



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΧΗΜΙΚΩΝ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΠΟΥ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΥΝ
ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ**

ΚΟΡΚΑΚΑΚΗ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: κ. Νίκος Καλογεράκης

ΧΑΝΙΑ, 2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοεξυγείανση αποτελεί μία διαδικασία, κατά την οποία ζωντανοί μικροοργανισμοί – κυρίως βακτήρια – αποικοδομούν τους ρύπους σε μη τοξικά παράγωγα. Μία από τις σημαντικότερες μεθόδους βιοεξυγείανσης αποτελεί η βιοαποικοδόμηση πετρελαιοειδών μέσω μικροοργανισμών. Τα βακτήρια που είναι εξοικειωμένα με την παρουσία των συγκεκριμένων ρύπων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Αυτοί οι μικροοργανισμοί, για να πραγματοποιήσουν την διαλυτοποίηση των πετρελαιοειδών, παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες διαφορετικής χημικής δομής και μοριακού μεγέθους. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παρουσιάζουν την ιδιότητα να αυξάνουν την επιφάνεια των υδρόφοβων υποστρωμάτων και να αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα των πετρελαιοειδών, με αποτέλεσμα να επιταχύνουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και το ρυθμό της βιοαποδόμησης.

Στην παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν δείγματα από ρυπασμένες περιοχές, όπως ο κόλπος της Ελευσίνας και ο κόλπος Κερί στη Ζάκυνθο, από τα οποία απομονώθηκαν μικροβιακές κοινότητες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν το πετρέλαιο. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, από τα ίδια δείγματα σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου.

Για τον προσδιορισμό της σύστασης των απομονωμένων μικροβιακών κοινοτήτων που αποδομούν τα πετρελαιοειδή, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση, η οποία έδειξε ότι όλες οι κοινότητες αποτελούνται κυρίως από γ-proteobacteria, με κυρίαρχα γένη το *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*.

Η ικανότητα των μικροβιακών κοινοτήτων να αποδομούν το πετρέλαιοειδή μελετήθηκε μέσω πειράματος διάρκειας 10 ημερών, με προσθήκη επιπλέον θρεπτικών (αζώτου και φωσφόρου) στη μορφή του ενισχυτικού βιοαποδόμησης S-200 (bioremediation agent). Μετά τις 3 μέρες, στην περίπτωση όπου ο ρύπος ήταν πετρέλαιο, η βιοαποικοδόμηση των αλκανίων και των αρωματικών ήταν εμφανής. Στην περίπτωση του μαζούτ, η βιοαποικοδόμηση λάμβανε χώρα στις έξι μέρες

διεξαγωγής του πειράματος. Η συνεισφορά του S-200, ήταν περισσότερο εμφανής στην αποικοδόμηση των αρωματικών.

Για την βελτιστοποίηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, διεξήχθησαν πειράματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (εύρους 20-30° C), με διαφορετική πηγή άνθρακα (αργό πετρέλαιο, μελάσα με αργό πετρέλαιο) και με προσθήκη επιπλέον αζώτου, φωσφόρου. Μελετήθηκαν η παραγωγή τριών διαφορετικών τύπων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, τα ραμνολιπίδια και τα σοφορολιπίδια. Οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (20° C), ενώ η αλλαγή στη πηγή άνθρακα από αργό πετρέλαιο σε μείγμα αργού πετρελαίου-μελάσας επιφέρει αύξηση μόνο στην βακτηριακή ανάπτυξη και όχι στην παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος.

ABSTRACT

Bioremediation process is the use of living organisms, primarily microorganisms, to degrade the environmental contaminants into less toxic forms. It uses naturally occurring bacteria and fungi or plants to degrade or detoxify substances hazardous to human health and/or the environment. One of the most important applications of bioremediation is the oil degradation by microorganisms. Hydrocarbon-degrading microorganisms, adapted to grow and thrive in oil-containing environments, have an important role in the biological treatment of this pollution. Those microorganisms produce biosurfactants of diverse chemical nature and molecular size. Biosurfactants increase the surface area of hydrophobic water-insoluble substrates and increase their bioavailability, thereby enhancing the growth of bacteria and the rate of bioremediation.

In this study, samples taken from polluted sites, such as Elefsina Refinery (Athens) and Zakynthos bay, were isolated and evaluated for their oil-degrading capability. At the same time, biosurfactant production –from the same marine microorganisms– was tested at different conditions of temperature and nutrients.

Phylogenetic analysis of 16s rRNA gene of the isolated consortium showed that the isolated oil-degrading bacteria consist of γ -proteobacteria, and mainly of different *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* and *Halomonas* strains.

A ten-day biodegradation experiment, during which different kind of oil pollutant was fed to the inoculum –mazut and crude oil–, was conducted. The parameters that were evaluated were the hydrocarbon degradation of the pure consortium in artificial seawater contaminated by crude oil 0.5%w/v (typical concentration of oil spill in sea), against the same consortium with addition of commercial fertilizer “S-200”. Hydrocarbon degradation was determined by extracting the leftover crude oil via liquid-liquid extraction with dichloromethane and separating alkane fraction from aromatic fraction using solid-phase extraction. Hydrocarbon concentration was measured with GC-MS.

The depletion of the hydrocarbons was obvious during all the sets of the experiments but the main difference between the ones with the fertilizer, was the

higher biodegradation rate of the aromatic compounds. Crude oil was biodegraded in a faster rate than mazut, since the bacterial strains were enriched and isolated using crude oil as sole carbon source.

Biosurfactant production experiments took place at different temperatures (20°C-30°C), with addition of nutrients (N-P) and different carbon sources (crude oil-molasses) in order to optimize the process. Two different types of biosurfactants (rhamnolipids, sophorolipids), which can degrade petroleum efficiently, were studied. Biosurfactant production was determined by extracting the inoculum with the appropriate solvent system. The crude extract was purified by silica column liquid chromatography. Each type of biosurfactant was detected by Thin Layer Chromatography (TLC) and characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The biosurfactant production showed a stable rate versus time, and at the same time it was found that the lowest inoculation temperature (20° C) was the optimal for the process.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά από ένα χρόνο και κάτι στο εργαστήριο, με ατέλειωτα ξενύχτια, Σαββατοκύριακα και δουλειά, η παρούσα εργασία ήταν αποτέλεσμα συμβολής πολλών ανθρώπων.

Αρχικά, πρέπει να ευχαριστήσω τον κ. Ν. Καλογεράκη, που μου ανέθεσε το θέμα μου, μου παρείχε τα μέσα και την καθοδήγηση για να κάνω μία πολύ όμορφη και ολοκληρωμένη δουλειά. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί παρά το ότι πολλές φορές με πίεζε αρκετά, με έμαθε να δουλεύω, να σκέφτομαι πρακτικά και να πράττω ανάλογα.

Φυσικά, δεν μπορώ να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Χημικής Τεχνολογίας. Στις υποψήφιες διδάκτορες και ερευνήτριες Παναγιώτα Μπαμπατσούλη, Ευδοκία Συρανίδου, Μαρία Πολίτη και Μαρία Νικολοπούλου για τις χρήσιμες συμβουλές, για την ανεκτικότητα τους στη συνεχή μου γκρίνια, όπως επίσης για τα άπειρα ευχάριστα διαλείμματα, τα οποία είχαν πάντα επιστημονικό τόνο! Επίσης τις ευχαριστώ γιατί μου έδειξαν πως είναι να δουλεύεις σε ευχάριστο περιβάλλον.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην πιο πρόσφατη συνεργάτιδα μου στο εργαστήριο, Ελευθερία Αντωνίου, η οποία με τη μεθοδικότητα της και το κέφι της, έκανε τα deadlines να φαίνονται ευχάριστα.

Η κ. Δ. Βενιέρη με τις συμβουλές της πάνω στα περισσότερα βιολογικά θέματα είχε καταλυτικό ρόλο στην εκπόνηση της παρούσας δουλειάς.

Ένα ακόμα ευχαριστώ πρέπει να ειπωθεί στον διεθνή φίλο μου, Philip Eickenbusch, με τον οποίο ουσιαστικά μαζί μάθαμε πολλές από τις τεχνικές που περιγράφονται και με τον οποίο μαζί ξενυχτήσαμε πολλά βράδια στο εργαστήριο, προσπαθώντας να βρούμε μια άκρη σε πολλά προβλήματα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λία Μαρκογιαννάκη και τον Θανάση Τεμπέλη, που ανέχονταν την μουρμούρα μου για το εργαστήριο, έξω από το εργαστήριο, όπως και τους γονείς μου, για την ηθική και –εν μέρει- υλική συμπαράσταση τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ρύπανση του περιβάλλοντος	1
1.2. Θαλάσσια επιβάρυνση από πετρελαιοειδή	4
1.3. Πετρέλαιο	5
1.4. Τεχνικές απορρύπανσης	8
1.5. Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου	13
1.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου	16
1.7. Ενισχυμένη βιοαποκατάσταση	17
1.8. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1. Δειγματοληψία - Χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις θαλασσινού νερού	27
2.1.1. Δειγματοληψία	27
2.1.2 Χημικές αναλύσεις θαλασσινού νερού	28
2.1.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις θαλασσινού νερού	31
2.2. Απομόνωση των βακτηρίων πο αποικοδομούν το πετρέλαιο - Μικροβιακός χαρακτηρισμός	32
2.2.1. Προσδιορισμός της καμπύλης ανάπτυξης των μεικτών βακτηριακών κοινοτήτων	34
2.2.2. Απομόνωση των βακτηρίων που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή	35
2.2.3. Εκτίμηση της υδροφοβικότητας – MATH test	35
2.2.4. Φυλογενετική ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων που αποικοδομούν το πετρέλαιο	37
2.3. Βιοαποικοδόμηση πετρελαιοειδών	41
2.3.1.Μικροβιολογικές αναλύσεις	42
2.3.1. Χημικές αναλύσεις	42
2.4. Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	45
3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ	52
3.1. Καμπάνιες συλλογής δειγμάτων	53
3.1.1 Δειγματοληψία στον κόλπο της Ελευσίνας	53
3.1.2. Δειγματοληψία από τη Ζάκυνθο	58
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ ΑΠΌ ΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	63
4.1. Καμπύλη ανάπτυξης των μικροβιακών κοινοτήτων	65
4.2. Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών κοινοτήτων - MATH test	68
4.3. Φυλογενετική ανάλυση	70
5. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΩΝ	100
5.1. Μικροβιακές αναλύσεις	102
5.2. Αναλύσεις συστατικών πετρελαίου	103
6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	117

6.1. Ανάπτυξη της κοινότητας EB78 υπό τις συνθήκες των πειραμάτων	119
6.2. Χαρακτηρισμός βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	122
6.3. Παραγωγή ραμνολιπιδίων	125
6.4. Παραγωγή σοφορολιπιδίων	129
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	132

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Εικόνες από το ναυάγιο του δεξαμενοπλοίου PRESTIGE και τη ρύπανση που προκάλεσε στο θαλάσσιο/παράκτιο περιβάλλον	4
Σχήμα 1.2: Διάγραμμα ροής αποστάξης αργού πετρελαίου	7
Σχήμα 1.3: Περισυλλογή πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας μέσω boom, τα οποία αποτελούν πλωτά φράγματα	9
Σχήμα 1.4: Αρχή λειτουργίας των μέσων διασποράς, σε περίπτωση πετρελαιοκηλίδας στο θαλάσσιο περιβάλλον	11
Σχήμα 1.5: Αρχή της αποδόμησης	14
Σχήμα 1.5: Χημική δομή ραμνολιπιδίων	22
Σχήμα 1.6: Χημική δομή σοφορολιπιδίων	23
Σχήμα 2.1: Συλλογή δείγματος θαλασσινού νερού.	27
Σχήμα 2.2: Ρεσπιρομετρική μέθοδος μέτρησης βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου.	28
Σχήμα 2.3: Διαλυμένο οξυγόνο συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε διαφορετικές πιέσεις	29
Σχήμα 2.4: Πειραματική διάταξη για την απλή χρωματογραφία στήλης (αριστερά) και για υψηλής πίεσης χρωματογραφία στήλης (δεξιά).	46
Σχήμα 2.5: Πειραματική διάταξη της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας	48
Σχήμα 3.1: Σημεία δειγματοληψίας στον κόλπο της Ελευσίνας	53
Σχήμα 3.2: Σημεία δειγματοληψίας στον κόλπο Κερί.	58
Σχήμα 4.1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροβιακής κοινότητας που απομονώθηκε από το δείγμα Ε8. Τα κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, ενώ τα ανοιχτά στις μετρούμενες αποικίες	65
Σχήμα 4.2: Καμπύλη ανάπτυξης των μικροβιακών δειγμάτων που απομονώθηκαν από τον κόλπο της Ελευσίνας.	66
Σχήμα 4.3: Καμπύλη ανάπτυξης των μικροβιακών δειγμάτων που απομονώθηκαν από την Ζάκυνθο.	67
Σχήμα 4.4: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών δειγμάτων από τον κόλπο της Ελευσίνας πριν και μετά την απομόνωση	68
Σχήμα 4.5: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών δειγμάτων από την Ζάκυνθο πριν και μετά την απομόνωση.	69
Σχήμα 4.6: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της Ζακύνθου (αριστερά) και της Ελευσίνας (δεξιά – πάν και κάτω) μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στη θέση 6 (αριστερά) και 7 (δεξιά) έχει φορτωθεί ο ιχνηθέτης 100bp plus και 1 Mbp (αντίστοιχα)	71
Σχήμα 4.7: Φυλογενετικό δένδρο του απομονωμένου δείγματος Ε1.	72
Σχήμα 4.8: Φυλογενετικό δένδρο του απομονωμένου δείγματος Ε2	73
Σχήμα 4.9: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Ε3.	74

Σχήμα 4.10: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E4.	75
Σχήμα 4.11: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E5.	76
Σχήμα 4.12: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E6.	77
Σχήμα 4.13: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E7	78
Σχήμα 4.14: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E8	79
Σχήμα 4.15: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E9	80
Σχήμα 4.16: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος EB8	81
Σχήμα 4.17: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος EB9	82
Σχήμα 4.18: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z1	83
Σχήμα 4.19: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z2	84
Σχήμα 4.20: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z3	85
Σχήμα 4.21: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z4	86
Σχήμα 4.22: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z5	87
Σχήμα 4.23: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z6	88
Σχήμα 4.24: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZBΗ	89
Σχήμα 4.25: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB2	90
Σχήμα 4.26: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB3	91
Σχήμα 4.27: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB4	92
Σχήμα 4.28: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB5	93
Σχήμα 4.29: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB6	94
Σχήμα 5.1: Μικροβιακή ανάπτυξη των τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων βιοαποικοδόμησης που πραγματοποιήθηκαν συναρτήσει του χρόνου	102
Σχήμα 5.2: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα απουσία μικροβιακής κοινότητας, με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 0,5% w/v, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνι	104
Σχήμα 5.3: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα απουσία μικροβιακής κοινότητας, με πηγή άνθρακα μαζούτ 0,5% συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο	105
Σχήμα 5.4: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο	106
Σχήμα 5.5: Συγκέντρωση αλκανίων κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη	107

ως προς το χοπάνιο

Σχήμα 5.6: Συγκέντρωσεις αλκανίων κατά το πείραμα με μαζούτ και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 108

Σχήμα 5.7: Συγκέντρωση αλκανίων κατά το πείραμα με μαζούτ, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 109

Σχήμα 5.8: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο απουσία μικροβιακού φορτίου, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 111

Σχήμα 5.9: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ απουσία μικροβιακού φορτίου, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 112

Σχήμα 5.10: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 112

Σχήμα 5.11: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1 συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο. 113

Σχήμα 5.12: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 114

Σχήμα 5.13: Βιοαποικοδόμηση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο 115

Σχήμα 6.1: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας EB8, στους 20° C, σε θρεπτικό μέσο ONR7a, με επιπλέον θρεπτικά N,P και με πηγή άνθρακα, 0,5% w/v αργό πετρέλαιο. Τα ανοιχτά σύμβολα αντιστοιχούν στην οπτική πυκνότητα των δειγμάτων, ενώ τα κλειστά αντιστοιχούν στις μετρούμενες αποικίες κατά τη μέθοδο της επίστρωσης των τρυβλίων 120

Σχήμα 6.2: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας EB8, σε όλες τις συνθήκες των πειραμάτων 121

Σχήμα 6.3: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τα ραμνολιπίδια στην αριστερή φωτογραφία και για τα σοφορολιπίδια στην δεξιά 122

Σχήμα 6.4: Φασματοφωτομετρικό προφίλ των λυοφιλοποιημένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που απομονώθηκαν 124

Σχήμα 6.5: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων 126

Σχήμα 6.6: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας, από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές θρεπτικών 127

Σχήμα 6.7: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, από την 130

βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων

Σχήμα 6.8: Παραγωγή των σοφορολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες θρεπτικών

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Κυριότερες αιτίες ρύπανσης της θάλασσας	3
Πίνακας 1.2: Θαλάσσια γλυκολιπίδια και άλλοι τύποι βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	25
Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.	39
Πίνακας 3.1: Χημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων του θαλασσινού νερού.	54
Πίνακας 3.2: Μικροβιολογικοί δείκτες μόλυνσης των υδάτων για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	54
Πίνακας 3.3: Οδηγία Ευρωπαϊκής Ένωσης 2006/7/EC περί μικροβιολογικής ποιότητας υδάτων κολύμβησης	55
Πίνακας 3.4: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού	55
Πίνακας 3.5: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	56
Πίνακας 3.6: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	57
Πίνακας 3.7: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	57
Πίνακας 3.8: Χημικά χαρακτηριστικά δειγμάτων θαλασσινού νερού.	59
Πίνακας 3.9: Μικροβιολογικοί δείκτες μόλυνσης των υδάτων για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	59
Πίνακας 3.10: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	60
Πίνακας 3.11: Χημικές αναλύσεις δειγμάτων θαλασσινού νερού.	61
Πίνακας 3.12: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	61
Πίνακας 3.13: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.	62
Πίνακας 4.1: Φυλογενετική ανάλυση για τα απομονωμένα δείγματα από την Ελευσίνα	96
Πίνακας 4.2: Φυλογενετική ανάλυση για τα απομονωμένα δείγματα της Ζακύνθου	98
Πίνακας 5.2: Εκατοστιαία βιοαποικοδόμηση των αλκανίων για τα τέσσερα πειράματα που έλαβαν χώρα	110
Πίνακας 5.3: Εκατοστιαία βιοαποικοδόμηση των αρωματικών για τα τέσσερα πειράματα που έλαβαν χώρα	115
Πίνακας 5.4: Ειδικός ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος (μ) και ο ειδικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης (q_s) για κάποια συστατικά του πετρελαίο	116
Πίνακας 6.1: Πειραματικές συνθήκες για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	118
Πίνακας 6.2: Παραγωγή ραμνολιπιδίων από την βακτηριακή κονότητα E8, στις συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, για χρονικό διάστημα 5 ημερών	128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Τα τελευταία χρόνια η ρύπανση του περιβάλλοντος εξαιτίας της μεγάλης τεχνολογικής προόδου και της ραγδαίας βιομηχανικής ανάπτυξης, έχει πάρει επικίνδυνες και σε πολλές περιπτώσεις καταστροφικές διαστάσεις για τον πλανήτη μας. Συγκεκριμένα, η ρύπανση του περιβάλλοντος οφείλεται σε ανόργανες ουσίες, όπως τα βαρέα μέταλλα και τοξικές οργανικές ενώσεις και μπορεί να προκύψει με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, βιομηχανικά απόβλητα που περιέχουν φαινολικά συστατικά μπορούν να ρυπάνουν ποτάμια, λίμνες και ιζήματα και είναι δύσκολο να απομακρυνθούν με τις συμβατικές μεθόδους. Πετρελαιοειδή προϊόντα που προέρχονται από εργοστάσια επεξεργασίας αερίων και ξύλου μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση του εδαφούς και των υπογείων νερών, ατυχήματα με πετρέλαιο ρυπαίνουν τόσο τα θαλάσσια, όσο και τα χερσαία οικοσυστήματα, καθώς και η αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων συμβάλλει στη ρύπανση του περιβάλλοντος. Η θάλασσα, είτε με τη μορφή των ωκεανών, είτε με τη μορφή κλειστών θαλασσών όπως η Μεσόγειος, παίζει καθοριστικό ρόλο στη ζωή και την ανάπτυξη του πλανήτη μας. Στην ύπαρξη της θάλασσας (μέσω του φυτοπλαγκτόν) οφείλεται το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής οξυγόνου της ατμόσφαιρας, η θερμική ισορροπία του πλανήτη, η παραγωγή «καθαρής τροφής», η ναυτιλία [1].

