και να λειτουργήσουν.Η βιοενίσχυση ισοδυναμεί με αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των παρόντων μικροοργανισμών[12].

Όμως, υπάρχει αρκετός σκεπτικισμός για την αποδοτικότητα της μεθόδου δεδομένου ότι ο αριθμός των προστιθέμενων μικροοργανισμών συχνά ξεπερνιέται από τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς[3].

Τα απαιτούμενα στοιχεία για τον ακριβή προσδιορισμό των συνθηκών κάτω από τις οποίες θα πρέπει να εφαρμόζεται η παραπάνω προσέγγισηδεν έχουν προσδιοριστεί επαρκώς ακόμα.

Οι περιβαλλοντικές συνέπειες που μπορεί να επιφέρει στην ακτή που γίνεται η διαδικασία είναι παρόμοιες με αυτές από τηνβιοδιέγερση(αρνητικές – από το τα μηχανήματα και το περπάτημα των εργατών πάνω στην ακτή).

### 2.5.2 Επιρροή της μορφής της παραλίας στην διαδικασία

Η συμπεριφορά του πετρελαίου που έχει ρυπάνει μία ακτή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διάφορες παραμέτρους της ακτής, για παράδειγμα, το πορώδες του υποστρώματος, τη δράση των κυμάτων, καθώς φυσικά την μορφή της παραλίας(βραχώδης, αμμόδης, με χαλίκια μικρής διαμέτρου κλπ). Σε ακτές, στις οποίες

συναντώνται μεγάλα κύματα, η διαδικασία της αποσάθρωσης του πετρελαίου επιταχύνεται. Ο ρυθμός και το βάθος της διείσδυσης του πετρελαίου εξαρτώνται κυρίως από το πορώδες του υποστρώματος. Σε ακτές με χονδρόκοκκη άμμο, το πετρέλαιο μπορεί να διεισδύσει βαθύτερα και να παραμείνει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα(όταν είναι παγιδευμένο κάτω από το όριο της δράσης των κυμάτων), συγκριτικά με αντίστοιχη που χαρακτηρίζεται από λεπτόκοκκη.

Οι διάφορες ακτές παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού ευαισθησίας στη ρύπανση από πετρέλαιο και στις επεμβάσεις για τον καθαρισμό τους. Το Αμερικάνικο Ινστιτούτο Πετρελαίου(American Petroleum Institute) και το National Oceanic & Atmospheric Administration έχουν αναπτύξει και καθορίσει μία διαβάθμιση (Environmental Sensitivity Index - ESI ) για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των ακτών στην αντιμετώπιση της ρύπανσης.Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που έλαβαν υπόψη, περιλαμβάνουν τον τύπο της ακτής(βραχώδης, αμμώδης, κλπ), την επιρροή των κυμάτων στην ακτή, τη βιολογική παραγωγικότητα και ευαισθησία, και τον βαθμό ευκολίας αποκατάστασης.

**Πίνακας 3: Διαβάθμιση ευαισθησίας ακτών στο πετρέλαιο και στις επεμβάσεις για την αποκατάσταση – με 1 να είναι ο μικρότερος βαθμός ευαισθησίας και 10 ο μεγαλύτερος [9]**

| Environmental Sensitivity Index<br>(Δείκτης Περιβαλλοντικής<br>Ευαισθησίας) | Τύπος ακτής                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                           | Εκτεθειμένες βραχώδεις ακτές                                       |
| 2                                                                           | Εκτεθειμένες σε κύματα νησίδες άμμου                               |
| 3                                                                           | Αμμώδεις ακτές – λεπτόκοκκη άμμος                                  |
| 4                                                                           | Αμμώδεις ακτές – χονδρόκοκκη άμμος                                 |
| 5                                                                           | Ακτές με άμμο και χαλίκι                                           |
| 6                                                                           | Ακτές με χαλίκι και πέτρινες πλάκες<br>(μεγάλες πέτρες)            |
| 7                                                                           | Επίπεδες ακτές εκτεθειμένες στην<br>παλίρροια(Exposed tidal flats) |
| 8                                                                           | Προστατευμένες βραχώδεις ακτές                                     |
| 9                                                                           | Ακτές προστατευμένες από παλίρροια                                 |
| 10                                                                          | Αλυκές                                                             |



### 3.1 Εισαγωγή

Η τεχνική της απορρύπανσης ρυπασμένης άμμου, προκειμένου να εξετασθεί, μεταφέρθηκε σε μικρότερη κλίμακα, στο εργαστήριο. Στο κεφάλαιο αυτό, θα γίνει αναφορά στην συνολική διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο, ώστε να λάβουμε τις απαραίτητες μετρήσεις και να εξαχθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Τα βήματα της διαδικασίας καθώς και η κάθε μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε θα αναπτυχθούν εκτενέστερα στη συνέχεια, για να γίνει δυνατή η κατανόηση των συνθηκών και των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της διαδικασίας της τεχνικής *Landfarming*.

Ηπροσέγγιση που ακολουθήσαμε για την αποκατάσταση ήταν ηβιοενίσχυση(bioaugmentation - προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διασπούν τα πετρελαιοειδή).

### 3.2 Βήματα /Προετοιμασία

Παρατίθενται ακολούθως, συγκεντρωτικά, τα βήματα τα οποία έγιναν για να επιτύχουμε και να προσδιορίσουμε τον βαθμό της απορρύπανσης.

#### ■ Προετοιμασία πετρελαίου:

Χρησιμοποιήθηκε ένα μετρίου βάρους πετρέλαιο (ελαφρύ αργό πετρέλαιο από το Καζακστάν), το οποίο θερμάνθηκε στους 210 °C, σύμφωνα με τη μέθοδο ASTM D86 ώστε να απαλλαγεί από το ελαφρύ κλάσμα των υδρογονανθράκων πριν την έναρξη του πειράματος. Αυτό έγινε ώστε να προσομοιάσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν σε μία ρυπασμένη ακτή, καθώς από το πετρέλαιο που τη ρυπαίνει, έχουν εξατμιστεί τα ελαφριά συστατικά μέσα σε λίγο μόνο χρόνο (από τη στιγμή της εμφάνισης της πετρελαιοκηλίδας). Αν και η εξάτμιση αυτή εξαρτάται από τη σύνθεση του πετρελαίου, έχει υπολογιστεί ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, να εξατμιστεί μέχρι και 50% των πιο τοξικών, ελαφριών συστατικών του, μέσα στις πρώτες 12 ώρες από τη διαρροή[8].

- Πυκνότητα πετρελαίου:

- Αρχικού/ακατέργαστου: 0,8232 g/cm<sup>3</sup>  
SG(specific gravity): 0,8247 g/cm<sup>3</sup>
- Αποσταγμένου: 0,8886 g/cm<sup>3</sup>  
SG(specific gravity): 0,8902 g/cm<sup>3</sup>

#### ■ Προετοιμασία άμμου:

Συλλέχθηκε άμμος, την οποία στη συνέχεια περάσαμε από κόσκινο με διάμετρο πόρων 2 mm, και τελικά τοποθετήσαμε σε ταψιά με μέγεθος 20cm × 20cm × 6cm. Σε κάθε ταψί τοποθετήθηκε ποσότητα περίπου ίση με 1 kg άμμου.

Η επιλογή να χρησιμοποιήσουμε εγκλιματισμένους (εξειδικευμένους) μικροοργανισμούς για την βιοαποικοδόμηση των ρυπαντών, έκανε αναγκαία την αποστείρωση της άμμου (στους 200 °C – για 2 μέρες), ώστε να απαλλαγούμε από τους υπάρχοντες αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Επόμενο βήμα ήταν να «υγράνουμε» την άμμο έτσι ώστε να επιτύχουμε το επιθυμητό επίπεδο υγρασίας (15%).

#### ■ Διάλυμα για την ρύπανση της άμμου:

Παρασκευάσαμε διάλυμα(5 gr crude oil/kg άμμου, διαλυμένο μέσα σε πεντάνιο και διχλωρομεθάνιο(DCM) με αναλογία  $\frac{1}{20} = \frac{C_s}{DCM}$  ώστε να κάνουμε δυνατή την ανάμιξη του πετρελαίου με το χώμα(ήταν επιθυμητό το πετρέλαιο να βρίσκεται σε κάθε σημείο της άμμου μέσα στα ταψιά).

#### ■ Θρεπτικά(NPK, ULR):

Για την αξιολόγηση της αποκατάστασης ρυπασμένης άμμου, ήταν απαραίτητο να εξετάσουμε, εκτός από το δείγμα που δεν περιέχει θρεπτικά(και χρησιμοποιείται σαν οδηγός για την ένδειξη της μείωσης των ποσοτήτων των συστατικών του πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς) διαφορετικούς συνδυασμούς θρεπτικών, έτσι ώστε εξάγοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, να είμαστε σε θέση να διακρίνουμε αυτό που ενίσχυσε σημαντικότερα τη μικροβιακή δραστηριότητα αποδόμησης του πετρελαίου.

Με προέλευση των δειγμάτων μας, να αποτελεί ακτή με χαμηλής ενέργειας κύματακαι λεπτόκοκκης άμμου(Τα υδατοδιαλυτάλίπασματα (water-soluble fertilizers) είναι οικονομικότερα και αποδοτικότερα σελεπτόκοκκες χαμηλής ενέργειας ακτές όπου η μεταφορά ύδατος είναι περιορισμένη [13]), επιλέχθηκαν να προστεθούν υδατοδιαλυτά θρεπτικά στο ένα από τα δύο αυτά δείγματα για να προσδώσουν την επιθυμητή φόρτιση (C:N:P – 100:10:1 [3]).

Πιο συγκεκριμένα, ως:

- Πηγή αζώτου, χρησιμοποιήθηκε το νιτρικό κάλιο(KNO<sub>3</sub>) σε ποσότητα 3,605 γραμμάρια
- Πηγή φωσφόρου, χρησιμοποιήθηκε το φωσφορικό κάλιο(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) σε ποσότητα 0,22 γραμμάρια

Στο δεύτερο δείγμα(καθώς υπάρχει το πιθανό πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης των θρεπτικών) επιλέχθηκαν τα ακόλουθα ως πηγή αζώτου και φωσφόρου:

- Πηγή αζώτου: Ουρικό οξύ, σε ποσότητα 1,5γραμμάρια – πρόκειται για μία μη υδατοδιαλυτή πηγή αζώτου η οποία προσαρτίζεται στην πετρελαιοκή φάση (προέρχεται από οικονομικές φυσικές ύλες)
- Πηγή φωσφόρου: Λεκθίνη,σε ποσότητα 2,38 γραμμάρια – δρα ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης(οικονομική φυσική ύλη)
- Πηγή οργανικού άνθρακα: Rhamnolipids, σε ποσότητα 1,77ml - δρα ως επιφανειοδραστική ένωση βιολογικής προέλευσης

Οι παραπάνω επιλογές που σχημάτισαν το δείγμα ULR, επιλέχθηκαν καθώς η επιλογή των κατάλληλων θρεπτικών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε [13]:

- Να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης των θρεπτικών από τα κύματα
- Να είναι δυνατή η δράση τους στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος
- Να μπορούν εύκολα να βιοδιασπαστούν και είναι μη τοξικά
- Κόστος εφαρμογής πρέπει να είναι χαμηλό



Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των τριών σημαντικότερων ειδών θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης.