Το νερό ως χημική ένωση, παρουσιάζει κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες το καθιστούν μοναδικό για τη δημιουργία και διατήρηση της ζωής στη γη. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη θερμοχωρητικότητα (της τάξης του $4.2\text{kJ}/(\text{kg}^\circ\text{C})$ σε ατμοσφαιρική πίεση), με αποτέλεσμα να εξομαλύνει τις μεγάλες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδική θερμότητα τήξης (330.5 kJ/kg σε ατμοσφαιρική πίεση), με αποτέλεσμα τη θερμική αντίσταση του στη διαδικασία της πήξης. Έχει μεγάλη ειδική θερμότητα εξάτμισης (2260kJ/kg σε ατμοσφαιρική πίεση), η οποία αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα στη μεταφορά νερού από και προς την ατμόσφαιρα. Άλλο ένα χαρακτηριστικό του νερού είναι η εμφάνιση της μέγιστης πυκνότητας σε θερμοκρασία ανώτερη του σημείου πήξης,

πράγμα το οποίο επιτρέπει τη διατήρηση της ζωής ακόμα και σε πολύ ψυχρές θερμοκρασίες. Να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία μέγιστης πυκνότητας του θαλασσινού νερού εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αλάτων και μειώνεται με την αύξησή της συγκέντρωσης τους. Εάν δε η συγκέντρωση των αλάτων ξεπεράσει το 2.74% το σημείο μέγιστης πυκνότητας του θαλασσινού νερού εξαφανίζεται. Ακόμα, έχει μεγάλη επιφανειακή τάση, ιδιότητα που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων, όπως και μεγάλη διαλυτική ικανότητα, ιδιότητα η οποία επιτρέπει την παρουσία σε διάλυση ή σε κολλοειδή μορφή πολλών στοιχείων, ανόργανων και οργανικών ουσιών. Τέλος, έχει μεγάλη διηλεκτρική σταθερά, με αποτέλεσμα την πλήρη διάσπαση των ιόντων, χημική ουδετερότητα και σχετικά μεγάλη διαπερατότητα στο φως [2].

Οι ιδιότητες του θαλασσινού νερού είναι παρόμοιες με εκείνες του νερού. Από άποψη θερμοκρασίας, λόγω της υψηλής θερμοχωρητικότητας του νερού, οι θάλασσες παρουσιάζουν (κυρίως στα επιφανειακά στρώματα) διακυμάνσεις, που όμως είναι πολύ μικρότερες από τις αντίστοιχες στο έδαφος. Ειδικότερα στους ωκεανούς, κάτω από το επιφανειακό στρώμα κυμαινόμενης θερμοκρασίας και πάνω από τα κατωτέρα ψυχρά στρώματα, υπάρχει μια στοιβάδα σταθερής θερμοκρασίας και πάχους εξαρτώμενου από το γεωγραφικό πλάτος και τη γεωμορφολογία της περιοχής που ονομάζεται θερμοκλίνη.

Η ρύπανση των θαλασσών και η υποβάθμιση των παράκτιων περιοχών είναι ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα του πλανήτη μας. Ιδιαίτερα σε κλειστές θάλασσες, όπως η Μεσόγειος, τμήμα της οποίας αποτελούν και οι Ελληνικές θάλασσες, η θαλάσσια ρύπανση είναι εντονότερη λόγω της περιορισμένης ανάμειξης των θαλάσσιων υδάτων με αυτά των ωκεανών.

Οι ανοικτές θάλασσες και κυρίως οι ωκεανοί θεωρούνται σχετικά καθαρές περιοχές, έχοντας σαν κύριες πηγές μόλυνσης τα πλοία που τις διασχίζουν, τις αποθέσεις ρυπαντικών φορτίων από την ατμόσφαιρα και τις υποθαλάσσιες πυρηνικές δοκιμές. Στα πλαίσια αυτά η επιβάρυνση των εν λόγω περιοχών χαρακτηρίζεται κατά κανόνα ως απλή μόλυνση, ενώ η σοβαρότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση καταγράφεται κατά μήκος των κύριων θαλάσσιων δρόμων, που χρησιμοποιούν τα πλοία ανά τον κόσμο, δίνοντας έμφαση στις αυξημένες συγκεντρώσεις των πετρελαιοειδών [3]. Οι κυριότερες αιτίες ρύπανσης των θαλασσών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Κυριότερες αιτίες ρύπανσης της θάλασσας[4].

ΑΙΤΙΕΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ	ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ
Μεταφορά επικίνδυνων φορτίων	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Υποθαλάσσιες πυρηνικές δοκιμές και εναπόθεση ραδιενεργών καταλοίπων	Ανοικτή θάλασσα
Διακίνηση πετρελαιοειδών	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Καθαρισμός πετρελαιοκηλίδων	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Τουριστική και εμπορική δραστηριότητα	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Εκβολή δικτύων αποχέτευσης και βιομηχανικών αποβλήτων	Παράκτιες περιοχές
Κατάληψη σημαντικών θαλασσιών εκτάσεων για άλλες δραστηριότητες	Παράκτιες περιοχές
Απόρριψη στερεών απορριμμάτων- καταλοίπων από βιομηχανική και κατασκευαστική δραστηριότητα	Παράκτιες περιοχές
Κατασκευαστική δραστηριότητα στη θάλασσα (tunnels, γέφυρες)	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Ιχθυοκαλλιέργειες-Υπερβολική αλιεία	Παράκτιες περιοχές
Θερμική μόλυνση	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες περιοχές
Εκμετάλλευση φυσικών πόρων (π.χ. άντληση πετρελαίου)	Ανοικτή θάλασσα
Από την ατμόσφαιρα-από φυσικά αίτια (π.χ. σεισμοί)	Ανοικτή θάλασσα

1.2. ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, καθημερινά διακινούνται περίπου 160,000,000 βαρέλια πετρελαίου από τα κύρια κέντρα παραγωγής (δηλαδή τις χώρες της τ. Σοβιετικής Ένωσης, τη Λατινική Αμερική και τη Μέση Ανατολή) προς τα σημαντικότερα βιομηχανικά κέντρα (δηλαδή τη Β. Αμερική, την Ευρώπη και την Ιαπωνία). Ένα σημαντικό ποσοστό του διακινούμενου πετρελαίου καταλήγει με διάφορους τρόπους (αφερματισμός, ατυχήματα, ναυάγια, πολεμικές επιχειρήσεις) στις θάλασσες και τους ωκεανούς, επιβαρύνοντας τα τοπικά οικοσυστήματα. Τα τελευταία είκοσι έτη έχουν καταγραφεί τουλάχιστον εβδομήντα μείζονα θαλάσσια ατυχήματα[5].



Σχήμα 1.1: Εικόνες από το ναυάγιο του δεξαμενοπλοίου PRESTIGE και τη ρύπανση που προκάλεσε στο θαλάσσιο/παράκτιο περιβάλλον [6].

Είναι ενδιαφέρον τα επισημανθεί στο σημείο αυτό, ότι παρά τη διαρκή αύξηση της κατανάλωσης πετρελαιοειδών, αναφέρεται μια αξιόλογη μείωση στον καταγεγραμμένο αριθμό σημαντικών πετρελαιοκηλίδων (με απόρριψη περισσότερων από 7 τόνους πετρελαίου) στο σύνολο του πλανήτη, καθώς, ενώ τη δεκαετία 1970-79 ο μέσος ετήσιος ρυθμός ήταν 24.1 απορρίψεις ανά έτος, τη δεκαετία 1980-89 μειώθηκε στο 8.8, ενώ τη δεκαετία 1990-99 σε 7.3 ατυχήματα ανά έτος. Τέλος, για την περίοδο 2000-2001, που αποτελούν και τα πλέον πρόσφατα έτη με επικυρωμένα αντίστοιχα στοιχεία, αναφέρεται μία μόνο διαρροή στη Γερμανία (250 tn) για το 2000 και τρεις ανάλογες διαρροές το 2001, με συνολική έγχυση 2628 τόνους πετρελαίου στη θάλασσα, εκ των οποίων η μεγαλύτερη εντοπίζεται στη

Δανία (2400 tn). Το 2002 καθοριστικές είναι οι επιπτώσεις που επιφέρει το ναυάγιο του "Prestige" (Σχήμα 1.1). Αντίστοιχα, από στοιχεία της UNEP για τη Μεσόγειο, εκτιμάται ότι περίπου 700,000 τόνοι πετρελαιοειδών απορρίπτονται ετησίως, εκ των οποίων ένα ποσοστό 10%-20% καταλήγει στις ελληνικές θάλασσες (κυρίως στο Αιγαίο), λόγω της κομβικής θέσης της χώρας μας [7]. Πιο συγκεκριμένα, στο χώρο του Αιγαίου διακινείται ετησίως ποσότητα αργού πετρελαίου μεγαλύτερη από 65 εκατομμύρια τόνους (κυρίως από τη Μαύρη Θάλασσα), η οποία επιβαρύνει σε ποσοστό 0.01-0.06% τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Παράλληλα, το Αιγαίο επιβαρύνεται από 10,000 τόνους ετησίως από αστικές απορροές, 3,000 τόνους από βιομηχανικές δραστηριότητες και 2,000 έως 4,000 τόνους από ατυχήματα και καθημερινές απορρίψεις πλοίων. Με βάση πρόσφατες μετρήσεις διεθνών οργανισμών, οι συγκεντρώσεις πετρελαιοειδών σε ορισμένες ελληνικές θάλασσες εκτιμώνται σε 5-10 $\mu\text{g/l}$, ενώ επιλεγμένες περιοχές του Αιγαίου κοντά σε βιομηχανικά και αστικά κέντρα (π.χ. Ελευσίνα, Καβάλα, Θερμαϊκός) κατατάσσονται ανάμεσα στις πλέον περιβαλλοντικά υποβαθμισμένες περιοχές του κόσμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεντρώσεις πετρελαιοειδών του επιπέδου των 0.2 $\mu\text{g/l}$ στη θάλασσα προκαλούν βλάβες στους ευαίσθητους θαλάσσιους οργανισμούς, ενώ συγκεντρώσεις της τάξεως των 0.1 g/l καταστρέφουν τους βενθικούς οργανισμούς (το σύνολο των ζωικών ή φυτικών οργανισμών που ζουν προσκολλημένοι ή έρποντες στο βυθό της θάλασσας). Συμπερασματικά, η ρύπανση από πετρελαιοειδή στις ελληνικές θάλασσες βρίσκεται σε οριακό σημείο, ενώ ο κίνδυνος διατάραξης της ισορροπίας των θαλάσσιων οικοσυστημάτων είναι υπαρκτός. Παράλληλα δεν πρέπει να λησμονηθεί ότι η επιβάρυνση των θαλασσών με πετρελαιοειδή είναι ένα φαινόμενο των τελευταίων δεκαετιών, καθώς ποτέ στο παρελθόν τα θαλάσσια οικοσυστήματα δεν δέχθηκαν ανάλογες ποσότητες πετρελαίου [4].

1.3. ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ

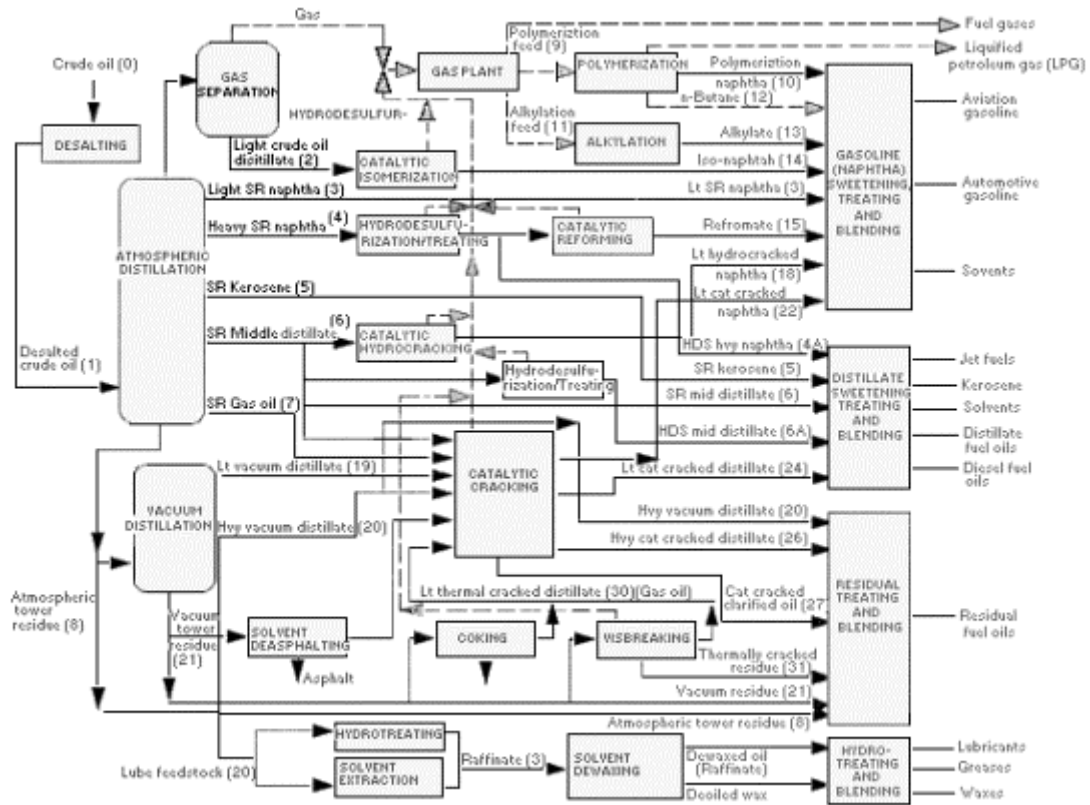
Η λέξη «πετρέλαιο» προέρχεται από την ελληνική λέξη πέτρα και τη λατινική *oleum*, που σημαίνει λάδι. Το πετρέλαιο, όπως αποδείχθηκε από ανασκαφές, χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα, είτε για την κατασκευή δρόμων,

καλαφάτισμα πλοίων, είτε ως συγκολλητικό μέσο. Μέχρι τις αρχές του 19^{ου} αιώνα αιώνα η χρήση του πετρελαίου βρισκόταν στο ίδιο επίπεδο που το είχαν αφήσει η αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι. Η πρώτη γεώτρηση ειδικά για την αναζήτηση πετρελαίου έγινε το 1859 από τον Έντγουιν Ντρέικ στη δυτική Πενσυλβανία σε βάθος 21 μέτρων. Την ίδια περίοδο, πετρελαϊκά πεδία ανακαλύφθηκαν στην Ευρώπη και την Άπω Ανατολή. Στον 20^ο αιώνα, κατά τη Βιομηχανική Επανάσταση που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση του αυτοκινήτου, η πετρελαϊκή βιομηχανία έγινε η πρώτη πηγή ενέργειας στον κόσμο.

Σήμερα, το πετρέλαιο αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη στη βιομηχανία των πετροχημικών, αλλά τη μεγαλύτερη εφαρμογή βρίσκει στην παραγωγή ενέργειας, από την οποία εξαρτάται το παρόν και το μέλλον της παγκόσμιας οικονομίας.

Το πετρέλαιο είναι υγρό ελαιώδες ή παχύρρευστο, με καστανό χρώμα, χαρακτηριστική οσμή, πυκνότητα που κυμαίνεται από 0,8-0,9, αδιάλυτο στο νερό, εύφλεκτο και με τη στερεοποίηση του σχηματίζεται άσφαλτος. Η απόσταξη του λαμβάνει χώρα από 40^ο-360^οC και δίνει μία σειρά προϊόντων όπως φαίνεται και στο διάγραμμα ροής παρακάτω (Σχήμα 1.2)[7].

Ο τρόπος ανάκτησης του είναι οι γεωτρήσεις, είτε από τη γη, είτε από τη θάλασσα. Η επεξεργασία του πραγματοποιείται είτε στο σημείο ανάκτησης του, είτε μεταφέρεται με μεγάλους αγωγούς ή ειδικά πλοία στα διωλιστήρια, και με τον ίδιο τρόπο μεταφέρεται σε σταθμούς προς κατανάλωση. Ατυχήματα κατά την παραγωγή, την μεταφορά, την αποθήκευση και την χρήση του παγκοσμίως, σκόπιμη απόρριψη αποβλήτων κατά την επεξεργασία του, οι δαπανηρές μέθοδοι επεξεργασίας και διάθεσης, καθιστούν το πετρέλαιο και τα προϊόντα του, ένα από τους μεγαλύτερους ρυπαντές του περιβάλλοντος σε θάλασσα, έδαφος και υπόγεια νερά [8, 9, 11]. Γενικά, η ρύπανση του περιβάλλοντος με πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες έχει δημιουργήσει τεράστιο οικολογικό πρόβλημα, με δυσάρεστες συνέπειες τόσο στο περιβάλλον όσο και στον άνθρωπο [12].



Σχήμα 1.2: Διάγραμμα ροής αποστάξης αργού πετρελαίου[10].

Το πετρέλαιο αποτελεί ένα πολύπλοκο μείγμα υδρογονανθράκων και συνίσταται από δύο κυρίως κλάσματα, το κορεσμένο (η-αλκάνια, διακλαδισμένα αλκάνια και κυκλοαλκάνια) και το αρωματικό (μονο-, δι- και πολυ- αρωματικοί υδρογονάνθρακες) [13-15]. Το πετρέλαιο ποικίλει στη σύσταση του και στις φυσικές του ιδιότητες [16]. Μία τυπική σύσταση αργού πετρελαίου (crude oil) περιλαμβάνει 80% αλκάνια, 15% αρωματικά και 5% ασφαλτένια. Οι βιολογικές μέθοδοι απομάκρυνσης πετρελαίου από το περιβάλλον, όπως η βιοαποδόμηση, εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των φυσικοχημικών μεθόδων. Χαρακτηρίζονται από αποτελεσματικότητα, έχουν χαμηλό κόστος, και εφαρμόζονται επι τόπου (in-situ).

1.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΣΗΣ

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές εξυγίανσης του περιβάλλοντος και διαφοροποιούνται ανάλογα με την εφαρμογή τους σε έδαφος, σε ιζήματα, σε υπόγεια ή επιφανειακά νερά. Ακόμα, ο διαχωρισμός των ρύπων εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες τους, στον μηχανισμό της τεχνικής απορρύπανσης, ή ακόμα και στις επιστημονικές αρχές πάνω στις οποίες βασίζεται κάθε μέθοδος. Έτσι, προκύπτει ο διαχωρισμός των τεχνικών απορρύπανσης σε βιολογικές, χημικές, φυσικές, θερμικές και σε μεθόδους στερεοποίησης/ σταθεροποίησης. Επίσης, μία τεχνική απορρύπανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επί τόπου (in situ), ή προηγείται απομάκρυνση του ρυπασμένου τμήματος και μεταφορά του σε ειδικά διαμορφωμένη τοποθεσία για επεξεργασία.

Συγκεκριμένα, η καλύτερη στρατηγική για την αντιμετώπιση της ρύπανσης που δημιουργείται από τις πετρελαιοκηλίδες, είναι αυτή της πρόληψης. Υποθέτοντας ότι η στρατηγική αυτή δεν έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να περιορίσουμε τη ρύπανση και να μειώσουμε τις ζημιές στο περιβάλλον. Έτσι, οι ενέργειες καθαρισμού από το πετρέλαιο μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες φάσεις: στις ενέργειες απορρύπανσης στη θάλασσα και στις ενέργειες απορρύπανσης των ακτών, αν αυτές προσβληθούν από ρύπο [4].

- **Μηχανικός καθαρισμός**

Ο μηχανικός καθαρισμός στηρίζονται στη συγκέντρωση και την ανάκτηση του πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας. Είναι γενικά διαδεδομένη τεχνική στην πρώτη φάση μιας αντιρρυπαντικής επιχείρησης καθαρισμού.

Σε αυτή τη μέθοδο ανήκουν τα φράγματα, τα οποία έχουν συγκεκριμένη δομή (τύπου φρακτού, κουρτίνας) και υλικά κατασκευής (απο εύκαμπτα έως δύσκαμπτα) ανάλογα με τη ρύπανση (Σχήμα 1.3).

Ο τύπος του φράγματος που θα επιλεγεί και ο τρόπος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι :

- Η θέση και το μέγεθος της κηλίδας
- Η κίνησή της

- Μετεωρολογικές συνθήκες
- Υδρολογικές συνθήκες
- Μορφολογία ξηράς και σχήμα υδάτινης μάζας
- Προτεραιότητες όσον αφορά την προστασία

Ένας ακόμα διαδεδομένος τρόπος μηχανικού καθαρισμού είναι οι πετρελαιοσυλλέκτες (skimmers). Στους πετρελαιοσυλλέκτες ανήκουν οι μηχανικοί πετρελαιοσυλλέκτες, οι οποίοι κάνουν το διαχωρισμό βάσει των ιδιοτήτων των πετρελαίων και των μιγμάτων πετρελαίου/νερού, καθώς και στη διαφορά πυκνότητας μεταξύ ρύπου και του νερού και οι ελαιοφιλοι πετροσυλλέκτες, οι οποίοι βασίζονται στα χαρακτηριστικά ορισμένων υλικών που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια στο πετρέλαιο παρά στο νερό. Τα υλικά είναι γνωστά ως ελαιοφιλα.



Σχήμα 1.3: Περισυλλογή πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας μέσω boom, τα οποία αποτελούν πλωτά φράγματα [17].

Ένα ακόμα παράδειγμα μηχανικού καθαρισμού των πετρελαιοκηλίδων από τη θάλασσα αποτελούν τα σκάφη περισυλλογής (skimmer vessels), τα οποία είναι

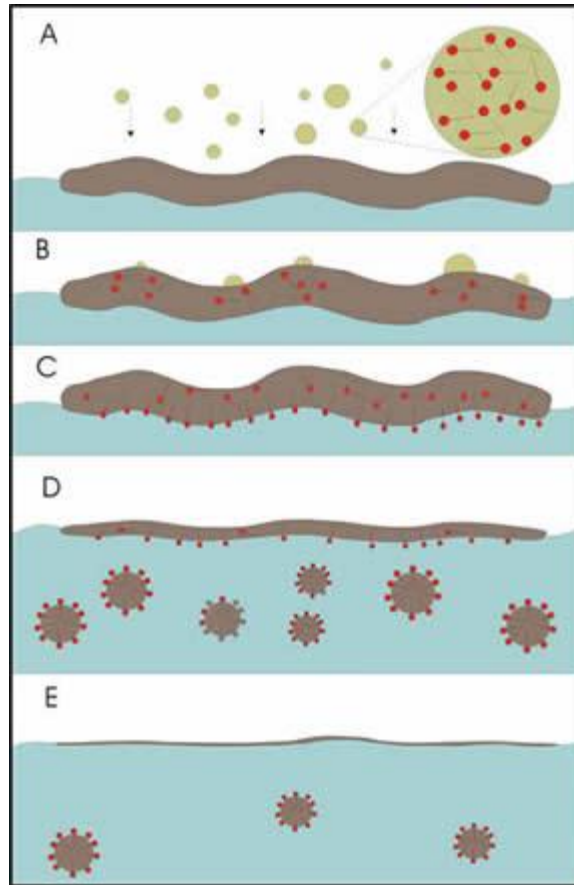
σκάφη ειδικού τύπου που έχουν προσαρμοσμένη με ειδική σχεδίαση κάποιο τύπο συσκευής περισυλλογής και χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του επιφανειακού στρώματος του ρύπου από τη θάλασσα.

Τέλος, σε αυτή την κατηγορία απορρύπανσης της θάλασσας ανήκουν κάποια απορροφητικά υλικά (sorbent materials). Τα απορροφητικά υλικά διαθέτουν απορροφητικές ή προσκολλητικές ιδιότητες μέσω των οποίων πραγματοποιείται η περισυλλογή ρευστών. Αυτά τα υλικά είναι ειδικά σχεδιασμένα για να περισυλλέγουν πετρέλαιο από την επιφάνεια του νερού. Βασικά χαρακτηριστικά για τη χρήση των υλικών αυτών είναι να διαθέτουν μεγάλη απορροφητική ικανότητα, να είναι αβύθιστα, να έχουν καλές ελαιοφιλικές ιδιότητες και να χαρακτηρίζονται από επαρκή αντοχή για να συγκρατούν το πετρέλαιο.

- **Χημικός καθαρισμός**

Σε πολλές περιπτώσεις ο συνδυασμός μηχανικών και χημικών μέσων είναι πολύ χρήσιμος κατά τη διάρκεια των επιχειρήσεων απορρύπανσης. Παρόλο που τα μηχανικά μέσα είναι πολύ πιο αποτελεσματικά είναι πιθανό να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν λόγω των καιρικών συνθηκών. Τα χημικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στις περιπτώσεις εκείνες για να καταστήσουν ευκολότερη την ανάκτηση του ρύπου με μηχανικά μέσα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας απορρύπανσης αποτελούν τα χημικά μέσα διασποράς (dispersants). Τα μέσα διασποράς είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από επιφανειοδραστικές ουσίες σε συνδυασμό με τον κατάλληλο διαλύτη, οι οποίες συντελούν στην διάσπαση της ελαιώδους φάσης σε σταγονίδια. Τα μέσα διασποράς απομακρύνουν την ελαιώδη φάση από τον υδάτινο όγκο, μέσω της ενίσχυσης της χημικής διάσπασης της ελαιώδους φάσης (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Αρχή λειτουργίας των μέσων διασποράς, σε περίπτωση πετρελαιοκηλίδας στο θαλάσσιο περιβάλλον. Α) Τα μέσα διασποράς (που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες) ψεκάζονται στην πετρελαιοκηλίδα, Β) Ο διαλύτης μεταφέρει την επιφανειοδραστική ουσία στην ελαιώδη φάση, Γ) Τα μόρια της επιφανειοδραστικής ουσίας μεταφέρονται στην διεπιφάνειο πετρέλαιο/νερό, Δ) Τα σταγονίδια του πετρελαίου απομακρύνονται από την πετρελαιοκηλίδα, Ε) Τα σταγονίδια διασπείρονται στον υδάτινο όγκο [18].

Εκτός από τα μέσα διασποράς, για τον καθαρισμό της θάλασσας χρησιμοποιούνται και διάφορα άλλα χημικά προϊόντα, όπως είναι τα μέσα καταβύθισης (sinking agents), πτητικά μέσα - στερεοποιητές (viscoelastic additives), απογαλακτοποιητές (emulsion breakers) και βιολογικά μέσα (bioremediation chemicals).

- **Φυσική αποικοδόμηση (Natural degradation)**

Η τακτική αυτή δεν χρησιμοποιείται συχνά και συνίσταται μόνο στην παρακολούθηση της κίνησης της κηλίδας. Συνήθως εφαρμόζεται στις περιπτώσεις

εκείνες όπου πετρέλαιο και συνηθέστερα ελαφριά κλάσματα διαρρέουν στην ανοικτή θάλασσα, μακριά από ακτές και σε καταστάσεις θαλασσοταραχής.

- **Εναλλακτικές Μέθοδοι**

Υπάρχουν τεχνικές που μελετούνται και προωθούνται τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτικές ή συμπληρωματικές παρεμβάσεις στην απορρύπανση. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι η Βιοαποικοδόμηση (Bioremediation) και η μέθοδος της Επί Τόπου Καύσης (In –Situ Burning).

ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ ΚΑΥΣΗ

Ο όρος χαρακτηρίζει τη διαδικασία της καύσης κηλίδων πετρελαίου στην θάλασσα, ή κοντά στο σημείο διαρροής του ρύπου. Η καύση είναι μια μέθοδος η οποία έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει μεγάλες ποσότητες πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας. Πρακτικά προβλήματα όμως περιορίζουν τις δυνατότητες της χρήσης της μεθόδου αυτής. Τέτοια προβλήματα είναι η ανάφλεξη, η διατήρηση της καύσης, οι μεγάλες ποσότητες καπνού στην ατμόσφαιρα, η δημιουργία και πιθανή βύθιση εξαιρετικά παχύρρευστων υπολειμμάτων και λόγοι ασφαλείας [20].

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Η βιοαποικοδόμηση είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο διαδικασιών (προσθήκη ουσιών), που χρησιμοποιούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να αυξήσουν τους ρυθμούς της φυσικής αποικοδόμησης του πετρελαίου. Μια από τις σημαντικότερες μακροχρόνιες φυσικές διαδικασίες για την αφαίρεση του πετρελαίου από το θαλάσσιο περιβάλλον, είναι η αποικοδόμησή του από φυσικούς μικροοργανισμούς.

Στη θάλασσα, για την καταπολέμηση πετρελαιοκηλίδων, η χρησιμότητα της μεθόδου εξακολουθεί να μην είναι καθορισμένη. Στην ξηρά η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται σε κλειστά ή προστατευόμενα περιβάλλοντα. Επίσης σε ακτές όπου είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν μηχανικά ή άλλα μέσα, όπως σε ευαίσθητα οικοσυστήματα η

βιοαποικοδόμηση μπορεί να θεωρηθεί ως η μοναδική πιθανή επέμβαση καθαρισμού [21].

1.5. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

Σύμφωνα με τον όρο **Βιοαποικοδόμηση**, οργανικές ενώσεις που θεωρούνται ρυπογόνες μετατρέπονται από μικροοργανισμούς σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και στη συνέχεια σε CO_2 κατά την αερόβια αποδόμηση, ή σε CH_4 κατά την αναερόβια αποδόμηση, με παράλληλη αύξηση της κυτταρικής βιομάζας [18-25]. Διακρίνεται σε:

- Αρχική (primary): Κάθε βιολογική επαγόμενη αλλαγή στη δομή της ένωσης που αλλάζει τη μοριακή της ακεραιότητα
- Τελική (ultimate): Βιολογική μετατροπή μίας οργανικής ένωσης σε ανόργανες ενώσεις και προϊόντα που σχετίζονται με μεταβολικές πορείες
- Αποδεκτή (acceptable): Βιολογική αποδόμηση μιας ένωσης σε τέτοιο βαθμό, ώστε η τοξικότητα ή κάποιο άλλο ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό της ένωσης να απαλειφθεί [26-27]

Οι αντιδράσεις που συμμετέχουν στη βιοαποδόμηση μπορούν να χαρακτηριστούν ως αντιδράσεις οξειδωτικές, αναγωγικές, υδρολυτικές, ή συζευκτικές [26]. Η βιοαποδόμηση των περισσότερων οργανικών ενώσεων επιτυγχάνεται υπό αερόβιες συνθήκες, όπου το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Στις αναερόβιες συνθήκες ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται τα ιόντα NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{3+} .

Εκτός από βακτήρια, έχει βρεθεί ότι και οι μύκητες και τα φύκη διαθέτουν την ικανότητα αποδόμησης.

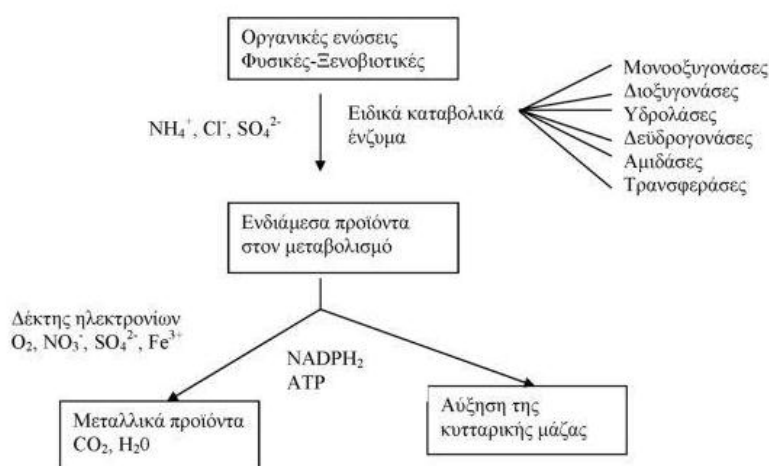
Η μικροβιακή αποδόμηση ξеноβιοτικών ουσιών θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον. Το είδος των ουσιών ποικίλει από υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) [28].

Η βιοαποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μία πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με το μικροοργανισμό-αποικοδομητή. Το μονοπάτι βιοαποδόμησης κάθε ουσίας εξαρτάται σε μεγάλο

βαθμό από το ενζυματικό σύστημα το οποίο καταλύει τις συγκεκριμένες αντιδράσεις.

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ουσίες ως υποστρώματα ανάπτυξης τους. Κάποιες φορές παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη θέση διάσπασης του μορίου της χημικής ένωσης, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν ενώσεις διαφόρων κατηγοριών.

Γενικά, η αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η αποδόμηση φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 1.5: Αρχή της αποδόμησης [29].

Ακόμα, σημαντικό ρόλο κατά την αποδόμηση διάφορων ρυπογόνων ενώσεων παίζει ο συµμεταβολισμός (coometabolism), ο οποίος ορίζεται ως η αποδόμηση μίας ουσίας η οποία δεν αποτελεί πηγή άνθρακα ή ενέργειας για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, αλλά διασπάται κατά την αποδόμηση άλλων ενώσεων που αποτελούν πηγή άνθρακα του μικροοργανισμού [26,30].

Βιομετατροπή (biotransformation) είναι η χημική μεταβολή μιας οργανικής ή ανόργανης ένωσης από μικροοργανισμούς που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια κάποιων χαρακτηριστικών (κάποια χημική ομάδα), χωρίς ουσιαστική επίδραση στη μοριακή πολυπλοκότητα (μέγεθος) [31].

Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μικροοργανισμών, βακτηρίων, μυκήτων, φύκων. Το πιο γνωστό γένος βακτηρίων αποδόμησης πετρελαίου ανήκουν στην οικογένεια *Pseudomonas*, ενώ υπάρχουν αρκετές αναφορές για τα γένη *Bacillus*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Mycobacteria*. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αναφερθεί στη βιομετατροπή, βιοαποδόμηση και βιοεξυγίανση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων. Η απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν το πετρέλαιο και οι εφαρμογές τους για τη βιοεξυγίανση θαλασσών αποτέλεσε το κέντρο της μικροβιολογίας του πετρελαίου.