ίνακας 4: Σημαντικότερα είδη θρεπτικών – Συνοπτική αξιολόγηση [13]

| Είδος θρεπτικών                                                                                                                                          | Πλεονεκτήματα                                                                                                                               | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                 | Εφαρμογές στο πεδίο                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Υδατοδιαλυτά (π.χ. KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>)</b> | Άμεσα διαθέσιμα<br><br>Εύκολα στο χειρισμό για να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις στόχοι των θρεπτικών<br><br>Δεν επιδρούν με την οργανική ύλη | Ξεπλένονται γρήγορα από τα κύμματα<br><br>Απαιτείται χειρωνακτική εργασία και φυσικές παρεισφρητικές εφαρμογές<br><br>Πιθανή τοξική επίδραση                                                                  | Alaska (Pritchard et al., 1992)<br>Delaware (Venosa et al., 1996)<br><br>Alaska (Pritchard et al., 1992)<br>Nova Scotia (Lee et al., 1993) |
| <b>Βραδείας Απελευθέρωσης (π.χ. Customblen, IBDU, Max-Bac)</b>                                                                                           | Παροχή συνεχούς πηγής θρεπτικών και μπορεί να είναι πιο φθηνή η εφαρμογή τους σε σχέση με άλλου είδους θρεπτικά                             | Η διατήρηση βέλτιστων ρυθμών απελευθέρωσης θρεπτικών δεν έχει επιτευχθεί                                                                                                                                      |                                                                                                                                            |
| <b>Ολεοφιλικά (π.χ. Inipol EAP22, F1, MM80)</b>                                                                                                          | Ικανά να προσκολλούνται στο πετρέλαιο και έτσι να παρέχουν θρεπτικά στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος                                      | Ακριβά<br><br>Η αποτελεσματικότητά τους είναι μεταβλητή<br><br>Περιέχουν οργανικό άνθρακα, ο οποίος μπορεί να συναγωνιστεί την διάσπαση του πετρελαίου και έτσι να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ανοξικές συνθήκες | Alaska (Pritchard et al., 1992)<br>Nova Scotia (Lee et al., 1987, 1989,1995a &b)                                                           |

▪ Προετοιμασία θρεπτικού μέσου(marine agar σε τριβλία):

- Ζυγίζουμε 11,2 gr marine agar.
- Σε ογκομετρική φιάλη 250ml, τοποθετούμε το ζυγισμένο άγαρ μαζί με 200ml απιονισμένο νερό, την αναδεύουμε και την τοποθετούμε σε αποστειρωμένο κλίβανο.
- Μετά τον κλίβανο(και αφού μεσολαβήσει ένα απαραίτητο διάστημα ώστε να κρυώσει λίγο) ρίχνουμε το άγαρ στα τριβλία.

▪ Προετοιμασία Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού:

Στην περίπτωση που έχουμε έτοιμο εμπορικό θρεπτικό μέσο ζυγίζουμε 3,27gr Bushnell-Hass medium και το τοποθετούμε σε μια ογκομετρική φιάλη 1L προσθέτοντας 1L απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Αναδεύουμε και στη συνέχεια το τοποθετούμε στον αποστειρωτικό κλίβανο. Διαφορετικά, ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

- Ζυγίζονται τα ακόλουθα συστατικά που πρόκειται να διαλυθούν σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού:
  1. Φωσφορικό Κάλιο, μονοβασικό KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1 gr
  2. Φωσφορικό Κάλιο, διβασικό K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 gr
  3. Νιτρική Αμμωνία, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 gr
  4. Θεϊκό Μαγνήσιο, Επταένυδρο MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 gr
  5. Χλωριούχο Ασβέστιο, CaCl<sub>2</sub>, 0,02 gr
  6. ΤριχλωριούχοςΣίδηρος FeCl<sub>3</sub>, 0.05 gr
  7. Χλωριούχο Νάτριο, NaCl, 35 gr
- Παρασκευάζουμε διαλύματα 100ml για όλα τα παραπάνω συστατικά(εκτός από το NaCl για το οποίο το διάλυμα είναι 400ml) και τα αποστειρώνουμε.
- Αναμιγνύουμε τα παραπάνω διαλύματα για να επιτύχουμε την παρασκευή του Bushnell-Haas.
- Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7 με αποστειρωμένο διάλυμα NaOH 0,1M.

### 3.3 Γενική Αναφορά στην Μέθοδο

Η μέθοδος για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης που ανέπτυξε η EPA (“Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test”/40 CFR Part 300 Appendix C). Το πρωτόκολλο δοκιμής επιδιώκει να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο μέσω της ποσοτικοποίησης των αλλαγών στη σύνθεση του πετρελαίου. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα(μέσω των μικροβιακών αναλύσεων – CFUs και MPN) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs).

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου σε DCM με μια επόμενη ανταλλαγή διαλύτη σε εξάνιο. Η μέθοδος δοκιμής αποσκοπεί τα σχετικά εύκολα να διασπαστούν κανονικά αλκάνια και τα ανθεκτικότερα και τοξικά PAHs. Επειδή είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθούν οι

συγκεντρώσεις των διαφορών αναλυτών πετρελαιο σε έναν μη-βιοδιασπάσιμο δείκτη, γίνεται χρήση για τον σκοπό αυτό των εξής: C2-φθενανθρένιο ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή χοπάνιο(στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε χρησιμοποιήθηκε χοπάνιο), και κανονικοποιεί τις συγκεντρώσεις τους σε C2- ή C3- φθενανθρένιο, C2- χρυσένιο, ή C30 17α(H), 21β (H)-χοπάνιο σε μια βάση βάρους πετρελαίου (mg δείκτη/kg πετρελαίου, mg αναλύτη στόχου/kg πετρελαίου). Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί έναν αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (GC/MS) λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Η μέθοδος προετοιμασίας των δειγμάτων δεν αποκλείει την ανάλυση των επιλεγμένων δειγμάτων από το GC/MS σε full scanning τρόπο λειτουργίας για να αξιολογηθούν ποιοτικά οι αλλαγές στο πετρέλαιο που δεν ελήφθησαν από την προσέγγιση SIM.

[13, 14]

### 3.4 Αναλύσεις

#### 3.4.1 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Πίνακας 5: Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις μικροβιολογικές αναλύσεις

| Εργαστηριακός εξοπλισμός                              |                         |
|-------------------------------------------------------|-------------------------|
| ογκομετρικοί κύλινδροι                                | Αποστειρωτικός κλίβανος |
| απιονισμένο νερό                                      | Επωαστικός θάλαμος      |
| χαρτί ζύγισης                                         | Ζυγαριά ακριβείας 0.1mg |
| 250-ml βοριοπυριτικές κωνικές φιάλες με βιδωτό καπάκι | Loops                   |
| Πιπέτες των 2ml, 10 ml, 25 ml                         | Βαφή INT                |
| Pans(αλουμινένια κεσεδάκια)                           | Microtitier             |
|                                                       | MPN plates(96-well)     |
| Σωλήνες αραιώσης και καπάκια                          | Bushnell-Hass medium    |
| Τριβλία                                               | Άγαρ marine broth       |

Πριν τις αναλύσεις, εκτελούμε τις απαραίτητες αραιώσεις. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Ανάμιξη 5gr δείγματος ρυπασμένης άμμου με 50mlBH-medium και ανάδευση για 30min.
- Μεταφορά 1ml ύδατος από τη φιάλη που αναδεύσαμε σε αποστειρωμένο σωλήνα αραιώσης που περιέχει 9ml αποστειρωμένου Bushnell-Haas.
- Εκτέλεση τμηματικών αραιώσεων (1ml από την προηγούμενη κάθε φορά αραιώση σε σωλήνα αραιώσης που περιέχει 9ml αποστειρωμένου Bushnell-Haas), μέχρι την  $10^{-9}$  αραιώση.

#### ■ CFUs:

Η μέτρηση της ποσότητας των μικροοργανισμών με την μέθοδο CFUs (Colony-Forming Unit) μας παρέχει πληροφορία για την ανάπτυξη ή μη των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφεται ο μικροβιακός πληθυσμός ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση της ένδειξης της αποτελεσματικότητας της βιοαποικοδόμησης.

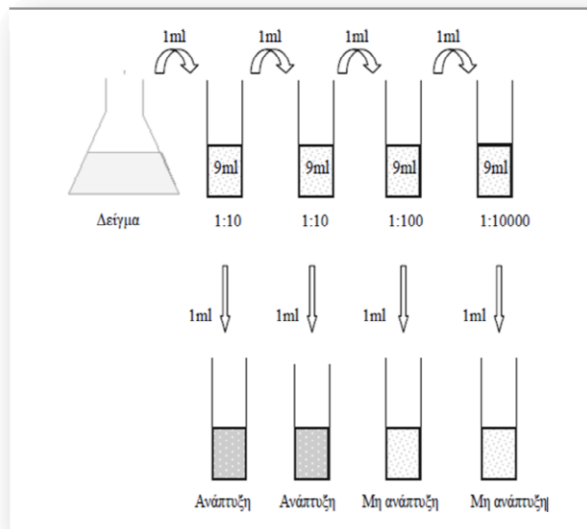
Σε τριβλία, τα οποία περιέχουν θρεπτικό υλικό(άγαρ), τοποθετούμε υγρό δείγμα από τις κατάλληλες κάθε φορά αραιώσεις(ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση), τα τοποθετούμε στον επωαστικό θάλαμο για 48 ώρες και τελικά γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών των μικροοργανισμών.

#### ■ MPN (Most Probable Number):

Η μέθοδος αυτή εξάγει ποσοτικά αποτελέσματα σε σχέση με τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις) και παρέχει πληροφορίες για την βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών καλλιεργειών. Σε κάθε δειγματοληψία, πραγματοποιείται μικροβιακή απαρίθμηση των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων με χρήση ενός microtiter MPN προσδιορισμό.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα(σε συνθήκες αποστείρωσης, με κάθε σκεύος που χρησιμοποιούμε να είναι αποστειρωμένο):

- 180 μl B-H broth προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
- 5 μl πετρελαίου προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
- 20 μl δείγματος από κάθε διάλυση προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι στη σωστή σειρά ξεκινώντας από το πιο πυκνό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές για κάθε διάλυση. Οι δυο τελευταίες στήλες είναι έλεγχοι (μάρτυρες) (δεν προστίθεται καθόλου δείγμα).
- Τα πλακίδια επωάζονται στους 20 °C.
- Προστίθενται 50μl INT μετά από 15 μέρες επώασης.
- Μετά από μία μέρα επώασης, προσδιορίζεται η αλλαγή χρώματος στα πηγαδάκια(Η εμφάνιση κόκκινου ή ροζ χρώματος πιστοποιεί θετική ένδειξη).
- Ο αριθμός των θετικών ενδείξεων(και της κατάλληλης διάλυσης στην οποία αντιστοιχούν) καταγράφεται.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση – επεξήγηση της διαδικασίας MPN [15]

### 3.4.2 Χημικές Αναλύσεις

Πίνακας 6: Εργαστηριακός εξοπλισμός για τις χημικές αναλύσεις

| Εργαστηριακός εξοπλισμός |                                    |
|--------------------------|------------------------------------|
| Σφαιρικές φιάλες         | Ξηραντήρας                         |
| Πιπέτες Pasteur          | Vials 2, 5, 20, 40 ml              |
| Υαλοβάμβακας             | Στήλες SPE(Solid Phase Extraction) |
| Υποδοχείς                | Μηχάνημα Αζώτου (Nitrogen flow)    |
| Εκχυλιστήρες SOXHLET     | GC/MS όργανο                       |
| Ογκομετρικές φιάλες      |                                    |

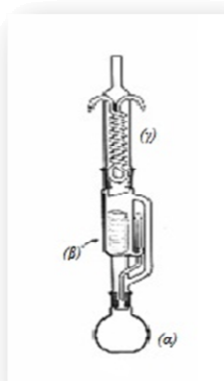
#### 3.4.2.1 Εκχύλιση δειγμάτων με συσκευή Soxhlet

Για την εκχύλιση των δειγμάτων του πετρελαίου, στα πλαίσια του εργαστηρίου, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση διαλύματος ουσιών με ένα υγρό, που αποτελεί την πιο συνηθισμένη περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στο πετρέλαιο και σε δείγματα πετρωμάτων. Η εκχύλιση έγινε σε συσκευή Soxhlet, με χρήση διαλύτη, όπως το χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο(στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε DCM).

Τα βήματα που εκτελούμε πριν την έναρξη της εκχύλισης είναι τα ακόλουθα:

- Τοποθετούμε υαλοβάμβακα στον υποδοχέα του δείγματος και ζυγίζουμε.
- Τοποθετούμε το δείγμα ρυπασμένης άμμου (5g αφού πρώτα έχει ξηραθεί με αντίστοιχη ποσότητα  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και ξαναζυγίζουμε.
- Καλύπτουμε το δείγμα με υαλοβάμβακα και το τοποθετούμε τον υποδοχέα μέσα στον εκχυλιστήρα Soxhlet.
- Τοποθετούμε 300ml DCM(απεσταγμένου) σε σφαιρική φιάλη (500ml), καθώς και μερικά(5-10) σφαιρίδια βρασμού.
- Τοποθετούμε στη συνέχεια, τη σφαιρική φιάλη στη θερμαντική επιφάνεια, και τη συνδέουμε με τον εκχυλιστήρα, προσαρμόζοντας τον ψυκτήρα σε αυτήν.

Η διαδικασία της εκχύλισης μέσω της συσκευής Soxhlet περιγράφεται διαγραμματικά στο ακόλουθο σχήμα - εικόνα . Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα γ και επαναρρέουν επί του υποδοχέα β του δείγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη μέχρι το ύψους του κεκκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός και ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη α και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη α με τα διαλυτά συστατικά του δείγματος. Η διαδικασία της εκχύλισης διαρκεί 24h.



Εικόνα 4: Στήλη Soxhlet[16]



Μετά από 24 ώρες, όπου η εκχύλιση έχει ολοκληρωθεί, εκτελούμε τα παρακάτω βήματα:

- Η σφαιρική φιάλη(αφού κρυώσει) μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Αφού γίνει η συλλογή του αποστάγματος από τον συμπυκνωτή, αφήνεται στον ξηραντήρα για 24 ώρες.
- Στη συνέχεια, ζυγίζεται και γίνεται η μεταφορά του αποστάγματος σε φιαλίδια, με χρήση διαλύτη(DCM suprasolv).
- Από τα φιαλίδια εξταμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου, αφού έχει τοποθετηθεί σε θερμαντική επιφάνεια ώστε να επιταχύνεται η διαδικασία.
- Τα φιαλίδια ζυγίζονται μετά την προηγούμενη διαδικασία και προσδιορίζεται το βάρος των υδρογονανθράκων από τη διαφορά των δύο ζυγίσεων.

### 3.4.2.2 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE) –Κλασματοποίηση Πετρελαίου



Εικόνα 5 : Τυπική διάταξη SPE [17]

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction) αποτελεί τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση (δοκιμή ή ανάλυση) δείγματος που χρησιμοποιείται ευρέως.

Μετά από το τέλος της εκχύλισης υγρής - υγρής φάσης, ζυγίζουμε 5-10mg πετρελαίου και τα μεταφέρουμε σε προζυγισμένο φιαλίδιο όπου το διαλύουμε σε 1 mL εξανίου.

- Προσαρμόζουμε την διάταξη SPE και κάνουμε *Preconditioning* της στήλης με 6 mL εξανίου
- Παίρνουμε το δείγμα και το βάζουμε μονομιάς με μια πιπέτα στη στήλη
- Προσθέτουμε 4 mL εξανίου με μια πιπέτα σε κάθε στήλη για να παρουμε το 1ο κλάσμα που είναι τα κορεσμένα (αλκάνια)
- Περνάμε από τη στήλη 5 mL  $C_6$ :DCM (1:1) ώστε να ανακτήσουμε το κλάσμα των αρωματικών υδρογονανθράκων
- Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μεταφέρουμε σε προζυγισμένα φιαλίδια τα 2 κλάσματα για ξήρανση σε ρεύμα αζώτου και τα τοποθετούμε για περίπου 24 ώρες στο ξηραντήρα. Την επόμενη ημέρα ζυγίζονται και πάλι (Ξεπλένουμε την συσκευή με τον τελευταίο διαλύτη που χρησιμοποιήσαμε).

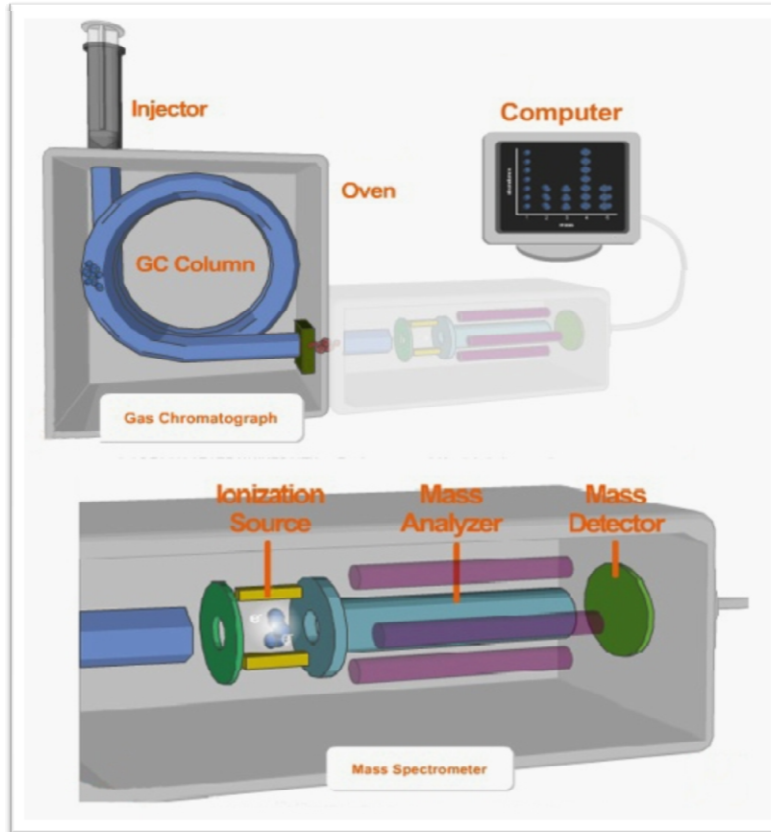
### 3.4.2.3 GC/MS Ανάλυση

Η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης πρόκειται για μέθοδο που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας, στοχεύοντας να προσδιορίσει τα διαφορετικά συστατικά (υπολογίζοντας συγκεντρώσεις και μάζα) ενός δείγματος που αναλύεται [18].

Το όργανο GC/MS είναι κατασκευασμένο από δύο τμήματα. Ο αέριος χρωματογράφος (GC), αρχικά διαχωρίζει το χημικό δείγμα στα συστατικά του και στη συνέχεια ο φασματογράφος μάζας (MS) ταυτοποιεί και ποσοτικοποιεί τα συστατικά αυτά(η διάταξη ενός τέτοιου οργάνου είναι εμφανής στην ακόλουθη εικόνα ).

Το φέρον αέριο και το κλάσμα της οργανικής ένωσης διαβιβάζονται, μετά το διαχωρισμό τους από τον αέριο χρωματογράφο, σε ένα ακροφύσιο διαχωρισμού. Με τον τρόπο η οργανική ένωση (σε αέρια κατάσταση), που είναι πιο βαριά από το ήλιο, περνάει στο σύνολό της κατά μήκος του υψηλού κενού (μεταξύ των δύο ακροφυσίων) στο θάλαμο ιονισμού, ενώ το μικρού μοριακού βάρους αέριο διαχέεται πλαγίως, κάτω από την επίδραση του κενού. Ο αέριος χρωματογράφος είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον φασματογράφο μάζας και το φάσμα μαζών κάθε μίας ουσίας στο μίγμα καταγράφεται καθώς εγκαταλείπει τη στήλη διαχωρισμού. Με τον τρόπο αυτό, (που υποβοηθείται σε σημαντικό βαθμό τελευταία με ηλεκτρονική καταγραφή του χρωματογραφήματος και ευχέρεια ακριβούς διαχωρισμού), γίνεται και η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων προσμίξεων και η πιστοποίηση τους.

[18, 19, 20]



Εικόνα 6: Αναλυτική εσωτερική διάταξη ενός οργάνου GC/MS [20]

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται για την ανάλυση GC/MS είναι τα εξής:

- Πριν από την έγχυση, ένα εσωτερικό πρότυπο (internal standard), διάλυμα τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων προστίθεται στα εκχυλίσματα των δειγμάτων. Τα δείγματα ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου για τα αλειφατικά και τα αρωματικά κλάσματα των εκχυλισμάτων πετρελαίου ώστε να είναι δυνατή η εξακρίβρωση ότι το πετρέλαιο βιοαποδομείται.
- Είναι απαραίτητα κανονικοποιηθούν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στόχων μέσω εσωτερικών δεικτών «conserved internal marker», έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι η παρατηρηθείσα πτώση οφείλεται στην βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου και όχι λόγω απωλειών κατά τις προηγούμενες διαδικασίες.
- Εσωτερικοί δείκτες που έχουν βρεθεί χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση είναι C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο και C3017α(H),21β(H)-χοπάνιο (στη διαδικασία που εκτελέσαμε χρησιμοποιήθηκε το χοπάνιο ως δείκτης). Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί ο σχετικός συντελεστής απόκρισης (relative response factor - RRF) για τους αναλυτές στόχους.
- 1 mL από το διάλυμα εξανίου C<sub>6</sub> τοποθετείται σε φιαλίδιο - 1,5mL για το πρώτο κλάσμα FI (αλκάνια).
- 1 mL από το διάλυμα DCM τοποθετείται σε φιαλίδιο - 1,5mL για το δεύτερο κλάσμα FII (αρωματικό υδρογονάνθρακες).
- Σε αυτό το διάλυμα 2,5 μL από το διάλυμα 200 ppm των εσωτερικών προτύπων προστίθεται και το δείγμα είναι έτοιμο για ένεση στο GC. Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 1 ppm. Αυτό το διάλυμα περιέχει 4 δευτεριωμένα συστατικά: d8-naphthalene, d10-anthracene, d12-chrysene και d12-perylene.
- Ένα τυφλό οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν από την ανάλυση των αγνώστων αναλυτών. Τα εσωτερικά πρότυπα συνδυάζονται με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων και εγχύονται μαζί σε κάθε ανάλυση για να ελεγχθεί η απόδοση του οργάνου κατά τη διάρκεια κάθε σειράς αναλύσεων.
- Οι απαραίτητες πληροφορίες (όνομα, ποσότητα, συνθήκες, κ.λ.π.) σε σχέση με το δείγμα που εισάγεται κάθε φορά προς ανάλυση περιγράφονται στο *acquisition form* του προγράμματος του αέριου χρωματογράφου.
- Ο φασματογράφος μάζας βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 10 ppm αντί 40 ppm. Αποκτάται μια καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό (φαίνονται στον πίνακα XXX, του παραρτήματος) πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 0,1 - 20 ppm. Η βαθμονόμηση των 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο μείγμα συστατικών για να προσδιοριστούν τα RRFs για κάθε αναλύτη.
- Για κάθε συστατικό, γίνεται υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο:

$$RF = \frac{A_x \cdot C_{is}}{A_{is} \cdot C_x}$$

όπου:

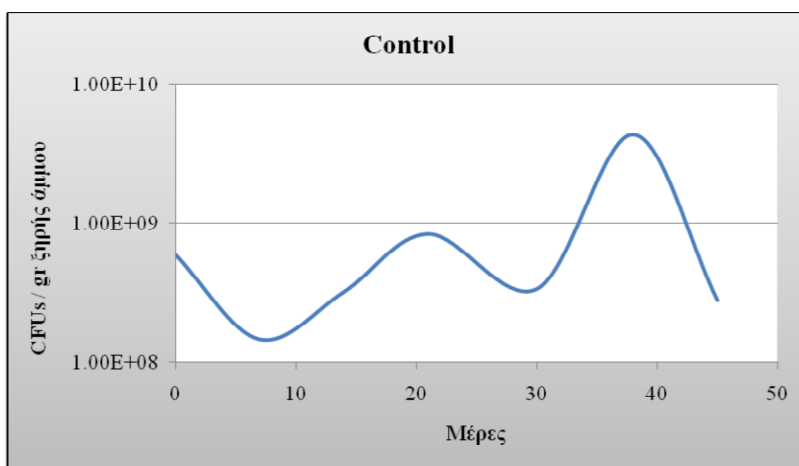
- RF: συντελεστής απόκρισης
- A<sub>x</sub>: το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται
- A<sub>is</sub>: το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο
- C<sub>x</sub>: η συγκέντρωση (σε ng/μL) του συστατικού που μετράται
- C<sub>is</sub>: η συγκέντρωση (10 ng/μL) του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου (σταθερή για την καμπύλη βαθμονόμησης)
- Ταυτοποιείται κάθε αναλυτής βασιζόμενοι στην *integrated abundance* από το πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν (στον πίνακα 7, του παραρτήματος, αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ιόντα των συστατικών)
- Γίνεται ποσοτικοποίηση των αναλυτών (με χρήση της τεχνικής εσωτερικού προτύπου - το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αυτό που έχει

## 4 Επεξεργασία Μετρήσεων – Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

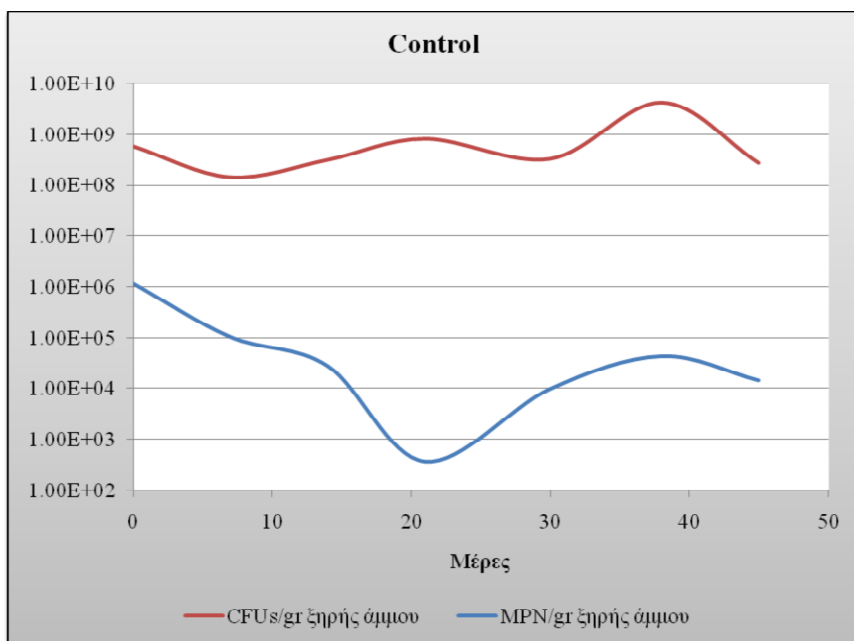
Από τις μετρήσεις – αναλύσεις που εκτελέσαμε, εξήχθησαν ορισμένα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω γραφημάτων που συγκεντρώνουν και καθιστούν περισσότερο κατανοητά τα αποτελέσματα αυτά. Για το κάθε δείγμα(Control, NPK, ULR), παρουσιάζονται 2 γραφήματα που αντιστοιχούν στις μικροβιολογικές αναλύσεις(για CFUs και MPN), και 2 που αντιστοιχούν στις χημικές(για το κλάσμα των κορεσμένων και το κλάσμα των αρωματικών),και παράλληλα γίνεται σχολιασμός αυτών.

### 4.1 Γραφήματα αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών αναλύσεων

Παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τα αποτελέσματα των μικροβιακών αναλύσεων για κάθε δείγμα(Control, NPK, ULR) ξεχωριστά.



Γράφημα 2: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το Control



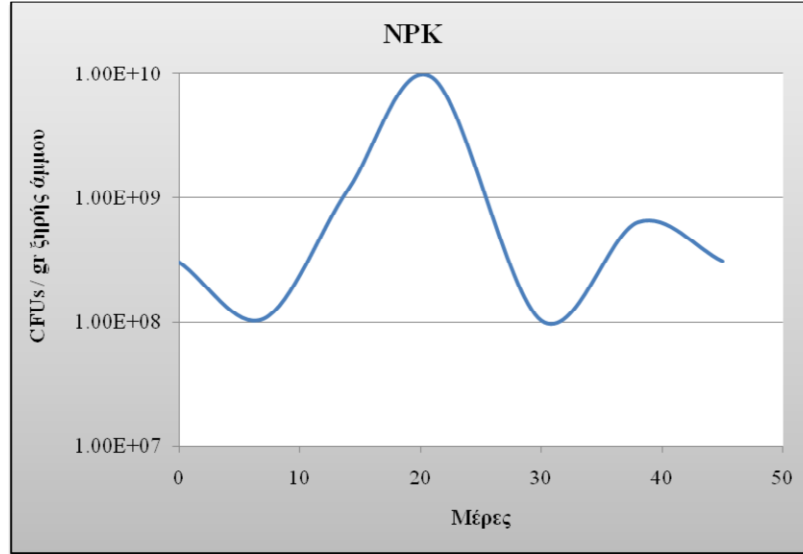
Γράφημα 3: Συγκενρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με τον χρόνο – για το Control

Το συγκεκριμένο δείγμα περιέχει μόνο άμμο που έχει ρυπανθεί από το πετρέλαιο και τους εξειδικευμένους μικροοργανισμούς. Από τα δύο παραπάνω γραφήματα, είναι εμφανές ότι επιτυγχάνεται μικροβιακή ανάπτυξη η οποία αποτελεί ένδειξη για την βιοαποδόμηση του πετρελαίου, παρά το γεγονός ότι στην άμμο στο παρόν δείγμα δεν έχει γίνει προσθήκη θρεπτικών μέσων.

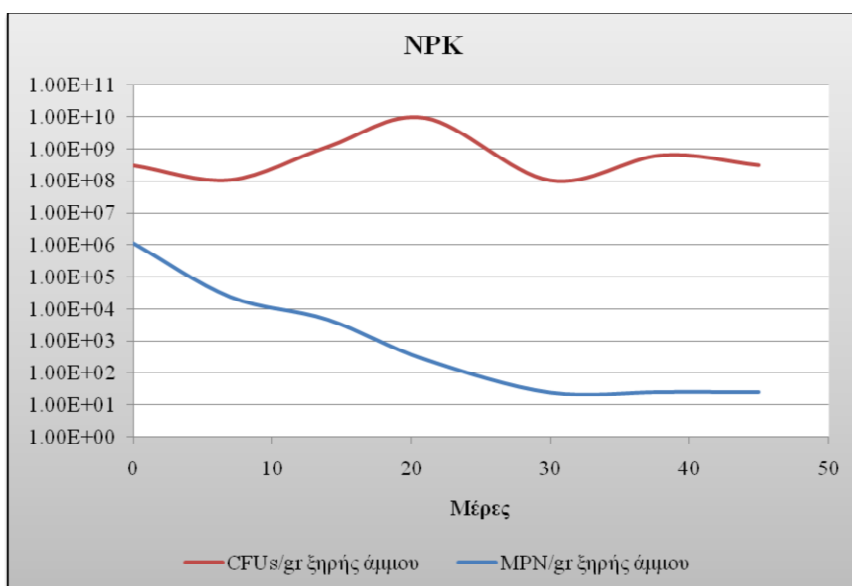
Η μέγιστη ανάπτυξη(κρίνοντας από την μορφή της καμπύλης και στα δύο γραφήματα) επιτυγχάνεται στις περίπου 40 μέρες από την έναρξη της διαδικασίας. Η αρχική πτώση που εμφανίζεται είναι αναμενόμενη, καθώς απαιτείται ένα μικρό χρονικό διάστημα προσαρμογής, ώστε να αρχίσουν οι μικροοργανισμοί να τρέφονται ικανοποιητικά. Η πτώση (πτώση της καμπύλης, από τις 21 μέχρι τις 25 μέρες στα CFU, και από τις 16 μέχρι τις 22 στα MPN) που είναι διακριτή στα γραφήματα, οφείλεται σε μείωση του ποσοστού υγρασίας στο δείγμα της άμμου.

Ο μεγαλύτερος αριθμός μικροοργανισμών των CFUs, είναι αναμενόμενο να εμφανίζεται καθώς πρόκειται για μέθοδο που κάνει απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού - υπολογίζοντας όλους τους μικροοργανισμούς στο δείγμα, και όχι μόνο αυτούς που αποδομούν το πετρέλαιο.