Το πετρέλαιο υπόκειται σε μεταβολές από τη στιγμή εισαγωγής του στο θαλάσσιο περιβάλλον. Οι κυριότερες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα είναι η φωτο-οξείδωση, οι διάφορες φυσικοχημικές μετατροπές και η βιοαποικοδόμηση από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς [32-33]. Τόσο οι ευκαρυωτικοί, όσο και οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα να οξειδώνουν ενζυματικά τους υδρογονάνθρακες. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων έχουν αναγνωριστεί είδη θαλάσσιων βακτηρίων, ειδικευόμενα στη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων [33-34]. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι τέτοια υδρογονανθρακοκλαστικά βακτήρια (hydrocarbonoclastic bacteria, HCB) είναι παρόντα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε μη ρυπασμένα ύδατα, ενώ οι συγκεντρώσεις του είναι υψηλές σε βεβαρημένα σε πετρελαϊκούς ρύπους ύδατα [34]. Η μοριακή ανάλυση των γονιδίων 16s rRNA των HCBs αποκάλυψε ότι ανήκουν στα gamma-Proteobacteria και εκπροσωπούνται από γένη όπως αυτά του *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*. Από τα γένη αυτά, το *Cycloclasticus spp.* φαίνεται να ειδικεύεται στην αποικοδόμηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, ΠΑΥ, ενώ το *Alcanivorax spp.* στην αποικοδόμηση αλκανίων.

Η διαδικασία της αποικοδόμησης έχει μελετηθεί εκτενώς σε εργαστηριακούς μικροκόσμους όπου χρησιμοποιούνται ύδατα προερχόμενα από διαφορετικά θαλάσσια οικοσυστήματα από όλο τον κόσμο. Παρότι πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει τη σχέση μεταξύ βακτηριακών κοινοτήτων και της αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων, ελάχιστες έχουν εστιάσει στα Ελληνικά θαλάσσια οικοσυστήματα.

1.6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

Η αποδόμηση μίας ένωσης εξαρτάται τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες [35]. Εξαρτάται από τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να αποδομήσουν το συγκεκριμένο υπόστρωμα, από τις περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την έκφραση των ενζύμων τους, από το υπόστρωμα και την επαφή μικροοργανισμών-υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της βιοαποδόμησης μιας ένωσης είναι

- Περιβαλλοντικοί: ιστορικό ρύπανσης, σύσταση, pH, θερμοκρασία, αλατότητα, θρεπτικά συστατικά (ανόργανα συστατικά, πηγή άνθρακα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες), άλλες τοξικές ουσίες.
- Παράγοντες που σχετίζονται με το υπόστρωμα: φυσικοχημικές ιδιότητες, συγκέντρωση, βιοδιαθεσιμότητα, κατανομή, τοξικότητα.
- Παράγοντες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς: σύσταση μεταξύ των πληθυσμών, επιδράσεις μεταξύ όμοιων-διαφορετικών πληθυσμών, κατανομή των μικροοργανισμών, ενζυμική δραστηριότητα [36-38].

Αρχικά, πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι να μπορούν αφενός να χρησιμοποιήσουν τις εκάστοτε οργανικές ρυπογόνες ενώσεις ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την παραγωγή βιομάζας (αύξηση και πολλαπλασιασμό) και το σχηματισμό CO₂ [39-42] και αφετέρου να μπορούν να εκφράσουν τα κατάλληλα ένζυμα [43-44]. Ο μικροβιακός πληθυσμός επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον ρυπαντή [45-46].

Η αποδόμηση λαμβάνει χώρα σε ευνοϊκές συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αερισμού [47-48]. Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στη φύση και στην έκταση της βιοαποδόμησης, καθώς από αυτήν εξαρτάται η βιοδιαθεσιμότητα και η διαλυτότητα του ρυπαντή, όπως και η ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας. Ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών (ψυχρόφιλοι, μεσόφιλοι ή θερμόφιλοι) έχουμε και το βέλτιστο ρυθμό αποδόμησης.

Έχει αναφερθεί ότι η βιοαποδόμηση διενεργείται ταχύτερα σε ουδέτερες ή κοντά σε ουδέτερες τιμές pH [49-51].

Ένας ακόμα πολύ σημαντικός παράγοντας της διεργασίας της βιοαποδόμησης αποτελεί ο αερισμός της, καθώς το οξυγόνο αποτελεί τον δεκτή ηλεκτρονίων στην αερόβια αποδόμηση [50-51].

Η μικροβιακή αποδόμηση επηρεάζεται από την ύπαρξη των θρεπτικών υλικών (C, N, P). Οι απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά δεν είναι σταθερές, αλλά ποικίλλουν ανάλογα με το είδος των βακτηρίων, την πηγή άνθρακα που μεταβολίζεται και το περιβάλλον [52].

Γενικά, η βιοαποδόμηση εξαρτάται από τη δομή, την συγκέντρωση, την τοξικότητα, την φυσικοχημική κατάσταση, την κατανομή και γενικά τη βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου.

1.7. ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗ ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ (Enhanced bioremediation)

Η φυσική αποδόμηση (natural attenuation), ή αλλιώς φυσική αποκατάσταση (intrinsic remediation) πραγματοποιείται όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, υπάρχουν τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των κυττάρων και η κατάλληλοι μικροοργανισμοί. Ως φυσική αποκατάσταση ορίζεται η μείωση της τοξικότητας, της μάζας ή της κινητικότητας της ουσίας, απουσία ανθρώπινης παρέμβασης, η οποία οφείλεται τόσο σε φυσικές, όσο και σε βιολογικές μεθόδους [53-54]. Κατά την αυθόρμητη αποδόμηση γίνεται χρήση της ικανότητας αποδόμησης των αυτοχθόνων μικροοργανισμών [55-56]. Λόγω του μικρού πληθυσμού που συμμετέχει στην αποδόμηση, η αυθόρμητη αποδόμηση πραγματοποιείται αργά.

Για την ενίσχυση της φυσικής αποκατάστασης, δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται, η βιοενίσχυση (bioaugmentation) και η βιοδιέγερση (biostimulation). Η αποτελεσματικότητα των δύο αυτών μεθόδων εξαρτάται από την περιοχή και το είδος του ρύπου [55, 57, 58].

ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΣΗ (biostimulation)

Η βιοδιέγερση ουσιαστικά είναι η προσθήκη θρεπτικών συστατικών στους αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Αυτή η προσθήκη έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχή αποδόμηση του ρύπου. Όμως υπάρχουν αναφορές στις οποίες η βιοδιέγερση είχε μικρό ή και καθόλου αποτέλεσμα στη αποδόμηση. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και όχι μόνο όσων αποδομούν το ρύπο, στην κατανάλωση άλλων πηγών άνθρακα και όχι της ένωσης που ενδιαφέρει.

Οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε C, N και P είναι ανάλογες της σύστασης των κυττάρων τους στα αντίστοιχα συστατικά. Τα μακροθρεπτικά συστατικά συστατικά C, N και P αποτελούν το 50%, 14% και 3% αντίστοιχα του ξηρού βάρους ενός τυπικού μικροβιακού κυττάρου. Τα μικροστοιχεία S, Ca και Mg αποτελούν το 1%, 0,5% και 0,5%. Τα ιχνοστοιχεία βρίσκονται στην ελάχιστη ποσότητα και δεν είναι απαραίτητα σε όλους τους μικροοργανισμούς. Τα πιο κοινά ιχνοστοιχεία είναι τα Fe, Mn, Co, Cu και Zn [59]. Στηριζόμενοι σε αυτά, η μοριακή αναλογία C/N/P 100/10/1 χρησιμοποιείται γενικά, και προτείνεται στην αποδόμηση πετρελαίου. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στη μορφή με την οποία πρέπει να προστίθενται τα θρεπτικά συστατικά. Γενικά, ο ρυθμός αποδόμησης βελτιστοποιείται με μία συγκεκριμένη αναλογία θρεπτικών, που διαφέρει καθώς διαφορετικοί μικροοργανισμοί απαιτούν διαφορετικές αναλογίες.

ΒΙΟΕΝΙΣΧΥΣΗ (bioaugmentation)

Για τη διεργασία της βιοενίσχυσης, πραγματοποιείται εμβολιασμός μικροοργανισμών οι οποίοι αποδομούν την ένωση που ενδιαφέρει. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να έχουν απομονωθεί από την ίδια ρυπασμένη περιοχή και εμβολιάζονται εκ νέου σε αυτήν, ενδέχεται να έχουν απομονωθεί από διαφορετική περιοχή, ενώ θα μπορούσαν να είναι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί.

Παρά τις πολλές αναφορές που αποδεικνύουν την χρησιμότητα της βιοενίσχυσης, παραμένει αμφισβητήσιμη ως επιστημονική και τεχνολογική προσπάθεια. Η

επιτυχία της οφείλεται σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Η ταχεία μείωση και ο θάνατος του πληθυσμού των εξωτερικά προστιθέμενων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί σε εργαστηριακές συνθήκες, η απομόνωση και η αποθήκευση ενός στελέχους στο εργαστήριο είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ένα αποδυναμωμένο στέλεχος, το φαινόμενο της θήρευσης από τα πρωτόζωα, ο ανταγωνισμός τους με αυτόχθονες μικροοργανισμούς για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και αποδεκτών ηλεκτρονίων, η πρόσληψη άλλων πηγών άνθρακα εκτός του ρύπου, επηρεάζουν δραστικά το φαινόμενο της βιοενίσχυσης.

Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω τεχνικών, της βιοενίσχυσης και της βιοδιέγερσης, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την βιοαποδόμηση.

1.8. BIO-ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ (Biosurfactants)

Η χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών έχει προταθεί για την αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη βιοδιαθεσιμότητα των ρυπογόνων ενώσεων για τη βιοξυγάνση της θάλασσας. Οι επιφανειακά δραστικές ουσίες (surfactants) είναι οργανικά, αμφίφιλα μόρια και αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Το υδρόφιλο τμήμα κάνει τις επιφανειακά δραστικές ουσίες διαλυτές στο νερό και μέσω του υδρόφοβου τμήματός τους, συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες και μειώνουν την επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων [59-63].

Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι ο σχηματισμός μικυλίων, δηλαδή μικρών συσσωματωμάτων. Σε μικρές συγκεντρώσεις στα υδατικά διαλύματα βρίσκονται σε μορφή μονομερών. Πέρα από μία συγκεκριμένη συγκέντρωση, η οποία ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (CMC: critical micelle concentration), τα μονομερή ενώνονται σχηματίζοντας συσσωματώματα 20-200 μορίων. Η συγκέντρωση αυτή εξαρτάται από το είδος της ένωσης και τη θερμοκρασία [63].

Ανάλογα με τη φύση του υδρόφοβου τμήματος, οι επιφανειακές δραστικές ουσίες μπορούν να χωριστούν σε ανιονικές, κατιονικές, διονικές και μη ιονικές ουσίες. Τα

υδρόφιλα τμήματα συνήθως αποτελούνται από μία καρβοξυλική ή θειική ομάδα (ανιονικές), μία ομάδα τεταρτοταγούς αμμωνίου (κατιονική), πολυοξυαιθυλένιο, σακχαρόζη, ή ένα πολυπετίδιο (ουδέτερη) [60]. Οι επιφανειακά δραστικές ουσίες είναι κυρίως προϊόντα του πετρελαίου, παράγονται σε μεγάλη κλίμακα και έχουν πολλές εφαρμογές [59-61].

Οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες μπορούν να παραχθούν είτε συνθετικά, είτε βιολογικά. Μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών, βακτήρια, ζύμες, μύκητες μπορούν να παράξουν επιφανειακά δραστικές ουσίες. Τέτοια βακτήρια ανήκουν μεταξύ άλλων στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*. Οι βιολογικά επιφανειακά δραστικές ενώσεις (biosurfactants) έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τις επιφανειοδραστικές ενώσεις και οι περισσότερες από αυτές έχουν ανιονικό ή ουδέτερο χαρακτήρα. Ελάχιστες είναι κατιονικές και αποτελούνται κυρίως από αμινομάδες. Το υδρόφοβο τμήμα τους μπορεί να ανήκει σε λιπαρά οξέα με μεγάλη αλυσίδα, όπως στα υδρόξυ-λιπαρά οξέα, ή α-αλκυλ-β-υδροξυ-λιπαρά οξέα. Το υδρόφιλο τμήμα τους μπορεί να είναι καρβοξυλικό οξύ, αμινοξύ, πεπτίδιο, φωσφορική ομάδα ή αλκοόλη.

Οι βιολογικά επιφανειακά δραστικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από πολλά από τα πλεονεκτήματα των συνθετικά επιφανειακά δραστικών ουσιών, απουσία των μειονεκτημάτων τους. Είναι μη τοξικές ενώσεις, φιλικές στο περιβάλλον, βιοδιασπώμενες, δραστικές σε ακραίες συνθήκες (θερμοκρασία, pH, αλατότητα), παράγονται από ανανεώσιμες πηγές με χαμηλό κόστος και χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες [49, 59, 60, 64, 65].

Οι βιο-τασιενεργές ενώσεις διακρίνονται σε έξι βασικές κατηγορίες: γλυκολιπίδια, λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες, ουδέτερα λιπίδια, υποκατεστημένα λιπαρά οξέα και λιποσακχαρίτες. Χωρίζονται σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι τα γλυκολιπίδια, και σε μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πολυσακχαρίτες, λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες ή μείγματα αυτών [66-68].

Για τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων έχουν αναφερθεί τρεις βασικοί μηχανισμοί:

- Πρόσληψη των διαλυμένων υδρογονανθράκων στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να λειτουργεί σε υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας.

- Πρόσληψη υδρογονανθράκων που δεν βρίσκονται στην υδατική φάση από κύτταρα που έρχονται σε επαφή με πολύ μεγαλύτερες από αυτά σταγόνες υδρογονανθράκων. Ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται κυρίως σε ελάχιστα διαλυτούς υδρογονάνθρακες.
- Πρόσληψη υδρογονανθράκων που βρίσκονται σε μια ψευδο-διαλυμένη κατάσταση.

Η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των υδρογονανθράκων με την προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών ακολουθεί το εξής μονοπάτι:

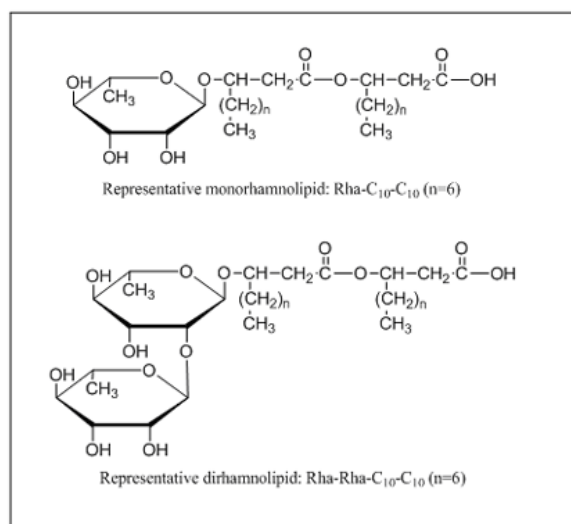
- i) Μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υδατικής και μη-υδατικής φάσης
- ii) Αύξηση της διαλυτότητας των υδρογονανθράκων. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως διαλυτοποίηση (solubilization) και προκαλείται από την παρουσία μικκυλίων. Η διαλυτοποίηση εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής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

Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη βιομηχανία πετρελαίου για την ανάκτησή του (EOR: Enhanced Oil Recovery), για τη βιοεξυγίανση πετρελαιοκηλίδων, ρυπασμένων εδαφών, στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα, στη βιομηχανία καλλυντικών, λόγω της αντιβιοτικής και της αντιμικροβιακής τους δράσης στη φαρμακοβιομηχανία, στις βιομηχανίες χάρτου, υφασμάτων, στη γεωργία.

Για τη μελέτη της αποδόμησης των πετρελαιοειδών έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο συνθετικές, όσο και βιο-τασιενεργές ενώσεις, ανιονικές, κατιονικές και ουδέτερες, όπως SDS, CTAB, Triton X100, Tween 80, όσο και βιολογικές όπως τα ραμνολιπίδια, σοφορολιπίδια. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη τασιενεργών ουσιών διευκολύνει τη βιοαποδόμηση ρυπογόνων ουσιών, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η προσθήκη έχει αρνητικές συνέπειες [69-70]. Αυτό οφείλεται στην προσρόφηση των επιφανειοδραστικών ουσιών, στο ότι οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούν ως θρεπτικά υπόστρωμα από τους μικροοργανισμούς, στην αυξημένη τοξικότητα των ρύπων λόγω της αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας τους και

τέλος στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των ρύπων καθώς αυτοί δεσμεύονται σε μικύλια [71-74].

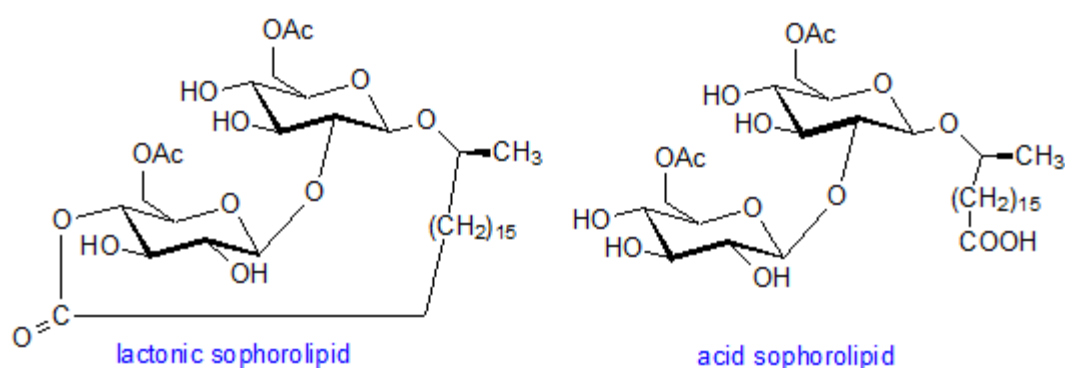
Ένα από τα πιο εκτενώς μελετημένα γλυκολιπίδια αποτελούν τα ραμνολιπίδια (RLs). Αποτελούνται από ένα ή δύο μόρια ραμνόζης και ένα ή δύο μόρια β-υδροξυδεκανοϊκού οξέος. Παράγονται από πολλά στελέχη *Pseudomonas*.



Σχήμα 1.5: Χημική δομή ραμνολιπιδίων [75].

Η παραγωγή των ραμνολιπιδίων εξαρτάται από τις πηγές άνθρακα και άλλων θρεπτικών υλικών καθώς επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία και το οξυγόνο [49,77]. Σήμερα, τα ραμνολιπίδια θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικές βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις. Έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάκτηση πετρελαίου (EOR), στην κινητοποίηση NAPL στο έδαφος και σε υδάτινα συστήματα, ως εντομοκτόνα λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης. Ραμνολιπίδια του *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν για την βιοεξυγίανση στην περίπτωση του ατυχήματος Exxon Valdez [59, 60, 77].