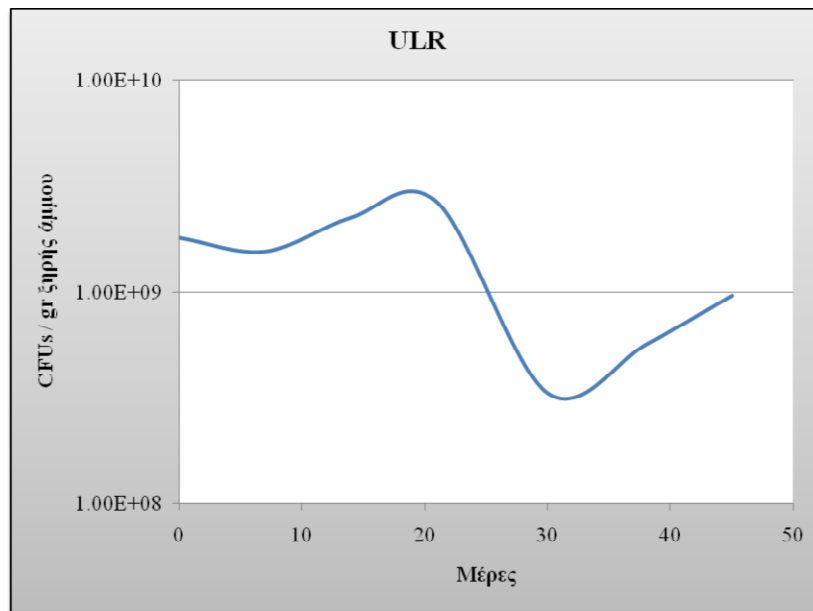
Γράφημα 4: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το NPK



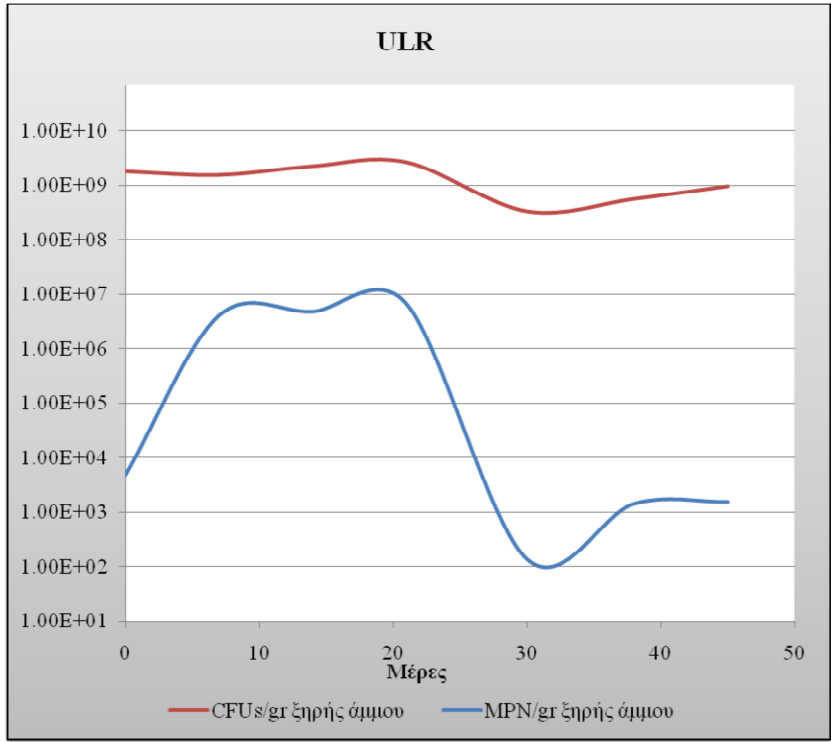
Γράφημα 5: Συγκενρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το NPK

Το παρόν δείγμα NPK(που έχει γίνει προσθήκη αζώτου, φωσφόρου),εξετάζοντας το γράφημα που αντιστοιχεί στα CFUs, παρουσιάζει πιο άμεση(χρονικά) απόκριση των μικροοργανισμών που βιοαποδομούν το πετρέλαιο. Παρά το γεγονός ότι εμφανίζονται μικρές μεταβολές στην καμπύλη λόγω διαφορετικής υγρασίας που υπήρξε στο δείγμα στις δειγματοληψίες, επιτυγχάνεται μεγάλη ανάπτυξη μικροοργανισμών μετά τις 10 πρώτες μέρες(φθάνοντας σε ένα μέγιστο σημείο), ήδη από τις 20-21 μέρες.

Στο συγκριτικό – συγκενρωτικό γράφημα 5, πρέπει να σημειώσουμε πως η καμπύλη των MPN δεν είναι η αναμενόμενη - δεν παρουσιάζει ομοιότητα με την καμπύλη των CFUs, αλλά συνεχή πτώση. Η μέθοδος MPN, παρά το γεγονός ότι εξετάζει την ανάπτυξη των βιοαποδομητών μικροοργανισμών, πρόκειται για στατιστική μέθοδο, και αυτό σημαίνει ότι εμπεριέχει σφάλμα. Υπάρχει η πιθανότητα, η πτώση αυτή να οφείλεται αποδόμηση της μεγαλύτερης ποσότητας του πετρελαίου, ήδη από το διάστημα 13-18 μέρες.



Γράφημα 6: Συσχέτιση CFUs/gr ξηρής άμμου με το χρόνο(μέρες) για το ULR



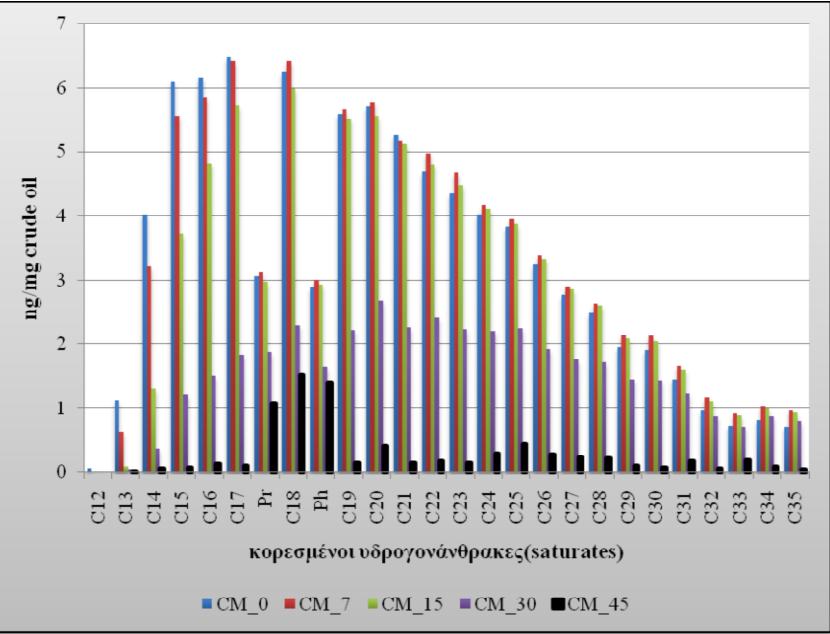
Γράφημα 7: Συγκενρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το ULR

Παρατηρώντας και τα δύο γραφήματα, οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν το μέγιστο βαθμό ανάπτυξης, σχεδόν στον ίδιο χρόνο, δηλαδή στις 20 ημέρες. Η πτώση που παρατηρείται μετά τις 21-22 ημέρες και στη συνέχεια η μικρή άνοδος της καμπύλης, οφείλεται στο μικρό ποσοστό υγρασίας που περιείχε το δείγμα κοντά στις 30 μέρες, ενώ στη συνέχεια, αυξήθηκε, γεγονός που αποτυπώνεται στο παραπάνω διάγραμμα. Εξετάζοντας και τις δύο καμπύλες, είναι εμφανές ότι οι μικροοργανισμοί, στο συγκεκριμένο δείγμα, ανταποκρίνονται άμεσα, παρουσιάζοντας μία σχεδόν συνεχή αύξηση μέχρι το μέγιστο σημείο ανάπτυξης.

#### 4.2 Γραφήματα αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων

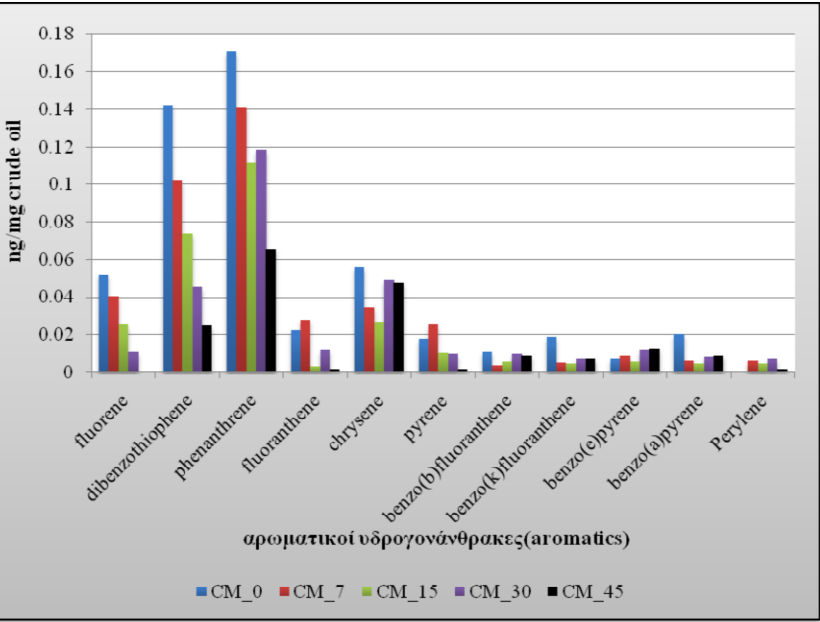
Για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (δείγμα ελέγχου - Control, NPK, ULR) παρουσιάζονται ακολούθως τα κανονικοποιημένα διαγράμματα ως προς το χοπάνιο για τα κλάσματα των αρωματικών και των κορεσμένων υδρογονανθράκων. Τα γραφήματα αυτά προέκυψαν από την επεξεργασία των μετρήσεων που εξήχθησαν από τον αναλυτή GC/MS.

##### 4.2.1 Control



Γράφημα 8: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το δείγμα ελέγχου(Control) με το χρόνο(μέρες)

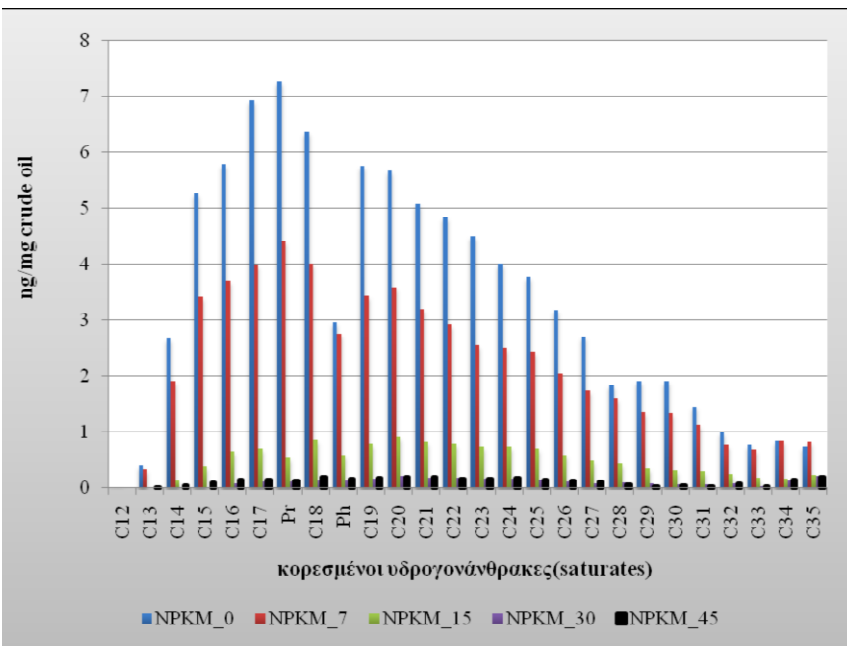
Στο παραπάνω γράφημα, γίνεται επαλήθευση των ενδείξεων που υπήρχαν από τα γραφήματα των MPN, CFU, για το δείγμα αυτό. Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου (η μεγαλύτερη ποσότητα του), από το γράφημα λαμβάνει χώρα μετά τις 30 μέρες, με τις ποσότητες όλων των κορεσμένων(εκτός από το Πρυστάνιο και το Φυτάνιο – δεν αποδομούνται στον ίδιο βαθμό με τα υπολοιπα) να είναι πολύ χαμηλές την 45<sup>η</sup> μέρα.