Στην οικογένεια των γλυκολιπιδίων ανήκουν και τα σοφορολιπίδια (SLs). Προέρχονται κυρίως από διάφορα γένη μυκήτων, όπως το *Candida Bombicola*. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα μόριο δισακχαρίτη σοφορόζης, το οποίο ενώνεται με γλυκοζιτικό δεσμό στην υδροξυλομάδα του πρότελευταίου άνθρακα του ακόρεστου C18 οξέος [78]. Τα σοφορολιπίδια και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καθαρισμού, καλλυντικών, φαρμάκων.



Σχήμα 1.6: Χημική δομή σοφορολιπιδίων [78].

ΒΙΟΤΑΣΙΕΝΕΡΓΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΠΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μοναδικές μεταβολικές και φυσιολογικές ιδιότητες έτσι ώστε να αναπτύσσονται σε αντίξοες συνθήκες και να παράγουν νέους μεταβολίτες, οι οποίοι δεν είναι παρόντες στο χερσαίο περιβάλλον. Για αυτό το λόγο, η πλούσια θαλάσσια κοινότητα παρέχει τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων χημικών ενώσεων, όπως αντιβιοτικά, ένζυμα, βιταμίνες και βιοτασιενεργές ουσίες. Την τελευταία δεκαετία ερευνάται εάν οι βιοτασιενεργές ουσίες έχουν τη δυνατότητα να αντικαταστήσουν τις χημικές τασιενεργές ουσίες. Πάνω από 10.000 μεταβολίτες με ευρύ φάσμα βιολογικών δυνατοτήτων και εκπληκτικές φαρμακευτικές ιδιότητες, έχουν απομονωθεί από το θαλάσσιο περιβάλλον [79-80]. Παρόλα αυτά, εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του θαλάσσιου περιβάλλοντος, ο θαλάσσιος μικροβιακός κόσμος παραμένει ανεξερεύνητος. Έχει υπολογιστεί ότι λιγότερο από 0,1% της θαλάσσιας μικροβιακής κοινότητας έχει μελετηθεί, καθώς παρεμποδιστικό παράγοντα αποτελεί η μη καλλιεργήσιμη φύση των βακτηρίων σε εργαστηριακές συνθήκες [33].

Οι μικροοργανισμοί που παράγουν βιοτασιενεργές ουσίες βρίσκονται παντού, σε υδάτινο και σε χερσαίο περιβάλλον, όπως και σε ακραίες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας και pH. Οι μικροοργανισμοί παράγουν βιοτασιενεργές ουσίες οι οποίες προκαλούν διαλυτοποίηση των υδρόφοβων συστατικών του περιβάλλοντος

και έτσι μπορούν οι μικροοργανισμοί να τις χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα [23, 81, 82]. Έχει προταθεί ότι η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών στην επιφάνεια των μικροβιακών κυττάρων αυξάνει την υδροφοβικότητα του κυττάρου και του επιτρέπει να ζει σε υδρόφοβο περιβάλλον [83-84]. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, μπορούν είτε να απελευθερωθούν στο περιβάλλον εξωκυτταρικά, είτε να είναι προσκολλημένες στην κυτταρική μεμβράνη. Στην τελευταία περίπτωση, ο μικροοργανισμός συμπεριφέρεται ως επιφανειοδραστική ουσία, διαθέτοντας την ικανότητα της προσκόλλησης σε μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα [85]. Ποικίλοι μικροοργανισμοί που παράγουν βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν απομονωθεί από μολυσμένες περιοχές από πετρέλαιο. Διαφορετικές μέθοδοι χαρακτηρισμού έχουν προταθεί για αυτές τις βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες, όμως η διαφορετικότητα των χημικών ιδιοτήτων κάθε είδους, καθιστά αδύνατο τον πλήρη χαρακτηρισμό τους με μία μόνο μέθοδο. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν παραχθεί από θαλάσσιους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 1.2: Θαλάσσια γλυκολιπίδια και άλλοι τύποι βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (ΒΕ).

ΒΕ ΕΝΩΣΗ	ΜΟ	ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΠΗΓΗ
Γλυκολιπίδιο	<i>Alcaligenes</i>	Μη τοξικό λιπίδιο γλυκόζης	Αναστολή ανάπτυξης μικροφυκών	Poremba et al. (1991a)
	<i>Arthrobacter</i>	Τρεχαλολιπίδιο	Επιφανειοδραστικότητα- ιδιότητα γαλακτοποίησης	Passeri et al. (1991)
	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Ανιονικό γλυκολιπίδιο	Επιφανειακή δραστικότητα	Abraham et al. (1998)
	<i>Rhodococcus</i>	Δύο διαφορετικά είδη ΒΕ ουσιών	Διαλυτοποίηση των PAHs και αύξηση του ρυθμού αποδόμησης δεκαεξανίου	Peng et al. (2007)
	<i>Halomonas</i>	Μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη	Ιδιότητες γαλακτοποίησης	Pepi et al. (2005)
Λιποπεπτίδιο	<i>Bacillus circulans</i>	Νέος τύπος ΒΕ ουσίας	Αντιμικροβιακή δράση	Das et al. (2008)
	<i>Bacillus licheniformis</i> BAS50	Λιποπεπτίδιο lichenysin	Ισχυρή επιφανειοδραστικότητα, Καλή αντιμικροβιακή δράση	Yakimov et al. (1995)
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Λιπίδια και πρωτεΐνες(31.3:68.7)	Διαλυτοποίηση αργού πετρελαίου, diesel, κηροζίνης	Thavasi et al. (2008)
Φωσφολιπίδια και Λιπαρά οξέα	<i>Myroides</i>	Χολικό οξύ, Δεσόξυχολικό οξύ	Καλός επιφανειοδραστικός παράγοντας	Maneerat et al. (2005)
Γλυκολιποπεπτίδια	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Υδατάνθρακες (40%), λιπίδια(27%) πρωτεΐνες (29%)	Διαλυτοποίηση διαφόρων υδρογονανθράκων	Thavasi et al. (2007, 2008)

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η συλλογή θαλάσσιων δειγμάτων από επιβαρυμένες από πετρέλαιο περιοχές, συγκεκριμένα από τον κόλπο της Ελευσίνας (ΕΛΠΕ, διυλιστήρια) και από τον κόλπο Κερί της Ζακύνθου (πετρελαιοπηγές). Από τα δείγματα αυτά, μετά από χημικές αναλύσεις, έτσι ώστε να υπολογιστούν κάποια χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου θαλάσσιου περιβάλλοντος, απομονώθηκαν μεικτές μικροβιακές κοινότητες, οι οποίες και χαρακτηρίστηκαν. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιήθηκε η εξερεύνηση της βιοποικιλότητας των βακτηρίων σε ρυπασμένα ελληνικά ύδατα. Εκτός από τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της υδροφοβικότητας κάθε μεικτής κοινότητας. Η υδροφοβικότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της κάθε κοινότητας, καθώς βάσει αυτού του μεγέθους μπορεί να γίνει η έμμεση εκτίμηση παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Λαμβάνοντας αυτή την εκτίμηση υπόψη, πραγματοποιήθηκαν με την κατάλληλη βακτηριακή κοινότητα πειράματα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και με διαφορετική πηγή άνθρακα. Τέλος, στην παρούσα διπλωματική εργασία, διενεργήθηκαν πειράματα βιοαποδόμησης πετρελαίου και μαζούτ με προσθήκη ενισχυτικού βιοαποικοδόμησης (bioremediation agent) S-200.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΧΗΜΙΚΕΣ & ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ

2.1.1. Δειγματοληψία

Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές φιάλες του 1l, και φορητό ψυγείο με παγοκύστες, έτσι ώστε να μην αλλοιωθούν τα βιολογικά και χημικά χαρακτηριστικά κάθε δείγματος μέχρι να πραγματοποιηθεί η κάθε εργαστηριακή ανάλυση. Για τις αναλύσεις φωσφόρου, μέρος του δείγματος διηθήθηκε απ'ευθείας με φίλτρο πορώδους 0,45μm (Whatman), ενώ για τις αναλύσεις των βαρέων μετάλλων με τη μέθοδο ICP-MS, στο δείγμα προστέθηκε HNO₃.

Για τη συλλογή των δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης KC Denamark Water Sampler, όγκου 3 L, ο οποίος διαθέτει θερμόμετρο κλίμακας -10 έως 60⁰ C για την άμεση μέτρηση της θερμοκρασίας. Για την μέτρηση του βάθους χρησιμοποιήθηκε σχοινί βαθμονομημένο ανά ένα μέτρο, της ίδιας εταιρείας. Η συλλογή ιζήματος πραγματοποιήθηκε με Van Veem Bottom Grabber, της εταιρείας KC Denmark. Μετά τη λήψη του ιζήματος έγινε κοσκίνηση με κόσκινο KC stainless steel sieves (net size: 500 microns). Για τη λήψη των συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκε GPS Garmin Oregon 550.



Σχήμα 2.1: Συλλογή δείγματος θαλασσινού νερού.

2.1.2. Χημικές αναλύσεις θαλασσινού νερού

Για τη μελέτη της κατάστασης των θαλασσινών υδάτων ελέγχθηκαν οι παράμετροι pH, BOD₅, DO, PO₄, SS, Cl⁻ και τα βαρέα μέταλλα Cr, Ni, Cu, Zn, Sn, Pb.

pH

Το pH κάθε δείγματος μετρήθηκε με φορητό pH-μετρο, HI8424 Hanna Instruments.

Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο – BOD₅

Το BOD₅ μετρήθηκε με τη ρεσπιρομετρική μέθοδο (Σχήμα 2.2). Επιλέχθηκε περιοχή ορίων μέτρησης BOD 0-80 mg/l και τα ml του δείγματος 365 (συντελεστής 2).

Σύμφωνα με τη ρεσπιρομετρική μέθοδο, ρυθμίζεται η τιμή του pH του δείγματος μεταξύ 6,5 και 7,5 με προσθήκη καυστικού αλκαλίου. Στη συνέχεια προστίθεται μαγνητικός αναδευτήρας στη φιάλη με σκοπό τη καλύτερη διασπορά οξυγόνου στο δείγμα της φιάλης. Τοποθετείται και ειδική διάταξη, η οποία περιέχει μερικές σταγόνες υδροξειδίου του καλίου για τη δέσμευση του μονοξειδίου του άνθρακα.

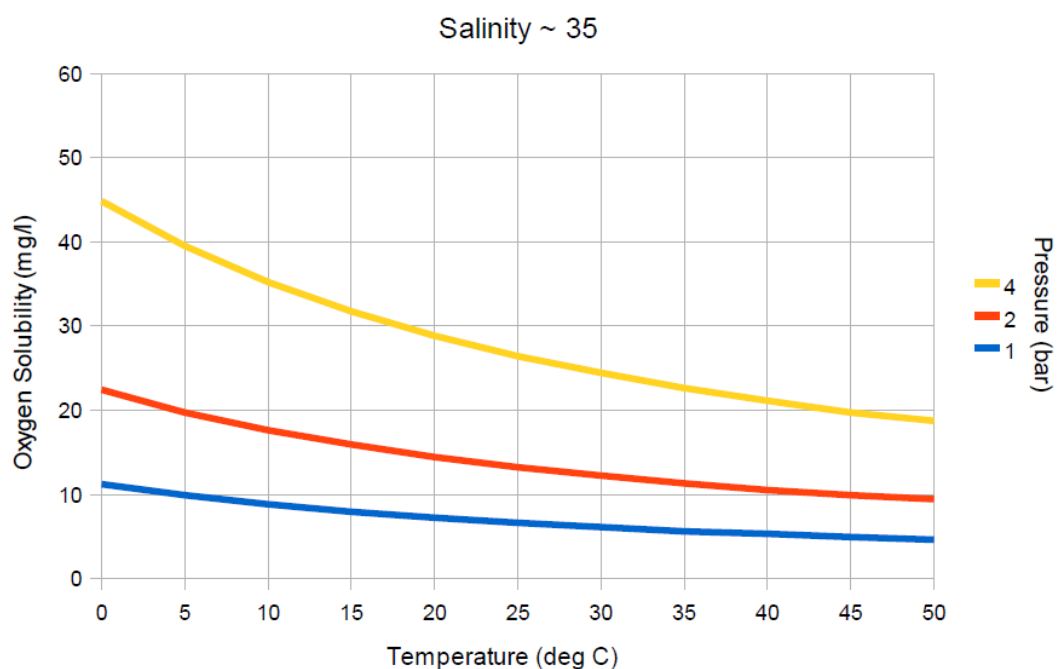


Σχήμα 2.2: Ρεσπιρομετρική μέθοδος μέτρησης βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου.

Τέλος, προσαρμόζεται ο ειδικός αισθητήρας του BOD στο στόμιο της φιάλης και ενεργοποιείται. Είναι πρωταρχικής σημασίας η θερμοκρασία να είναι κοντά στους 20°C κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Στη συνέχεια η φιάλη αποθηκεύεται σε κατάλληλο ψυγείο όπου η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή και ίση με 20°C για τις επόμενες 5 ημέρες.

Διαλυμένο Οξυγόνο – DO

Το διαλυμένο οξυγόνο μετρήθηκε άμεσα με ειδικό φορητό πολύμετρο HI-9143 της εταιρείας HANNA instruments. Στο σχήμα που ακολουθεί βλέπουμε τη σχέση μεταξύ διαλυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας, για θαλασσινό νερό (αλατότητας ~ 35) σε διαφορετικές πιέσεις.



Σχήμα 2.3: Διαλυμένο οξυγόνο συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε διαφορετικές πιέσεις [86].

ΦΩΣΦΟΡΟΣ – PO₄

Για τον υπολογισμό των φωσφορικών στο θαλασσινό νερό χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος.

Σε 10 ml δείγματος προστίθεται το στερεό αντιδραστήριο PhosVer 3: Phosphate Powder Pillow, της εταιρείας HACH. Μετά από ανακίνηση του δείγματος, και αφού επέλθει η αντίδραση μεταξύ του αντιδραστήριου και του δείγματος, μετράται η απορρόφηση στα 880 nm και υπολογίζεται η συγκεντρωση των φωσφορικών βάσει της ακόλουθης καμπύλης βαθμονόμησης:

$$\text{Abs}=1,726*\text{Concentration (in mg/L of P-PO}_4^{3-}), r=1,00$$

ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΑ ΣΤΕΡΕΑ - SS

Τα ολικά αιωρούμενα στερεά είναι όλα τα στερεά που παραμένουν σε φίλτρο 1.2 mm (Whatman) μετά από διήθηση γνωστού όγκου δείγματος νερού. Το φίλτρο ζυγίζεται με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό και ένας γνωστός (συγκεκριμένος) όγκος δείγματος νερού (300 ml) διηθείται από το προζυγισμένο φίλτρο, το οποίο ξηραίνεται στους 105° C για 24 ώρες. Μετά την πλήρη ξήρανση του φίλτρου και αφού αυτό κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου (σε ξηραντήριο) ακολουθεί η τελική ζύγιση. Τα αιωρούμενα στερεά υπολογίζονται βάσει της εξίσωσης:

$$SS = \frac{(m_f - m_i)1000}{V}, \text{ mg/l}$$

ΧΛΩΡΙΟΝΤΑ – Cl⁻

Η μέτρηση των χλωριόντων πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά. Το αρχικό δείγμα εξαιτίας της υψηλής αλατότητας του αραιώθηκε (1:1000).

Σε 10 ml δείγματος προστίθενται 0,8 ml αντιδραστήριου Mercuric Thiocynate, της εταιρείας HACH. Μετά από ανάδευση, προστίθεται 0,4 ml Ferric Ion (HACH), πραγματοποιείται ανάδευση, και έπειτα το δείγμα φασματοφωτομετρείται στα 455 nm. Τα χλωριόντα του δείγματος υπολογίζονται βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης ως εξής:

$$\text{Abs} = 0,049 * \text{Concentration (in mg/ L of Cl}^{-1}\text{)}, r=0,95$$

BAPEA ΜΕΤΑΛΛΑ

Για τον υπολογισμό των βαρέων μετάλλων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy – ICP-MS). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται για δείγματα θαλασσινού νερού, σε 15 ml δείγματος προστίθεται ύτριο (Y) κατάλληλης συγκέντρωσης και ρητίνη SPR-IDA. Το pH κάθε δείγματος ρυθμίζεται με NH_4OH (29%) κοντά στο 8. Μετά από επώαση μίας ώρα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 2000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό μετακινείται προσεκτικά και 15 ml διαλύματος απεσταγμένου νερού με NH_4OH (pH=8) προστίθενται στο στερεό. Μετά από καλή ανακίνηση των δειγμάτων ξαναγίνεται φυγοκέντρηση. Αφού μετακινηθεί το υπερκείμενο υγρό, προστίθεται 7% v/v HNO_3 υψηλής καθαρότητας. Στη συνέχεια διαλύεται η στερεή πελέττα μέχρι τα 3 ml και το δείγμα είναι έτοιμο να μετρηθεί με ICP-MS.

2.1.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις θαλασσινού νερού

Στόχος των μικροβιολογικών αναλύσεων είναι ο προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται στο νερό. Επειδή η απομόνωση και η αναγνώριση του κάθε είδους μικροοργανισμού παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες και επειδή ο αριθμός των παθογόνων μικροοργανισμών είναι πολύ μικρός σε σχέση με το σύνολο των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο νερό, για τον προσδιορισμό της πιθανότητας που έχει το νερό να μεταδώσει ασθένειες χρησιμοποιούνται οργανισμοί που ονομάζονται δείκτες. Η ύπαρξη οργανισμών δεικτών στο νερό επιβεβαιώνει μόλυνση του νερού. Οι οργανισμοί δείκτες ενδέχεται να συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι ίδιοι όμως δεν είναι παθογόνοι. Οι ιδανικοί οργανισμοί – δείκτες πρέπει να είναι εφαρμόσιμοι σε όλα τα νερά, να συνυπάρχουν με τα παθογόνα είδη μικροοργανισμών, η συγκέντρωσή τους να είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με τα παθογόνα είδη, να είναι εύκολα ανιχνεύσιμοι, να έχουν

χρόνο ζωής παραπλήσιο με τα παθογόνα είδη, να μην υπάρχουν στα καθαρά νερά, να έχουν σταθερά βιοχημικά χαρακτηριστικά για ανίχνευση και να είναι αβλαβείς. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Μέθοδος Διηθητικών Μεμβράνων. Σύμφωνα με τη μέθοδο το δείγμα διηθείται μέσω αποστειρωμένης μεμβράνης (φίλτρου), με διάμετρο πόρων 0.45 μm (Whatman), υπό πίεση κενού. Η μεμβράνη (φίλτρο) τοποθετείται πάνω σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας το οποίο βρίσκεται εντός του τρυβλίου. Στη συνέχεια το τρυβλίο τοποθετείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για επώαση και για καθορισμένο χρόνο. Κάθε μικροοργανισμός σχηματίζει κατά τη διάρκεια της επώασης μια αποικία. Για να είναι ικανοποιητικά τα αποτελέσματα της μέτρησης πρέπει ο όγκος του δείγματος να είναι τέτοιος ώστε να αναπτύσσονται 20 – 200 αποικίες σε κάθε μεμβράνη (φίλτρο). Οι δείκτες που υπολογίστηκαν είναι τα ολικά κολοβακτηρίδια (Total coliforms), η E. Coli και ο εντερόκοκκος (Enterococci). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, διηθήθηκαν 200 ml θαλασσινού νερού και στη συνέχεια οι μεμβράνες στρώθηκαν σε ειδικό υπόστρωμα, ανάλογα με επιθυμητό βακτηριακό δείκτη (για τον εντερόκοκκο χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Slanetz & Bartley, ενώ για τα ολικά και κοπρανώδη κολοβακτηρίδια και την E. Coli το υπόστρωμα Membrane Lauryl Sulphate).

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ - ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Για να απομονωθεί επιτυχώς κάθε μικροβιακό δείγμα από τα θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πέντε διαδοχικοί εμπλουτισμοί του δείγματος, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε εκλεκτική απομόνωση μέσω στερεού υποστρώματος.

Για όλες τις καλλιέργειες των μικροβιακών κοινοτήτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο ONR7 και πετρέλαιο από το Καζακστάν (ΕΛ.ΠΕ.).

Για την απομόνωση της μεικτής βακτηριακής κοινότητας με την μέθοδο του στερεού υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θρεπτικό μέσο, το οποίο στερεοποιήθηκε με προσθήκη άγαρ (1,5% w/v).

Για την προετοιμασία του θρεπτικού μέσου ONR7 παρασκευάστηκαν αρχικά τρία πυκνά διαλύματα (5x). Όλα τα διαλύματα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά υπό πίεση 1.1 bar για 20 λεπτά.

Διάλυμα 1 (1 L)

NaCl	113.95 g
Na ₂ SO ₄	19.9 g
KCl	3.6 g
NaBr	415 mg
NaHCO ₃	155 mg
H ₃ BO ₃	135 mg
NaF	13 mg
NH ₄ Cl	0.35 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	445 mg
TAPSO	6.5 g

Διάλυμα 2 (500 ml)

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

Διάλυμα 3 (100 ml)

FeCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
--	-------

Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος (ONR7):

- ανάμειξη 200 ml του διαλύματος 1 με 133 ml απιονισμένο νερό

- ρύθμιση του pH στο 7,6 με NaOH (2M)
- προσθήκη 100 ml διάλυμα 2 με 233 ml απιονισμένο νερό
- ανάμειξη 20 ml διαλύματος 3 με 213 ml απιονισμένο νερό

2.2.1. Προσδιορισμός καμπύλης ανάπτυξης των μεικτών βακτηριακών κοινοτήτων

Κατά τους εμπλουτισμούς των αρχικών θαλασσινών δειγμάτων υπολογίστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (growth curves) των μεικτών βακτηριακών κοινοτήτων.

Οι καμπύλη ανάπτυξης κάθε διαφορετικού βακτηριακού συστήματος, αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές φάσεις. Αρχικά έχουμε τη φάση προσαρμογής (lag phase), κατά την οποία οι μικροοργανισμοί ουσιαστικά εγκλιματίζονται στις νέες συνθήκες περιβάλλοντος. Ακολουθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης (exponential phase) κατά την οποία έχουμε τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, έπειτα έχουμε τη στατική φάση (stationary phase), κατά την οποία έχουμε σταθερό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Ακολουθεί τέλος η φάση θανάτωσης (death phase), στην οποία έχουμε την εξάντληση του διαθέσιμου υποστρώματος προς τους μικροοργανισμούς και τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης [87].

Οι καμπύλες ανάπτυξης που υπολογίστηκαν σε όλα τα εμπλουτισμένα θαλασσινά δείγματα, βασίστηκαν στην οπτική απορρόφηση και στην καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Η μέθοδος της φωτομέτρησης αποτελεί έμμεσο προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης, και βασίζεται στη θολότητα που δημιουργείται στο δείγμα λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας. Αντίθετα, η καλλιεργητική μέθοδος αποτελεί μία πιο άμεση μέθοδο και βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν στην καλλιέργεια, όταν επιστρωθούν στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο με άγαρ, σχηματίζουν ορατές και ξεχωριστές αποικίες. Οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή αναφέρονται ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα (colony forming units). Πριν την επίστρωση του δείγματος πρέπει να πραγματοποιηθούν κατάλληλες αραιώσεις, έτσι ώστε ο μετρούμενος αριθμός των αποικιών στο τρυβλίο να κυμαίνεται μεταξύ

30 και 300. Τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν θρεπτικό υλικό Zobell Marine Agar, η θερμοκρασία επώασης ήταν στους 20° C, ενώ ο χρόνος επώασης ήταν 48 ώρες.

2.2.2. Απομόνωση των βακτηρίων που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή

Για τη δημιουργία τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της μεικτής κοινότητας βακτηρίων που αποικοδομούν το πετρέλαιο, γινόταν προσθήκη 1,5 g/l άγαρ στο υγρό θρεπτικό μέσο ONR7, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Μετά την στερεοποίηση των τρυβλίων γινόταν επίστρωση με αργό πετρέλαιο, το οποίο αποτελούσε τη μοναδική πηγή άνθρακα.

Στα τρυβλία αυτά, πραγματοποιήθηκε επίστρωση του τελικού εμπλουτισμένου δείγματος, και έπειτα από επώαση τους στους 20° C για 96 ώρες, γινόταν ανακαλλιέργεια σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα της κάθε διαφορετικής αποικίας. Για την επιτυχή απομόνωση της επιθυμητής μικροβιακής κοινότητας, έλαβαν χώρα πέντε διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα.

2.2.3. Εκτίμηση της υδροφοβικότητας – MATH test

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της υδροφοβικότητας (hydrophobicity) ήταν το MATH test (Microbial Adherence To Hydrocarbons) [67]. Αποτελεί μία αρκετά απλή, εύκολη και γρήγορη διαδικασία, αν και διαθέτει αρκετά μειονεκτήματα. Το κάθε εργαστήριο εκτελεί το πρωτόκολλο ανάλογα με τον διαθέσιμο εξοπλισμό του, και για το λόγο αυτό, δεν τίθεται θέμα σύγκρισης μεταξύ των αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα, καθώς ως ελαιώδες μέσο χρησιμοποιείται το δεκαεξάνιο, η θερμοκρασία διεξαγωγής του τεστ, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, διότι το σημείο τήξης του σε κανονικές συνθήκες είναι στους 16° C. Για όλους του παραπάνω λόγους, το τεστ αυτό αποτελεί απλά μία εκτίμηση της υδροφοβικότητας των κυττάρων και των παραγώγων τους, και όχι ακριβή τιμή [88].

Η διαδικασία που έλαβε χώρα για το MATH τεστ ήταν η ακόλουθη:

- Φυγοκέντρηση ποσότητας της μικροβιακής καλλιέργειας
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού
- Ξέπλυμα του σχηματιζόμενου στερεού με PBS buffer
- Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (επιθυμητή τιμή απορρόφησης μεταξύ 0,6 - 0,4) ($OD_{600,i}$)
- Προσθήκη 150 μ l ελαιώδους μέσου (στην περίπτωση μας ν-δεκαεξάνιο)
- Ανάδευση
- Μετά των διαχωρισμό των δύο φάσεων, μέτρηση της οπτικής απορρόφησης της κάτω-υδατικής φάσης ($OD_{600,f}$)

Η υδροφοβικότητα εκφράζεται ως εξής:

$$\text{Hydrophobicity, \%} = [\text{OD}_{600,i} - \text{OD}_{600,f}] / \text{OD}_{600,i} \cdot 100$$

Το PBS buffer (1 L) που χρησιμοποιήθηκε κατά το MATH test παρασκευάζεται ως εξής:

K_2HPO_4	16.9 g
------------	--------

KH_2PO_4	7.3 g
------------	-------

Για την απομόνωση μικροβιακής κοινότητας που παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, δείγμα από την ελαιώδη φάση του τεστ απλώθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και απομονώθηκε με τη μέθοδο του στερεού υποστρώματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.2.4. Φυλογενετική ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων που αποικοδομούν το πετρέλαιο

Τα δείγματα αναλύθηκαν φυλογενετικά μετά από την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA extraction)

Η απομόνωση ολικού DNA κάθε μικροβιακής κοινότητας πραγματοποιήθηκε σε 2 ml υγρής καλλιέργειας, μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, δόθηκε από τον Moore et al [89] και η διαδικασία είχε ως εξής:

- Προσθήκη 562 μ l TE Buffer – Ανακίνηση
- Προσθήκη 2 μ l lysozyme – Ανακίνηση
- Επώαση στους 37° C για 15'
- 6 μ l Proteinase K και 30 μ l SDS – Ανακίνηση – Επώαση στους 37° C μέχρι το μείγμα να γίνει διαυγές και παχύρρευστο
- 100 μ l NaCl (5 M) – Ανακίνηση – Επώαση στους 65° C για 2'
- 80 μ l CTAB/NaCl (το διάλυμα πρέπει να έχει προθερμανθεί) – Ανακίνηση – Επώαση στους 65° C για 10'
- Προσθήκη 800 μ l Chloroform/Isoamyl – Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 5'
- Μετακίνηση της πάνω φάσης του διαλύματος σε νέο Eppendorf σωλήνα και προσθήκη 800 μ l Phenol-Chloroform-Isoamyl – Φυγοκέντρηση στα 15.000g για 5'
- Μετακίνηση της επάνω φάσης του υδατικού διαλύματος σε νέο Eppendorf και προσθήκη 800 μ l Chloroform/Isoamyl – Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 5'
- Μετακίνηση της επάνω φάσης σε νέο σωλήνα και προσθήκη 560 μ l Isopropanol – Ανακίνηση
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'
- Φυγοκέντρηση στα 15.000g για 15'

- Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού προσεκτικά – Το απομονωμένο DNA έχει δημιουργήσει στερεή πελλέτα
- Προσθήκη 500 μl αιθανόλης – Ανακίνηση
- Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 15'
- Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού προσεκτικά
- Ξήρανση σε χωνευτήρα (dry bath)
- Προσθήκη 50 μl TE buffer – Επώαση στους 37° C για 15'

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά, μετά από αραίωση 1:70 σε νερό. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση υπολογίστηκε βάσει της τιμής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm, ενώ η καθαρότητα βάσει του λόγου των τιμών απορρόφησης στα 260 nm προς τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης στα 280 nm.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μετά από την επιβεβαίωση της ύπαρξης καλής ποιότητας και συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η PCR αποτελεί μία απλή, ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων τριών σταδίων. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική θερμοκρασία, με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation). Σε αυτό το στάδιο το γενετικό υλικό υποβάλλεται σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως 94° C), προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου γενετικού υλικού. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, η υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing), όπου η θερμοκρασία μειώνεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 50 και 60° C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του γενετικού υλικού σε κάθε αλυσίδα. Τέλος,

κατά το τρίτο στάδιο, την επιμήκυνση (extension), η θερμοκρασία της διεργασίας αυξάνεται στους 72° C και πραγματοποιείται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με τη βοήθεια της πολυμεράσης, η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια (dNTPs) στο 3' άκρο των εκκινητών. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται πάντα με την DNA πολυμεράση με κατεύθυνση από το άκρο 5' προς 3' [90].

Οι PCRs που έλαβαν χώρα κατά τη συγκεκριμένη εργασία, διεξήχθησαν με το PCR core kit της εταιρείας QIAGEN, ενώ οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο 27F και ο 1492R, οι οποίοι αποτελούν τους συνήθεις εκκινητές (universal primers) για την αλληλούχιση βακτηριακού γενετικού υλικού. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα χαρακτηριστικά των εκκινητών κατά την PCR.

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιθυμητό γονιδίωμα	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν (bp ¹)
16SrDNA bacteria	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465
	1492R	GGTACCTTGTTACGACTT	

bp¹: ζεύγη βάσεων (base pairs)

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCR ήταν οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 5'
- 30 κύκλοι στους 94° C για 1'
- 55° C για 1'
- 72° C για 2'
- Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10'

Κάθε αντίδραση (50 µl) περιέχει:

- 2 μl απομονωμένου γενετικού υλικού
- 5 μl 1xPCR buffer διάλυμα
- 5 μl από κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 0,5 μM
- 0,05 μl dNTPs συγκέντρωσης 0,2 μM
- 0,3 μl Taq πολυμεράσης 0,03 U/μl

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, εφαρμόζεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, σε πηκτή αгарόζης μαζί με μοριακούς δείκτες, των οποίων τα μεγέθη είναι γνωστά (molecular markers). Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να διαπιστωθεί εάν το προϊόν της PCR αντιστοιχεί στο κατάλληλο μέγεθος.

Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται με προσθήκη 1 gr αгарόζης σε 100 ml 1xTAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) (Bioland), ενώ προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide), για να πραγματοποιηθεί η χρώση. Το βρωμιούχο αιθίδιο διαθέτει την ικανότητα να φθορίζει έντονα υπό υπεριώδη ακτινοβολία, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA.

Εφόσον διαπιστωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού μεγέθους γενετικού υλικού, το προϊόν της PCR καθαρίζεται και στη συνέχεια πραγματοποιείται η αλληλούχιση του γενετικού υλικού μέσω της εταιρείας «StarSeq».

Μετά την αλληλούχιση και με χρήση των προγραμμάτων BioEdit και Mega5 και της γενετικής τράπεζας BLAST, λαμβάνεται το φυλογενετικό δένδρο, με τη μέθοδο “neighbor-joining”, στο οποίο απεικονίζεται η βακτηριακή ποικιλότητα κάθε δείγματος.

2.3. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΩΝ

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης των πετρελαιοειδών, πειράματα δέκα ημερών έλαβαν χώρα, με την απομονωμένη μικροβιακή κοινότητα E1, τα χαρακτηριστικά της οποίας παρατίθενται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Στα έξι πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μελετήθηκε η επίδραση της διαφορετικής πετρελαϊκής μόλυνσης (μαζούτ και αργό πετρέλαιο), με και χωρίς προσθήκη του ευρέως χρησιμοποιούμενου ενισχυτικού βιοαποικοδόμησης S-200. Το συγκεκριμένο ενισχυτικό χρησιμοποιείται εκτενώς σε περιπτώσεις πετρελαιοκηλίδων. Είναι ολεοφιλικό, αποτελείται από φώσφορο και άζωτο και ενισχύει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ιδιότητες του στην βιοαποικοδόμηση μελετήθηκαν στην πετρελαιοκηλίδα Prestige, στις ακτές της Ισπανίας, το 2002, το οποίο οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης, ιδιαίτερα σε μεγάλα μοριακού βάρους αλκάνια και σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες [91-92].

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες Erlenmeyer χωρητικότητας 400 ml, οι οποίες αναδεύονταν σε κυκλικό αναδευτήρα (orbital shaker, Labnet) στα 150 rpm (αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης). Το υγρό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν το ONR7. Στις 3 από τις 6 φλάσκες, η πηγή άνθρακα ήταν αργό πετρέλαιο (από το Καζακστάν, παραχωρήθηκε από τα Ελληνικά Πετρέλαια) σύστασης 0,5% w/v, ενώ στις άλλες 3 η πηγή άνθρακα ήταν μαζούτ (από την εταιρεία ΥΠΟΔΟΜΗ Α.Ε.), σύστασης 0,5% w/v. Σε κάθε περίπτωση πηγής άνθρακα, η μία φλάσκα δεν περιείχε καθόλου μικροβιακό φορτίο (μάρτυρας - control), η δεύτερη περιείχε την επιθυμητή απομονωμένη μικροβιακή κοινότητα, αρχικής συγκέντρωσης 10^5 CFU/ml, ενώ η τρίτη περιείχε μικροβιακή κοινότητα και το λίπασμα S-200, του οποίου η ποσότητα σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι σε αναλογία 1:10 w/w σε σχέση με το βάρος της πετρελαϊκής μόλυνσης.

Τις μέρες 0, 3, 6 και 10 συλλέχθηκαν από κάθε φλάσκα 30 ml δείγματος. Στα 25 ml έγιναν χημικές αναλύσεις για την εξέταση των συστατικών του πετρελαίου, ενώ στα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις.

2.3.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που έλαβαν χώρα για τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις συνθήκες των πειραμάτων ήταν η οπτική απορρόφηση και η καλλιεργητική μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και παραπάνω.

2.3.2. Χημικές αναλύσεις

Στα 25 ml που χρησιμοποιήθηκαν για τις χημικές αναλύσεις αρχικά γινόταν εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, μέχρις ότου να αποχρωματιστεί τελείως ο διαλύτης. Η εξάτμιση του διαλύτη γινόταν στον περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Στο εκχύλισμα πραγματοποιούνταν εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) με στήλες Bond Elut Trh της εταιρείας Hellamco.

Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)

Κατά τις SPE λαμβάνονταν δύο κλάσματα, το πρώτο στο οποίο εμπεριέχονταν τα αλκάνια, και το δεύτερο στο οποίο γινόταν η ανάκτηση των αρωματικών υδρογονανθράκων. Η διαδικασία κατά τις SPE στήλες είχε ως εξής:

- Διαβροχή της στήλης με 2 ml εξάνιο, πριν την εισαγωγή του δείγματος (Preconditioning)
- Διάλυση του δείγματος σε 1 ml εξάνιο
- Για το πρώτο κλάσμα των αλκανίων χρησιμοποιήθηκαν 4 ml εξανίου
- Για το δεύτερο κλάσμα, των αρωματικών, χρησιμοποιήθηκαν 4 ml διχλωρομεθάνιο

GC – MS ανάλυση

Για τον εντοπισμό των επιθυμητών ενώσεων (αλκάνια, αρωματικά) χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία (GC-MS). Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στον χρωματογράφο Agilent HP 7890/5975C GC-MS με στήλη Agilent HP-5 5% phenyl methyl siloxane column (30m x 250μm x 0.25μm), τα δείγματα διαλύθηκαν σε 1 ml διαλύτη (εξάνιο για το κλάσμα των αλκανίων, και

διχλωρομεθάνιο για το κλάσμα των αρωματικών) και προστέθηκαν 5 μl εσωτερικών προτύπων (internal standards). Τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν, αποτελούνταν από ναφθαλένιο-d8, φενανθρένιο-d10, περυλένιο-d12 and χρυσένιο-d12, συγκέντρωσης 1 ppm το καθένα.