Γράφημα 9: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το δείγμα ελέγχου(Control) με τον χρόνο

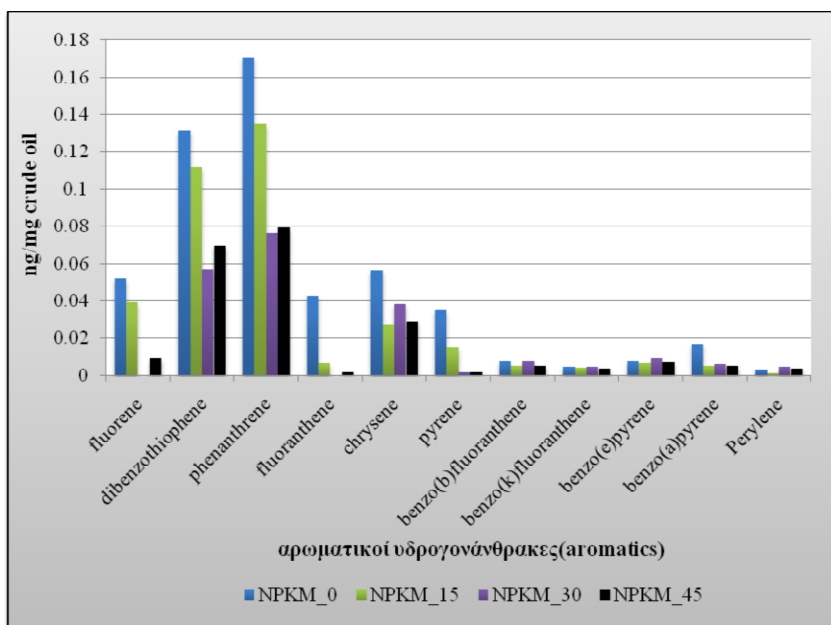
Η πορεία της ποσότητας των αρωματικών, με την πάροδο του χρόνου, είναι η αναμενόμενη και αποτυπώνεται στο παραπάνω γράφημα. Κρίνοντας κυρίως από τα λιγότερο ελαφριά, (π.χ. fluorene, fluoranthene), στην ποσότητα τους επέρχεται σημαντική μείωση, φθάνοντας σε πολύ μικρές τιμές (κοντά στο μηδέν ή κάτω από το όριο ανίχνευσης). Σε κάποια συστατικά, παρατηρείται η ποσότητα των 30 ή 45 ημερών να βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο(σχεδόν) με τις τιμές των 0 ή 15 ημερών, κυρίως στα βαριά συστατικά. Παρόλα αυτά, οι ποσότητες αυτές είναι τόσο μικρές που δε θεωρούνται πλήρως αξιόπιστες.

#### 4.2.2 NPK



Γράφημα 10: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το NPK με τον χρόνο(μέρες)

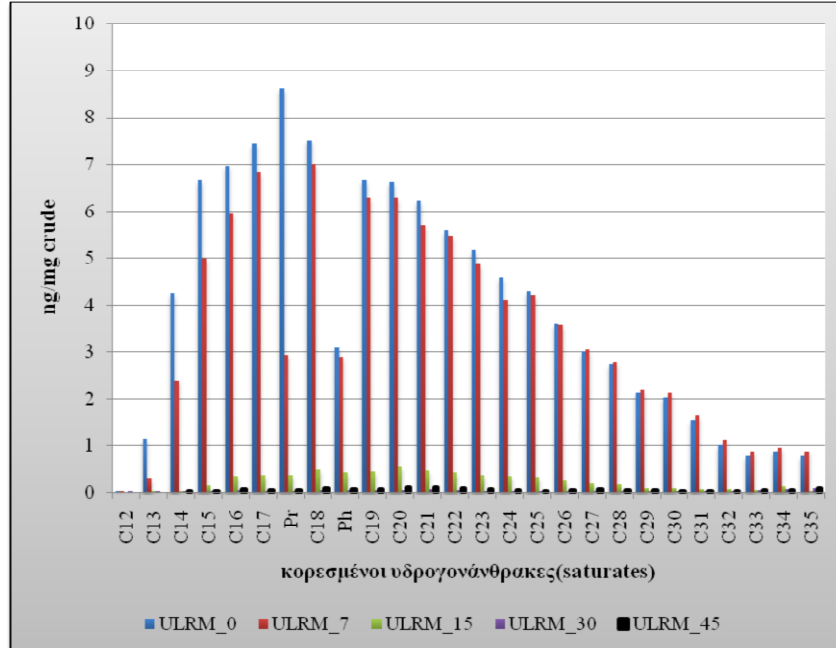
Εξετάζοντας και το γράφημα αυτό, για το δείγμα NPK, παρατηρούμε πως η βιοαποδόμηση των κορεσμένων λαμβάνει χώρα στο διάστημα μεταξύ 7 και 15 ημερών καθώς ήδη οι ποσότητες των συστατικών των 15 ημερών είναι πολύ χαμηλές(χρονικά νωρίς) και μειώνονται ακόμα περισσότερο στις 30 και 45 μέρες.



Γράφημα 11: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικώνγια το NPK με τον χρόνο(μέρες)

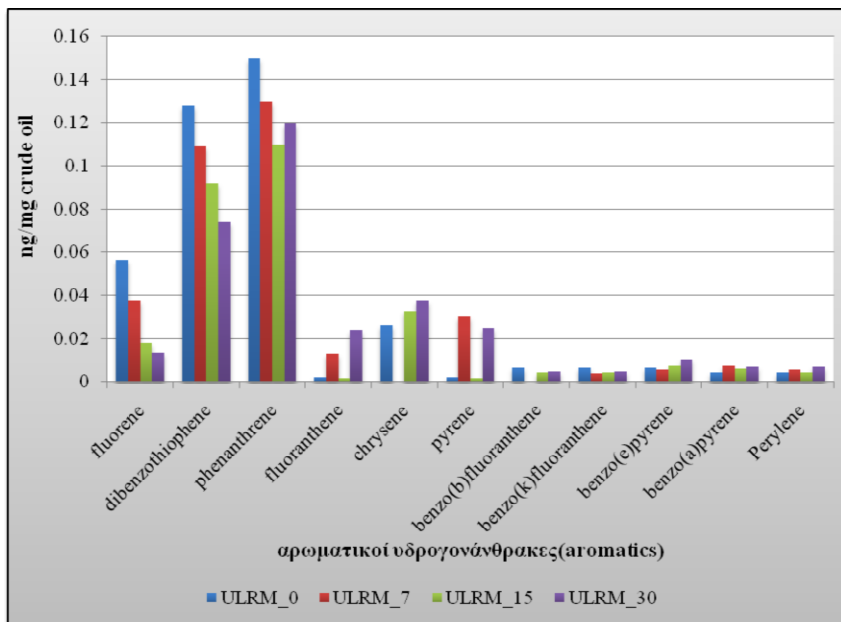
Το παραπάνω γράφημα, παρουσιάζει παρόμοια μορφή με το αντίστοιχο των κορεσμένων για το NPK(όσον αφορά στην μείωση των ποσοτήτων των συστατικών). Παρόλα αυτά, γίνεται εμφανές ότι είναι δυσκολότερο να αποδομηθούν τα αρωματικά(τα βαριά δεν μεταβάλλονται σημαντικά). Όπως και για το δείγμα ελέγχου, ορισμένες ποσότητες φαίνονται δε μεταβάλλονται σχεσόν καθόλου – αυτές είναι όμως τόσο χαμηλές που δε θεωρούνται πλήρως αξιόπιστες.

#### 4.2.3 ULR



Γράφημα 12: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το ULR με τον χρόνο (μέρες)

Εξετάζοντας το παραπάνω γράφημα, είναι κατανοητό πως η βιοαποδόμηση συμβαίνει στο χρονικό διάστημα 7 – 15 ημερών. Οι ποσότητες που αντιστοιχούν στην 15η μέρα είναι ήδη πολύ χαμηλές, με τις αντίστοιχες των 45 ημερών να πλησιάζουν το 0.

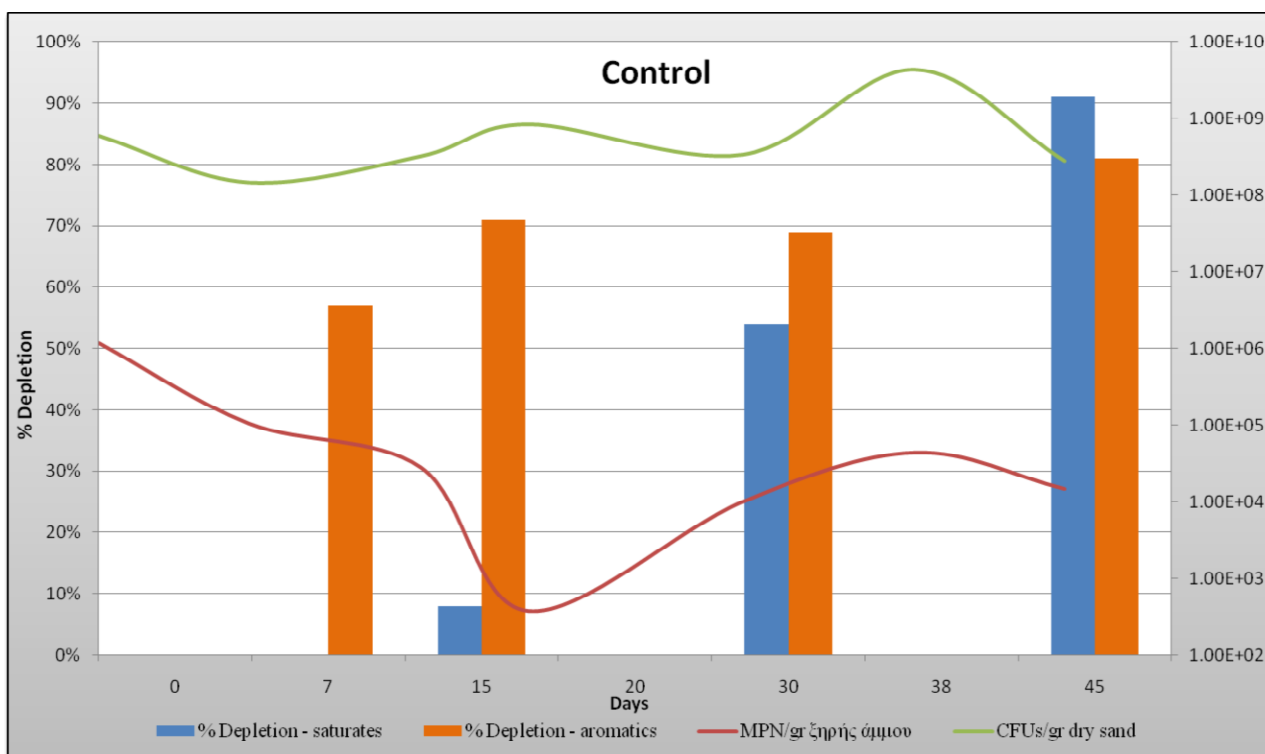


Γράφημα 13: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το ULR με τον χρόνο (μέρες)