Ένα τυφλό οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονταν πριν από την ανάλυση των αγνώστων αναλυτών. Τα εσωτερικά πρότυπα συνδυάζονταν με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων και εγχύονταν μαζί σε κάθε ανάλυση για να ελεγχθεί η απόδοση του οργάνου κατά τη διάρκεια κάθε σειράς αναλύσεων.

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_x : το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται
- A_{is} : το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο
- C_x : η συγκέντρωση (σε ng/μL) του συστατικού που μετράται
- C_{is} : η συγκέντρωση (10 ng/μL) του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου (σταθερή για την καμπύλη βαθμονόμησης)

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι εκφρασμένα ως κανονικοποιημένες συγκεντρώσεις ως προς το χοπάνιο, το οποίο αποτελεί συστατικό του πετρελαίου το οποίο δεν υφίσταται βιοαποικοδόμηση. Οπότε, η συγκέντρωση του κάθε συστατικού ορίζεται ως:

$$Ci, normalized(t) = \frac{Ci(t)}{C_{Hopane}(t)}$$

$C_i(t)$: Συγκέντρωση του συστατικού i σύμφωνα με το χρωματογράφημα της μεθόδου GC-MS.

$C_{\text{hopane}}(t)$: Συγκέντρωση του χοπανίου σύμφωνα με το χρωματογράφημα της μεθόδου GC-MS.

Η εκατοστιαία βιοαποικοδόμηση υπολογίστηκε επίσης βάσει του χοπανίου, και ορίζεται ως:

$$\text{Βιοαποικοδόμηση, \%} = \frac{\frac{C_{o,i}}{H_{\text{hopane},o}} - \frac{C_{t,i}}{H_{\text{hopane},t}}}{\frac{C_{o,i}}{H_{\text{hopane},o}}}$$

$C_{o,i}$: Η συγκέντρωση του συστατικού i τη χρονική στιγμή 0.

$H_{\text{hopane},o}$: Η συγκέντρωση του χοπανίου τη χρονική στιγμή 0.

$C_{t,i}$: Η συγκέντρωση του συστατικού i τη χρονική στιγμή t .

$H_{\text{hopane},t}$: Η συγκέντρωση του χοπανίου τη χρονική στιγμή t .

Για τον υπολογισμό ειδικού ρυθμού ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X$$

X : Η συγκέντρωση της βιομάζας

μ : Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

Για τον ειδικό ρυθμό βιοαποικοδόμησης, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$\frac{dS_i}{dt} = -q_{s,i} X$$

S : Η συγκέντρωση του συστατικού του πετρελαίου i

Q_s : ειδικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης του συστατικού i

2.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Για την μελέτη της παραγωγής των επιφανειοδραστικών ουσιών που εξετάστηκαν, χρησιμοποιήθηκε η μικροβιακή κοινότητα EB8, η οποία παρουσίασε τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα. Όλες οι ανακαλλιέργειες έγιναν στο υγρό θρεπτικό μέσο ONR7,. Η αρχική συγκέντρωση της μικροβιακής κοινότητας ήταν 10^5 CFU/ml. Χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες Erlenmeyer 250ml, στις οποίες περιέχονταν 100 ml θρεπτικού μέσου και οι οποίες αναδεύονταν σε αναδευτήρα Labnet στα 150 rpm, έτσι ώστε η διεργασία να λαμβάνει χώρα σε αερόβιες συνθήκες.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα είτε αργό πετρέλαιο (0,5% w/v), είτε μελάσα με αργό πετρέλαιο (0,25 και 0,25% w/v). Στις περιπτώσεις όπου ελέγχθηκε η επίδραση πρόσθετων θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου, τα άλατα που προστέθηκαν σε κάθε καλλιέργεια ήταν το KNO_3 και το KH_2PO_4 , σε ποσότητα τέτοια ώστε ο λόγος των θρεπτικών C:P:N να είναι ίσος με 100:10:1.

Μετά από επώαση των δειγμάτων συγκεκριμένης χρονικής διάρκειας, γινόταν εκχύλιση ολόκληρης της καλλιέργειας, ενώ στο εκχύλισμα πραγματοποιούνταν υγρή χρωματογραφία στήλης.

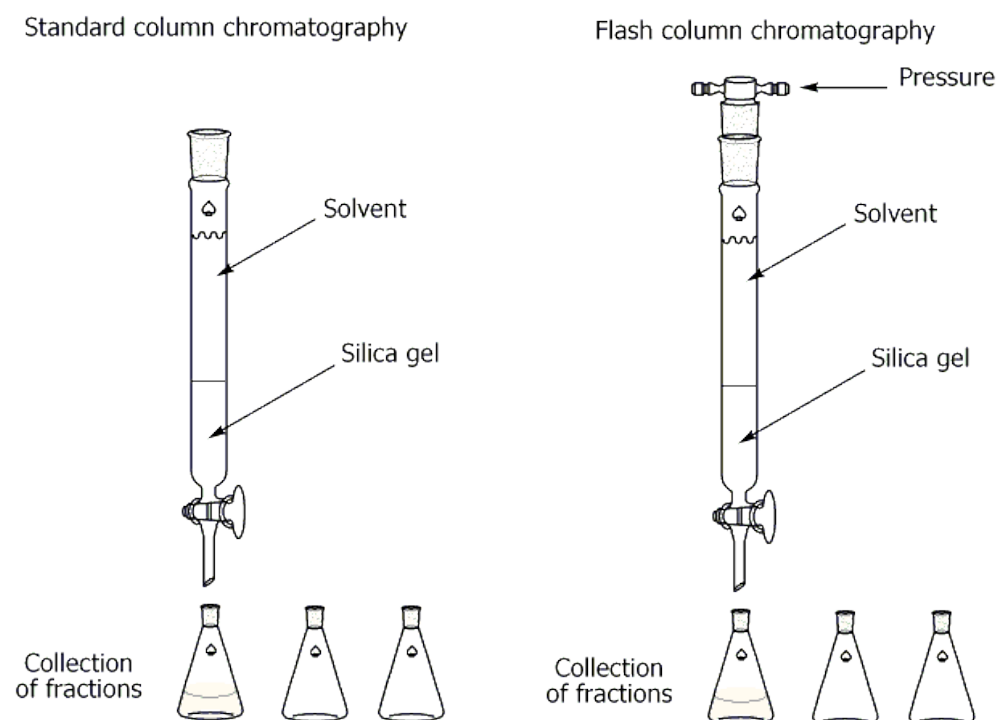
Οι εκχυλίσεις, όπως και η χρωματογραφία στήλης, γινόταν με διαφορετικό σύστημα διαλυτών, ανάλογα με την επιθυμητή επιφανειοδραστική ουσία. Μετά την εκχύλιση, όπως και μετά την χρωματογραφία στήλης, εξεταζόταν η ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Μετά τη στήλη, τα επιμέρους κλάσματα λυοφιλοποιήθηκαν (freeze dry), για την πλήρη απομάκρυνση υγρασίας και διαλυτών, έτσι ώστε να χαρακτηριστούν και να ζυγιστούν, έτσι ώστε να υπολογιστεί η εκάστοτε συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας.

Ο χαρακτηρισμός της εκάστοτε επιθυμητής βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας, μετά τη χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φασματοσκοπίας

υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).

- Υγρή Χρωματογραφία στήλης (Liquid Column Chromatography)

Η υγρή χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων, όπου η μία φάση διατηρείται ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση). Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με τη βοήθεια της κινητή φάσης στη στατική φάση. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά διαχωρίζονται. Κατά την υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική μπορεί να είναι είτε στερεή, είτε υγρή πάνω σε



Σχήμα 2.4: Πειραματική διάταξη για την απλή χρωματογραφία στήλης (αριστερά) και για υψηλής πίεσης χρωματογραφία στήλης (δεξιά).

στερεό υπόστρωμα. Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν στήλη) [93].

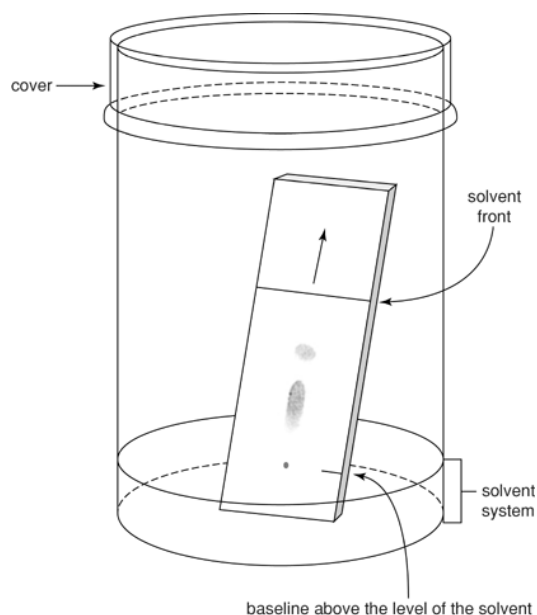
Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε στήλη διαμέτρου 3cm, με πληρωτικό υλικό Silica 60, 70-230 mesh, της εταιρείας Fluka.

Το σύστημα των διαλυτών ήταν διαφορετικό ανάλογα με την προς διαχωρισμό ένωση.

Η ανάλυση για την συγκέντρωση της παραγόμενης επιθυμητής βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας έγινε με ζύγιση του κλάσματος που περιείχε την απομονωμένη ουσία προς τον αρχικό όγκο της εκχύλισης.

- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας - TLC

Κατά την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμινένιες πλάκες, επιστρωμένες με μία λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνη. Το διάλυμα του υπο εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη



Σχήμα 2.5: Πειραματική διάταξη της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας [94].

μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν τοποθετηθεί εντός του θαλάμου τουλάχιστον 10 min πριν την τοποθέτηση της πλάκας ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς των διαλυτών. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου 10-20 min, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπο εξέταση δείγμα μετακινούνται επι της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm) ή μετά από ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. Από το χρώμα των κηλίδων στο ορατό, από την απορρόφηση στο υπεριώδες και ανάλογα με το χρησιμοποιηθέν αντιδραστήριο μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούμε (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ) [94].

Για τον εντοπισμό των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες επικαλυμμένες με silica, ενώ το σύστημα των διαλυτών, όπως και το αντιδραστήριο εμφάνισης της ένωσης ήταν διαφορετικό για κάθε βιοεπιφανειοδραστική ένωση.

- FT-IR

Η φασματοφωτομετρία μετασχηματισμού Fourier είναι μία τεχνική κατά την οποία φάσματα συλλέγονται μετρώντας την παροδική συνοχή μίας πηγής που ακτινοβολεί. Η μέθοδος αυτή έγκειται στην αλληλεπίδραση μεταξύ υπεριώδους ακτινοβολίας και των δεσμών της υπό εξέταση ένωσης [95]. Οι δεσμοί ανάμεσα στα άτομα έχουν διακριτή γεωμετρία και φυσικές καταστάσεις ταλάντωσης και στρέψης. Η προσπίπτουσα υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποιεί αυτές τις καταστάσεις όταν ένα κρίσιμο μήκος κύματος αποκτάται, το οποίο μπορεί να δώσει ενέργεια στο δεσμό. Σε αυτό το σημείο, ο δεσμός ο οποίος διεγείρεται θα απορροφήσει το μήκος κύματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας.

- Ραμνολιπίδια

Για την απομόνωση των ραμνολιπιδίων αρχικά γινόταν απομάκρυνση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 13.000g για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο υγρό ρυθμιζόταν το pH στο 3 με υδροχλωρικό οξύ (HCl) και έπειτα ακολουθούσε με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate) μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύτη.

Στο εκχύλισμα προστίθετο Na_2SO_4 για την δέσμευση ενδεχόμενης υγρασίας, ενώ ακολουθούσε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman, πορώδους 11 μm . Ο διαλύτης του εκχυλίσματος εξατμιζόταν στον περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator, BUCHI), ακολουθούσε TLC για την ανίχνευση των ραμνολιπιδίων και εφόσον γινόταν η εξακρίβωση, στο εκχύλισμα γινόταν χρωματογραφία στήλης.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας εκτελούνταν με σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο(CHCl_3):μεθανόλη(CH_3OH):οξικό οξύ(CH_3COOH) σε αναλογία 65:15:2 (v:v:v).

Για την εμφάνιση των κηλίδων πάνω στην πλάκα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο anthrone (63 ml H_2SO_4 , 25 ml H_2O , 0,125 g anthrone).

Για την απομόνωση των ραμνολιπιδίων με χρωματογραφία στήλης, η διαβροχή της στήλης έγινε αρχικά με CHCl_3 (preconditioning). Μετά τη φόρτωση του δείγματος, αφού πρώτα είχε διαλυθεί σε χλωροφόρμιο, ο πρώτος διαλύτης που έτρεξε για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων αλκανίων ήταν το χλωροφόρμιο. Ο δεύτερος διαλύτης για την έκλουση των μονο-ραμνολιπιδίων ήταν μείγμα χλωροφορμίου:μεθανόλη σε αναλογία 5:0,3 και 5:0,5 (v:v).

Τέλος, για την έκλουση των δι-ραμνολιπιδίων χρησιμοποιήθηκε μείγμα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη 5:55 (v:v).

- Σοφορολιπίδια

Η εκχύλιση της εκάστοτε καλλιέργειας για την απομόνωση των σοφορολιπιδίων έγινε με χρήση ολόκληρου του υδατικού διαλύματος, με οξικό αιθυλεστέρα, μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύτη.

Στο εκχύλισμα προστίθετο αλάτι, όπως και στα ραμνολιπίδια, για την συγκράτηση της υγρασίας, φιλτράρισμα και τέλος εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:15:2, v:v:v), ενώ η εμφάνιση των συγκεκριμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο p-Anisaldehyde (H_2O 100 ml, H_2SO_4 2 ml και p-Anisaldehyde 1 ml).

Για την απομόνωση των σοφορολιπιδίων με χρωματογραφία στήλης, η διαβροχή της στήλης έγινε με χλωροφόρμιο, η διάλυση για τη φόρτωση του διαλύματος έγινε

σε χλωροφόρμιο, ενώ οι διαλύτες για την έκλουση των συγκεκριμένων ενώσεων ήταν μείγμα χλωροφορμίου:μεθανόλη, του οποίου η σύσταση μεταβαλλόταν σταδιακά από το 9,8:0,2 στο 6:4 ν:ν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ

Για την εύρεση μικροβιακής κοινότητας, η οποία αποτελείται από βακτήρια που αποδομούν το πετρέλαιο, επιλέχθηκε ο κόλπος της Ελευσίνας και ο κόλπος Κερί της Ζακύνθου.

Ο κόλπος της Ελευσίνας αποτελεί μία από τις πιο ρυπασμένες θαλάσσιες περιοχές της Ελλάδας. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι από την αρχή της βιομηχανικής ανάπτυξης της χώρας μας, αποτέλεσε έδρα για τις περισσότερες βιομηχανίες. Η ΤΙΤΑΝ από το 1929, η Χαλυβουργική, η ΠΕΤΡΟΓΚΑΖ, τα ναυπηγεία Σκαρामαγκά και Ελευσίνας, η ΠΕΤΡΟΛΑ, με την έντονη δραστηριότητα τους έδωσαν τη χαρακτηριστική βολή στη θάλασσα και στον αέρα της περιοχής. Η μεγαλύτερη ζημιά προκλήθηκε στον κόλπο της Ελευσίνας τη δεκαετία 1960-1980 με τη διοχέτευση στη θάλασσα ακατέργαστων τοξικών αποβλήτων της Χαλυβουργικής, δύο οιοπνευματοποιείων (Κρόνος, Βότρυς) και λαδιών των 2 Διυλιστηρίων. Μεγάλη συμβολή είχε επίσης και ο Κεντρικός Αποχετευτικός Αγωγός (Κ.Α.Α.) μιας και είχε υπολογιστεί ότι το 20% των λυμάτων και αποβλήτων απ' αυτόν έφταναν στον κόλπο Ελευσίνας. Ο Κ.Α.Α. από το Νοέμβριο του 1994 δεν εκβάλλει στο Κερατσίνι αλλά με άλλο αγωγό τα υγρά στέλνονται στην Ψυττάλεια για πρωτοβάθμιο καθαρισμό (μείωση ρυπαντικού φορτίου κατά 35%) και δευτεροβάθμιο - βιολογικό καθαρισμό από το καλοκαίρι του 2004 (συνολική μείωση ρυπαντικού φορτίου κατά 93%). Ταυτόχρονα, τα δεκάδες ναυάγια στον κόλπο της Ελευσίνας, έχουν επιβαρύνει επιπλέον τον κόλπο με πετρελαιοειδή υδρογονάνθρακες [93].