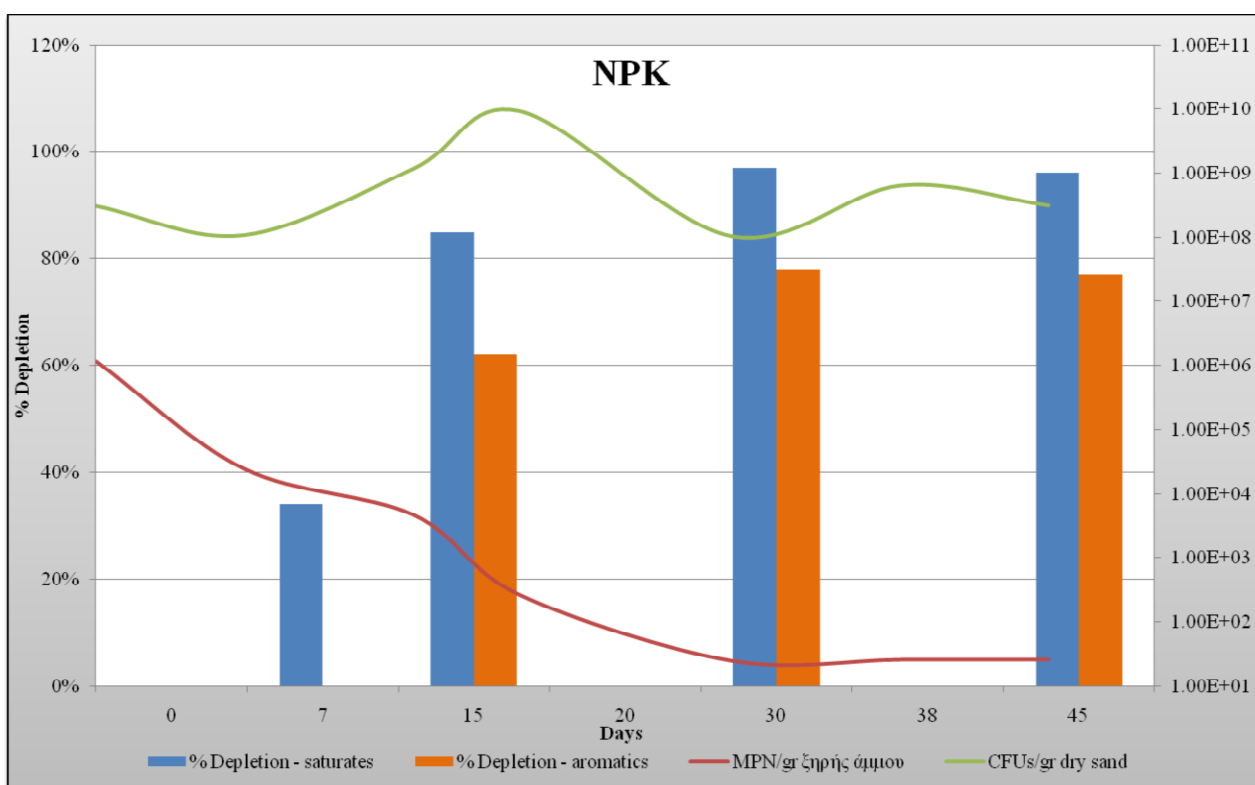
Η πορεία της ποσότητας των αρωματικών, στα λιγότερο ελαφριά, (π.χ. fluorine, dibenzothiophene, εκτός του fluoranthene) με την πάροδο του χρόνου, είναι η αναμενόμενη. Ορισμένες τιμές δεν είναι οι αναμενόμενες, καθώς εμφανίζονται των 30 ημερών να είναι μεγαλύτερες των 7 ή 15. Οι τιμές αυτές δε θεωρούνται αξιόπιστες και μπορεί να προήλθαν από πειραματικό σφάλμα.

#### 4.3 Συγκεντρωτικά γραφήματα (MPN, CFU, % Depletion of saturates, % Depletion of aromatics – Days) των δειγμάτων

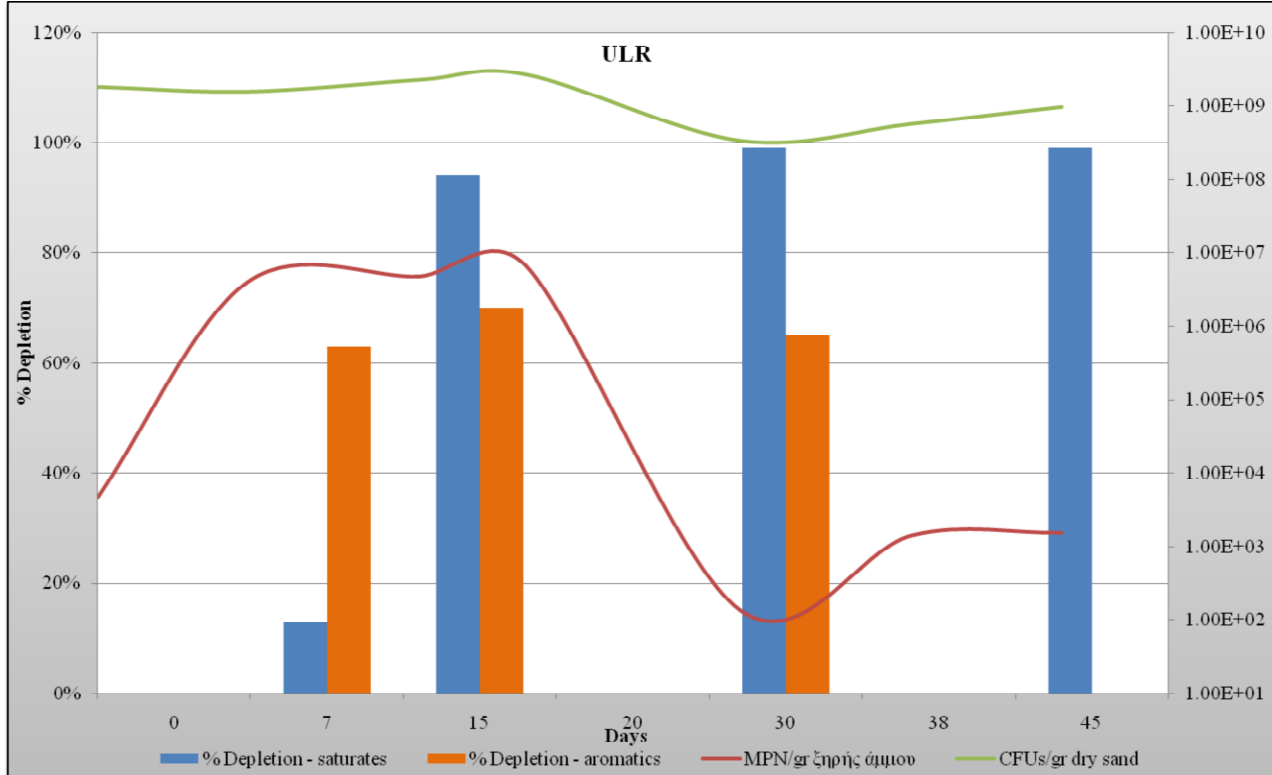
Ακολούθως, παρατίθενται τα γραφήματα που συγκεντρώνουν όλες τις μετρήσεις -αναλύσεις, ώστε να είναι εύκολη η συνολική διάκριση του βαθμού απομάκρυνσης του πετρελαίου, σε άμεση συσχέτιση με και με την μικροβιακή ανάπτυξη.



Γράφημα 14: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το Control



Γράφημα 15: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το NPK



Γράφημα 16: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το ULR



Μελετώντας τα παραπάνω γραφήματα για τα τρία δείγματα τα οποία εξετάσαμε, προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα, τα οποία αφορούν τον βαθμό αποδόμησης στα διαφορετικά θρεπτικά, καθώς επίσης και το χρόνο στον οποίο γίνεται η αποδόμηση των συστατικών του πετρελαίου.

Αρχικά,θα πρέπει να σημειώσουμε πως εξετάζοντας την βιοαποδόμηση στο δείγμα – «οδηγό», το Control(δείγμα ελέγχου), διαπιστώνουμε πως με την πάροδο του χρόνου επέρχεται η επιθυμητή αποδόμηση(και συνεπώς η μείωση των ποσοτήτων των συστατικών δεν οφείλεται σε απώλειες κατά την πειραματική διαδικασία ή προσκόλληση μέρους του πετρελαίου στα τοιχώματα των ταισιών των δειγμάτων). Η βιοαποδόμηση εμφανίζεται να συμβαίνει κοντά στις 40 μέρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Σε αντίθεση, τα δείγματα NPK και ULR, παρουσιάζουν πιο άμεση απόκριση όσον αφορά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την αποδόμηση του πετρελαίου. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η αποδόμηση(το μεγαλύτερο ποσοστό του πετρελαίου) σε αυτά τα δείγματα έχει ήδη λάβει χώρα τις πρώτες 20 μέρες.

Συγκρίνοντας λοιπόν, αυτά τα δείγματα, διαπιστώνουμε πως και τα δύο θρεπτικά μέσα έχουν παρόμοια επίδραση στην ενίσχυση της δραστηριότητας των βιοαποδομητών μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, το ULR παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό απομάκρυνσης στις μέρες δειγματοληψιών 15, 30 και 45 πλησιάζοντας το 100% στις τελευταίες δύο. Ενώ το NPK, εμφανίζει μεγαλύτερο βαθμό αποδόμησης την 7η μέρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βιοαποδόμηση ξεκινά πιο νωρίς σε σχέση με το ULR.

Συμπερασματικά λοιπόν, με δεδομένη και την μορφή της ακτής από την οποία προήλθαν τα δείγματα(λεπτόκοκκη άμμος, μειωμένη επίδραση των κυμάτων στην ακτή) μπορούμε να αναφέρουμε πως το πιο αποτελεσματικό θρεπτικό μέσο για το δείγμα της άμμου που εξετάσαμε ήταν το NPK. Παρότι το ULR επιτυγχάνει λίγο μεγαλύτερο βαθμό απομάκρυνσης του πετρελαίου, το NPK επιδρά θετικά στους μικροοργανισμούς ενισχύοντας την ανάπτυξη τους ταχύτερα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς ο χρόνος αποκατάστασης μιας ακτής είναι μεγίστης σημασίας. Ο συνδυασμός του νιτρικού και του φωσφορικού καλίουπου χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου και φωσφόρου αντίστοιχα και αποτελούν το συγκεκριμένο θρεπτικό παρουσιάζουν δυνατότητα «ιδανικής» απομάκρυνσης του πετρελαίου, επιτυγχάνοντας υψηλό βαθμό (  $\approx 96\%$ ) σε συνδυασμό και με τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει.

Μελλοντικά, θα ήταν ενδιαφέρον, να εξετασθεί ο συνδυασμός του θρεπτικού μέσου NPK με επιφανειοδραστική βιολογική ουσία(biosurfactant). Ο συνδυασμός αυτός ίσως να είχε σαν αποτέλεσμα την επίτευξη ακόμα μεγαλύτερου βαθμού απομάκρυνσης του πετρελαίου(ιδιαίτερα αισιόδοξη εκδοχή θα ήταν να μείωνε ακόμα περισσότερο τον χρόνο στον οποίο θα ξεκινούσε η διαδικασία της βιοαποδόμησης.

1. The International Tanker Owners Pollution Federation/data and statistics
2. Environmental Protection Agency/Landfarming (<http://www.epa.gov/oust/cat/LANDFARM.HTM>)
3. Ν.Καλογεράκης, Χανιά 2010, «Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος»
4. Naval Facilities Engineering Command/ Environmental Restoration/ Landfarming
5. Federal Remediation Technologies Roundtable (FRTR)/ remediation technologies screening matrix and reference guide (<http://www.frtr.gov/optimization/treatment.htm>)
6. R. Margesin & F. Schinner, July 2001, "Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments"
7. Mphokgo P. Maila<sup>1</sup>, & Thomas E. Cloete, 2005, "Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?"
8. Office of Technology Assessment, Washington 1990, "Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies"
9. Xueqing Zhu, Albert D. Venosa, Makram T. Suidan, and Kenneth Lee, September 2001, "Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands"
10. American Petroleum Institute, United States. National Ocean Service, United States Coast Guard, and Environmental Protection Agency, Seattle (WA) 2001, "Characteristics of response strategies: A guide for spill response planning in marine environments"
11. Kenneth Lee, Francois Xavier Merlin, Great Britain 1999, "Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines"
12. Ν. Καλογεράκης, "Bioaugmentation – Is it really needed for the bioremediation of contaminated sites?"
13. Μαρία Π. Νικολοπούλου, Χανιά 2005, «Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων»
14. Environmental Protection Agency, 2003, "Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test"/40 CFR Part 300 Appendix C
15. Σαμολάδα Μαρία, Κουτσομάνης Κων/νος, Θεσσαλονίκη 2011, «Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας»
16. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης(ΑΠΘ)/Τμήμα Χημείας/Οργανική Χημεία
17. Wikipedia(web encyclopedia)/ Solid Phase Extraction
18. Wikipedia(web encyclopedia)/ Gas chromatography– Mass spectrometry
19. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης(ΑΠΘ)/Τμήμα Χημείας/ Φασματομετρία μάζας
20. Oregon State University/ Environmental Health Sciences Center/ GC/MS



Παράρτημα Α – Πίνακες Αναλυτών στο GC/MS

Πίνακας 7: Ταξινόμηση αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης

| Εσωτερικό<br>Πρότυπο  | d8-<br>naphthalene | d10-anthracene   | d12-<br>chrysene | d12-perylene                |
|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| Αλκάνια               | nC10-nC15          | nC16-nC23        | nC24-nC29        | nC30-nC35                   |
|                       |                    | Pristane         |                  |                             |
|                       |                    | Phytane          |                  | C3017β(H),21α(H)-<br>hopane |
|                       |                    | 5α-androstane    |                  |                             |
| Αρωματικές<br>Ενώσεις | Naphthalene        | Dibenzothiophene | Fluoranthene     | Benzo(k)fluoranthene        |
|                       |                    |                  |                  | Benzo(b)fluoranthene        |
|                       |                    | Fluorene         | Pyrene           | Benzo(e)pyrene              |
|                       |                    |                  |                  | Benzo(a)pyrene              |
|                       |                    | Anthracene       |                  | Perylene                    |
|                       |                    |                  |                  | Indeno(g,h,i)pyrene         |
|                       |                    | Phenanthrene     | Chrysene         | Dibenzo(a,h)<br>anthracene  |
|                       |                    |                  |                  | Benzo(1,2,3-cd)<br>perylene |

Πίνακας 8: Πρωτεύοντα ιόντα για κάθε αναλυτή στόχο στο GC/MS

|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| Steranes (217 family)                         | 217        |
| Συστατικό                                     | <b>Ιόν</b> |
| Benzo(b)fluoranthene                          | 252        |
| n-alkanes (C <sub>10</sub> -C <sub>35</sub> ) | 85         |
| Benzo(k)fluoranthene                          | 252        |
| Pristane                                      | 85         |
| Benzo(e)pyrene                                | 252        |
| Phytane                                       | 85         |
| Benzo(a)pyrene                                | 252        |
| Naphthalene                                   | 128        |
| Perylene                                      | 252        |
| C1-naphthalenes                               | 142        |
| Ideno(g,h,i)pyrene                            | 276        |
| C2-naphthalenes                               | 156        |
| Dibenzo(a,h)anthracene                        | 278        |
| C3-naphthalenes                               | 170        |
| Benzo(1,2,3-cd)perylene                       | 276        |
| C4-naphthalenes                               | 184        |
| d <sub>8</sub> -naphthalene                   | 136        |
| Fluorene                                      | 166        |
| d <sub>10</sub> -anthracene                   | 188        |
| C1-fluorenes                                  | 180        |
| d <sub>10</sub> -phenanthrene                 | 188        |
| C2-fluorenes                                  | 194        |
| d <sub>12</sub> -chrysene                     | 240        |
| C3-fluorenes                                  | 208        |
| d <sub>12</sub> -perylene                     | 264        |
| Dibenzothiophenes                             | 184        |
| α-androstane                                  | 260        |
| C1-dibenzothiophenes                          | 198        |
| C2-dibenzothiophenes                          | 212        |
| C3-dibenzothiophenes                          | 226        |
| Anthracene                                    | 178        |
| Phenanthrene                                  | 178        |
| C1-phenanthrenes                              | 192        |
| C2-phenanthrenes                              | 206        |
| C3-phenanthrenes                              | 220        |
| Fluoranthene/pyrene                           | 202        |
| C1-pyrenes                                    | 216        |
| C2-pyrenes                                    | 230        |
| Chrysene                                      | 228        |
| C1-chrysenes                                  | 242        |
| C2-chrysenes                                  | 256        |
| Hopanes (177 family)                          | 177        |
| Hopanes (191 family)                          | 191        |

Πίνακας 9: Αναλυτές και συστατικά αναφοράς

| Αναλυτής                                                                    | Συστατικό αναφοράς                                                          | Αναλυτής                       | Συστατικό αναφοράς              |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| n-C10                                                                       | n-C10                                                                       | C2-naphthalene                 | Naphthalene.                    |
| n-C11                                                                       | n-C11                                                                       | C3-naphthalene                 | Naphthalene.                    |
| n-C12                                                                       | n-C12                                                                       | C4-naphthalene                 | Naphthalene.                    |
| n-C13                                                                       | n-C13                                                                       | Fluorene                       | Fluorene.                       |
| n-C14                                                                       | n-C14                                                                       | C1-fluorene                    | Fluorene.                       |
| n-C15                                                                       | n-C15                                                                       | C2-fluorene                    | Fluorene.                       |
| n-C16                                                                       | n-C16                                                                       | C3-fluorene                    | Fluorene.                       |
| n-C17                                                                       | n-C17                                                                       | Dibenzothiophene               | Dibenzothiophene.               |
| Pristane                                                                    | Pristane                                                                    | C1-dibenzothiophene            | Dibenzothiophene.               |
| n-C18                                                                       | n-C18                                                                       | C2-dibenzothiophene            | Dibenzothiophene.               |
| Phytane                                                                     | Phytane                                                                     | C3-dibenzothiophene            | Dibenzothiophene.               |
| n-C19                                                                       | n-C19                                                                       | Phenanthrene                   | Phenanthrene.                   |
| n-C20                                                                       | n-C20                                                                       | Anthracene                     | Anthracene.                     |
| n-C21                                                                       | n-C21                                                                       | C1-phenanthrene                | Phenanthrene.                   |
| n-C22                                                                       | n-C22                                                                       | C2-phenanthrene                | Phenanthrene.                   |
| n-C23                                                                       | n-C23                                                                       | C3-phenanthrene                | Phenanthrene.                   |
| n-C24                                                                       | n-C24                                                                       | Fluoranthene                   | Fluoranthene.                   |
| n-C25                                                                       | n-C25                                                                       | Pyrene                         | Pyrene.                         |
| n-C26                                                                       | n-C26                                                                       | C1-pyrene                      | Pyrene.                         |
| n-C27                                                                       | n-C27                                                                       | C2-pyrene                      | Pyrene.                         |
| n-C28                                                                       | n-C28                                                                       | Chrysene                       | Chrysene.                       |
| n-C29                                                                       | n-C29                                                                       | C1-chrysene                    | Chrysene.                       |
| n-C30                                                                       | n-C30                                                                       | C2-chrysene                    | Chrysene.                       |
| n-C31                                                                       | n-C31                                                                       | Benzo(b)fluoranthene           | Benzo(b)fluoranthene.           |
| n-C32                                                                       | n-C32                                                                       | Benzo(k)fluoranthene           | Benzo(k)fluoranthene.           |
| n-C33                                                                       | n-C33                                                                       | Benzo(e)pyrene                 | Benzo(e)pyrene.                 |
| n-C34                                                                       | n-C34                                                                       | Benzo(a)pyrene                 | Benzo(a)pyrene.                 |
| n-C35 C <sub>30</sub> <sup>17</sup> <sub>α</sub><br>(H),21 β (H)-<br>hopane | n-C35 C <sub>30</sub> <sup>17</sup> <sub>α</sub><br>(H),21 β (H)-<br>hopane | Perylene<br>ideno(g,h,i)pyrene | Perylene ideno(g,h,i)<br>pyrene |
| 5 <sub>α</sub> -androstane                                                  | 5 <sub>α</sub> -androstane                                                  | Dibenzo(a,h)anthracene         | Dibenzo(a,h)anthracene.         |
| C1-naphthalene                                                              | Naphthalene                                                                 | Benzo(1,2,3-cd)<br>perylene    | Benzo(1,2,3-cd)perylene         |

Παράρτημα Β – Πίνακες Μετρήσεων Μικροβιολογικών Αναλύσεων

Πίνακας 10: Μετρήσεις CFU για τα 3 δείγματα

| moisture percentage                       | days    | CFU/gr dry sand |
|-------------------------------------------|---------|-----------------|
| 20%<br>9%<br>24%<br>12%<br>7%<br>5%<br>9% | CONTROL |                 |
|                                           | 0       | 5,94E+08        |
|                                           | 7       | 1,46E+08        |
|                                           | 14      | 3,21E+08        |
|                                           | 21      | 8,36E+08        |
|                                           | 30      | 3,36E+08        |
|                                           | 38      | 4,34E+09        |
|                                           | 45      | 2,79E+08        |
|                                           | NPK     |                 |
|                                           | 0       | 3,06E+08        |
| 19%<br>9%<br>11%<br>5%<br>4%<br>7%<br>9%  | 7       | 1,07E+08        |
|                                           | 14      | 1,17E+09        |
|                                           | 21      | 9,28E+09        |
|                                           | 30      | 1,03E+08        |
|                                           | 38      | 6,39E+08        |
|                                           | 45      | 3,11E+08        |
|                                           | ULR     |                 |
|                                           | 0       | 1,81E+09        |
|                                           | 7       | 1,56E+09        |
|                                           | 14      | 2,25E+09        |
| 15%<br>7%<br>3%<br>5%<br>9%               | 21      | 2,66E+09        |
|                                           | 30      | 3,32E+08        |
|                                           | 38      | 5,65E+08        |
|                                           | 45      | 9,63E+08        |

Πίνακας 11: Μετρήσεις MPN για τα 3 δείγματα

| moisture percentage | days | MPN/gr dry sand |
|---------------------|------|-----------------|
| CONTROL             |      |                 |
| 20 %                | 0    | 1,17E+06        |
| 9 %                 | 7    | 1,05E+05        |
| 24 %                | 14   | 2,80E+04        |
| 12 %                | 21   | 3,74E+02        |
| 7 %                 | 30   | 9,95E+03        |
| 5 %                 | 38   | 4,36E+04        |
| 9 %                 | 45   | 1,46E+04        |
| NPK                 |      |                 |
| 19 %                | 0    | 1,16E+06        |
| 9 %                 | 7    | 2,44E+04        |
| 11 %                | 14   | 4,68E+03        |
| 5 %                 | 21   | 2,65E+02        |
| 4 %                 | 30   | 2,48E+01        |
| 7 %                 | 38   | 2,57E+01        |
| 9 %                 | 45   | 2,57E+01        |
| ULR                 |      |                 |
| 21 %                | 0    | 4,71E+03        |
| 8 %                 | 7    | 4,00E+06        |
| 15 %                | 14   | 4,72E+06        |
| 7 %                 | 21   | 6,54E+06        |
| 3 %                 | 30   | 1,35E+02        |
| 5 %                 | 38   | 1,41E+03        |
| 9 %                 | 45   | 1,53E+03        |