Σχετικά με τη Ζάκυνθο, από την αρχαιότητα σε κάποια επιφανειακά κοιλάματα του νησιού ανέβλυζε μαύρο πετρέλαιο, γνωστό ως μαζούτ. Από το 1941 έως το 1945 ο Γερμανικός πολεμικός στόλος έκανε τροφοδοσία καυσίμου πετρελαίου από πετρελαιοπηγές τις οποίες οι Γερμανοί είχαν διανοίξει στην Ζάκυνθο. Αυτές τις πηγές έκλεισαν οι Άγγλοι το 1946. Το 1967 – 1973, πραγματοποιήθηκαν νέες διανοίξεις πετρελαιοπηγών στην Ζάκυνθο και κατασκευάστηκε ένα μικρό διυλιστήριο δοκιμαστικής παραγωγής το οποίο παρήγαγε άριστης ποιότητας πετρελαιοειδή με ελάχιστα ποσοστά θείου, ενώ είχε εκπονηθεί σχεδιασμός

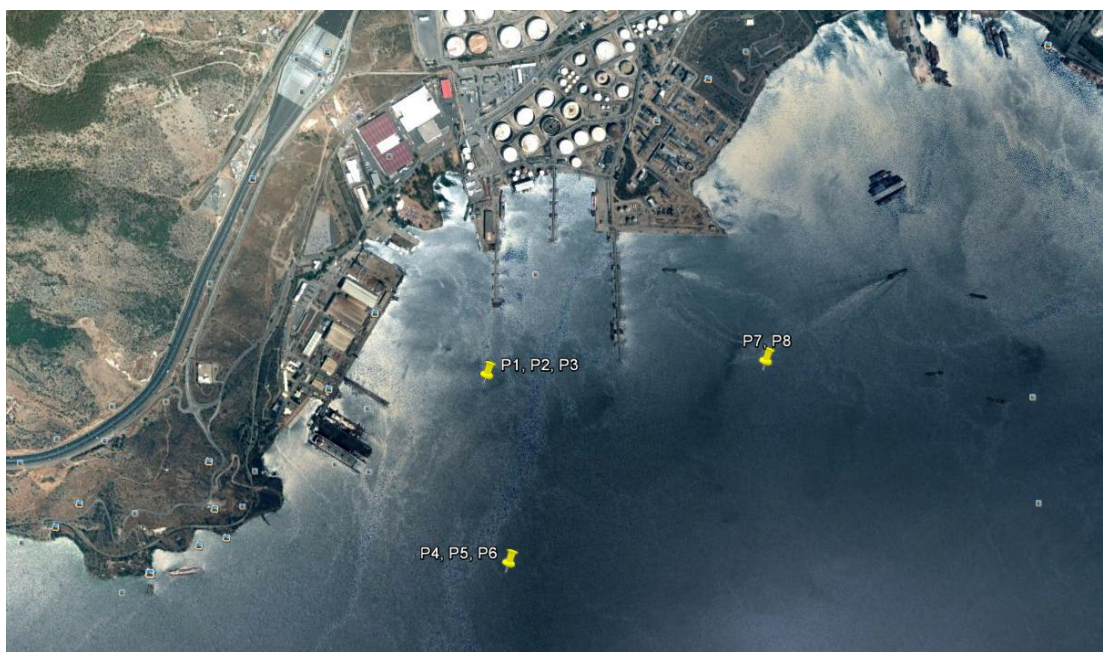
κατασκευής μεγάλου διυλιστηρίου στην Ζάκυνθο. Τα σχέδια για μεγαλύτερης κλίμακας άντλησης πετρελαίου ματαιώθηκαν, με απόφαση της κυβέρνησης [94].

Όλα αυτά, καθιστούν αυτές τις δύο περιοχές πιθανές τοποθεσίες ύπαρξης μικροοργανισμών που είναι εξοικειωμένοι με το πετρέλαιο και που πιθανότητα διαθέτουν τη δυνατότητα να το αποδομήσουν.

3.1 ΚΑΜΠΑΝΙΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

3.1.1 Δειγματοληψία στον κόλπο της Ελευσίνας – 06/04/2011

Στις 6 Μαρτίου πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία με σκοπό την συλλογή αυτόχθονων μικροοργανισμών (βακτηρίων) που να διαθέτουν τη δυνατότητα αποικοδόμησης του πετρελαίου. Τα θαλασσινά δείγματα συλλέχθηκαν σε διάφορα σημεία του κόλπου, τα οποία φαίνονται στο χάρτη. Τα διπλά – τριπλά σημεία αποτελούν σημεία δειγματοληψίας θαλασσινού νερού διαφορετικού βάθους (Πίνακας 3.1).



Σχήμα 3.1: Σημεία δειγματοληψίας στον κόλπο της Ελευσίνας.

Πίνακας 3.1: Χημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	Συντεταγμένες (B)	Συντεταγμένες (E)	Βάθος (m)	Θερμοκρασία (°C)	pH
1	38°30'41,82"	24°01'11,34"	0,5	14,5	7,5
2	38°30'41,82"	24°01'11,34"	5	14	7,4
3	38°30'41,82"	24°01'11,34"	10	14,6	7,5
4	38°01'27,78"	23°30'14,28"	0,5	14	7,1
5	38°01'27,78"	23°30'14,28"	0,5	14	7,4
6	38°01'27,78"	23°30'14,28"	0,5	13,5	7,5
7	38°01'52,68"	23°30'56,34"	0,5	14	7,7
8	38°01'52,68"	23°30'56,34"	5	14	7,7

Η θερμοκρασία των δειγμάτων κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ επίσης οι τιμές του pH κυμαίνονται στο εύρος που αντιστοιχεί σε θαλασσινό νερό.

Πίνακας 3.2: Μικροβιολογικοί δείκτες μόλυνσης των υδάτων για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	<i>E. coli</i> (CFUs ¹ /100mL)	<i>Total coliforms</i> (CFUs ¹ /100mL)	<i>Enterococci</i> (CFUs ¹ /100mL)
1	-	7	2
2	3	9	-
3	28	3	46
4	-	1	2
5	6	4	2
6	11	6	17
7	10	-	2
8	4	3	-

CFUs¹: Colony Forming Units/Αποικίες

Όπως παρατηρείται, το μικροβιακό φορτίο σε όλα τα δείγματα και για όλους τους μικροβιακούς δείκτες ποιότητας υποδηλώνει ότι το θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε είναι αρκετά καλής ποιότητας, χωρίς ύπαρξη μικροβιακής μόλυνσης. Τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα ύδατα κολύμβησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Οδηγία Ευρωπαϊκής Ένωσης 2006/7/EC περί μικροβιολογικής ποιότητας υδάτων κολύμβησης.

Παράμετρος	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα
<i>Enterococci</i> (CFUs ¹ /100 mL)	100	200	185
<i>Escherichia coli</i> (CFUs ¹ /100 mL)	250	500	500

Πίνακας 3.4: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	BOD ₅ (mg/L)	DO (mg/Lt)	Αιωρούμενα στερεά (mg/L)
1	0	6,27	6,33
2	0	7,02	4,6
3	0	7,15	4,43
4	0	7,29	5,53
5	0	7,34	4,9
6	0	7,13	5,73
7	0	6,81	4,7
8	0	7,17	4,5

Το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο ουσιαστικά εκφράζει την ποσότητα του οξυγόνου που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για την αποικοδόμηση των

οργανικών ενώσεων. Επομένως, οι μηδενικές τιμές του βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου, υποδηλώνουν απουσία οργανικού φορτίου.

Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου κυμαίνονται στα φυσιολογικά επίπεδα για θαλασσινό νερό και δεν παρατηρείται μείωση τους καθώς αυξάνεται το βάθος από το οποίο συλλέχθηκε το δείγμα (δείγματα 1-2-3, δείγματα 4-5-6, δείγματα 7-8), γεγονός που δηλώνει ότι η διάχυση του οξυγόνου μέσα στον υδάτινο όγκο πραγματοποιείται επαρκώς.

Τέλος, τιμές των αιωρουμένων στερεών είναι αρκετά χαμηλές, καθώς σύμφωνα με την υπουργική απόφαση ΚΥΑ 46399/1352/3/7/1986, η επιθυμητή τιμή τους για τη διαβίωση ψαριών σε γλυκά νερά (σαφώς αυστηρότερη νομοθεσία) είναι το 25 mg/l.

Πίνακας 3.5: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	PO ₄ (mg/L)	Cl ⁻ (g/L)
1	0,02	12,3
2	0,02	13,1
3	0,02	12,1
4	0,02	11,3
5	0,02	14,3
6	0,08	23,9
7	0,03	13,9
8	0,01	17,8

Τα επίπεδα του φωσφόρου είναι αρκετά χαμηλά σε όλα τα δείγματα και το ίδιο ισχύει και για τα χλωριόντα, τα οποία κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα για το θαλασσινό νερό (~15-20g/l, ανάλογα με την πυκνότητα του νερού).

Πίνακας 3.6: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	Cr (ppb)	RSD ² (ppb)	Ni (ppb)	RSD ² (ppb)	Cu (ppb)	RSD ² (ppb)
1	0,92	3,97	16,38	0,82	6,41	0,49
2	0,82	2,50	21,91	1,16	18,28	0,16
3	0,68	2,03	8,95	0,92	9,34	0,09
4	0,79	1,78	6,49	0,76	7,44	0,69
5	1,09	5,77	14,54	1,13	12,81	0,80
6	0,40	4,32	12,66	0,87	7,25	2,44
7	1,28	0,78	7,14	0,64	5,15	0,83
8	1,10	1,35	15,86	0,83	5,95	0,79

RSD²: Related Standard Deviation (Σχετική τυπική απόκλιση)

Πίνακας 3.7: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

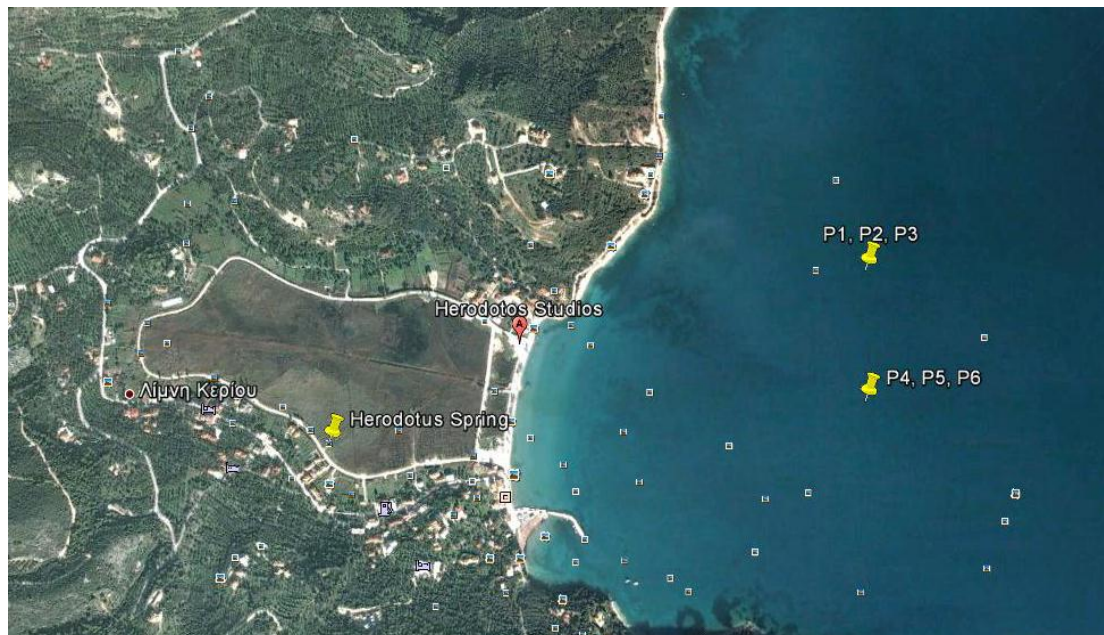
Δείγμα	Zn (ppb)	RSD ² (ppb)	Sn (ppb)	RSD ² (ppb)	Pb (ppb)	RSD ² (ppb)
1	85,27	1,00	<DL		46,82	1,32
2	130,40	0,51	<DL		84,19	0,83
3	54,47	0,44	<DL		6,74	0,64
4	34,47	0,44	<DL		22,31	0,84
5	44,00	0,68	<DL		26,66	0,69
6	22,73	0,45	<DL		19,70	0,85
7	18,40	0,48	<DL		9,30	0,47
8	26,22	0,67	<DL		11,22	0,09

Το ανώτατο επιτρεπτό όριο της συγκέντρωσης χρωμίου στη θάλασσα είναι 0,05ppm, του νικελίου τα 20ppm, του χαλκού τα 2 ppm, του ψευδαργύρου τα 3ppm, του κασσιτέρου τα 50ppm, ενώ του μολύβδου 10ppm.

Από τα αποτελέσματα της ICP-MS παρατηρείται ότι για όλα τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων είναι κατά πολύ μικρότερες του επιτρεπόμενου ορίου, άρα δεν υπάρχει κάποια μόλυνση από τα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα.

3.1.2 Δειγματοληψία από τη Ζάκυνθο – 30/08/2011

Στις 30 Αυγούστου πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δειγματοληψία, για τη συγκέντρωση μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο. Τα σημεία από τα οποία έγινε συλλογή δείγματος παρουσιάζονται στον χάρτη. Από τη θάλασσα σε κάθε σημείο έγινε συλλογή θαλασσινού νερού από τρία διαφορετικά βάθη (Πίνακας 3.8).



Σχήμα 3.2: Σημεία δειγματοληψίας στον κόλπο Κερί.

Πίνακας 3.8: Χημικά χαρακτηριστικά δειγμάτων θαλασσινού νερού.

Δείγμα	Συντεταγμένες (N)	Συντεταγμένες (E)	Βάθος (m)	Θερμοκρασία (°C)	pH
H	37°41'01,77"	20°49'52,87"	0	17	6,8
1	37°41'14,7"	20°50'42,9"	0,5	28	7,4
2	37°41'14,7"	20°50'42,9"	5	27	7,4
3	37°41'14,7"	20°50'42,9"	10	26	7,7
4	37°41'5,04"	20°50'42,96"	0,5	27	7,7
5	37°41'5,04"	20°50'42,96"	5	27	8
6	37°41'5,04"	20°50'42,96"	10	26	7,5

Όπως παρατηρείται, η θερμοκρασία των δειγμάτων ήταν αρκετά υψηλή, γεγονός που δικαιολογείται από την εποχή (τέλη Αυγούστου). Το pH των δειγμάτων κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Πίνακας 3.9: Μικροβιολογικοί δείκτες μόλυνσης των υδάτων για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	E. coli (CFUs/100mL)	Total coliforms (CFUs/100mL)	Enterococci (CFUs/100mL)
H	3	6	1
1	12	5	-
2	19	-	28
3	-	1	4
4	9	3	4
5	7	2	-
6	15	11	9

Οι μικροβιολογικοί δείκτες, σε σύγκριση με τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Πίνακας 3.3) υποδηλώνουν ότι το νερό που εξετάστηκε, αποτελεί νερό κολύμβησης εξαιρετικής ποιότητας, απουσία μικροβιακού φορτίου.

Πίνακας 3.10: Χημικές αναλύσεις για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Δείγμα	BOD ₅ (mg/L)	DO (mg/l)	Suspended Solids (mg/L)
H	0	4,8	5,62
1	0	4,88	4,98
2	0	5,27	5,37
3	0	5,3	4,82
4	0	5,2	5,03
5	0	5,6	5,97
6	0	5,63	5,46

Το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο και για τα επτά δείγματα που εξετάστηκαν είναι μηδέν, γεγονός που αποδεικνύει απουσία οργανικού φορτίου, άρα και ρύπανσης. Το διαλυμένο οξυγόνο είναι χαμηλότερο σε σχέση με τα δείγματα που εξετάστηκαν από την Ελευσίνα, αλλά ακόμα και εδώ κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Και σε αυτή την περίπτωση στα δείγματα που αυξάνεται το βάθος (1-2, 3-4, 5-6), δεν παρατηρείται μείωση του διαλυμένου οξυγόνου με την αύξηση του βάθους, πράγμα που σημαίνει ότι η διάχυση του οξυγόνου λαμβάνει χώρα επιτυχώς.

Οι χαμηλές τιμές των αιωρούμενων σωματιδίων είναι αρκετά χαμηλότερες από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια, επομένως η περιοχή που εξετάστηκε δεν παρουσιάζει μόλυνση.

Πίνακας 3.11: Χημικές αναλύσεις δειγμάτων θαλασσινού νερού.

Sample	PO ₄ (mg/L)	Cl ⁻ (g/L)
H	0,01	5,6
1	0,03	15,6
2	0,05	14,3
3	0,01	17,5
4	0,03	12,9
5	0,01	15,8
6	0,01	18,4

Οι τιμές ολικού φωσφόρου που υπολογίστηκαν είναι αρκετά χαμηλές. Αυτό είναι λογικό, καθώς το θαλασσινό νερό με τη συνεχή κίνηση του οδηγεί σε έκπλυση αυτού του συστατικού.

Τα χλωριόντα για τα δείγματα από το 1 έως το 6 έχουν φυσιολογικές τιμές, με μόνη διαφορά το δείγμα από την Πηγή του Ηροδότου. Στο δείγμα αυτό, η συγκέντρωση του χλωρίου είναι οριακά στη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο θαλασσινό νερό.

Πίνακας 3.12: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Sample	Cr (ppb)	RSD (ppb)	Ni (ppb)	RSD (ppb)	Cu (ppb)	RSD (ppb)
H	0,13	3,08	2,41	0,74	1,33	1,82
1	0,27	1,63	4,70	1,87	2,95	0,69
2	0,14	1,32	1,56	3,54	2,82	1,07
3	0,07	6,10	0,71	4,90	1,24	0,76
4	0,11	0,69	0,88	5,14	1,39	0,10
5	0,17	1,28	1,96	3,33	1,79	2,31
6	0,12	4,75	0,91	4,26	1,63	0,92

Πίνακας 3.13: Βαρέα μέταλλα για τα δείγματα του θαλασσινού νερού.

Sample	Zn (ppb)	RSD (ppb)	Sn (ppb)	RSD (ppb)	Pb (ppb)	RSD (ppb)
H	4,70	0,14	<DL		<DL	
1	26,90	0,43	<DL		19,11	0,49
2	9,42	1,38	<DL		3,63	0,53
3	5,44	1,67	<DL		0,74	2,59
4	6,50	0,47	<DL		0,82	3,51
5	8,26	0,48	<DL		0,48	3,52
6	6,47	0,25	<DL		0,25	4,22

Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα δείγματα είναι πολύ μικρότερες από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια, πράγμα που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει πρόβλημα μόλυνσης από τα συγκεκριμένα βαρέα μέταλλα στον κόλπο Κερί και στην πηγή του Ηροδότου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ ΑΠΟ ΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ – ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Η βιοαποικοδόμηση οργανικών ενώσεων (φυσικής προέλευσης ή ξενοβιοτικών) αποτελεί μία διεργασία κατά την οποία τα ένζυμα των μικροοργανισμών, καταλύουν τη διάσπαση των οργανικών χημικών ουσιών φυσικής ή ανθρωπογενούς προέλευσης. Η βιοαποικοδόμηση μπορεί να σταματήσει είτε μετά από κάποια συγκεκριμένα βήματα μετατροπής των ουσιών αυτών, είτε να συνεχιστεί μέχρι την πλήρη αποικοδόμηση τους. Την υψηλότερη βιοαποικοδομητική ικανότητα την φέρουν μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαθέτουν από τη φύση τους τη συγκεκριμένη μεταβολική ιδιότητα. Συχνά, η πλήρης αποδόμηση επιτυγχάνεται παρουσία μεικτής μικροβιακής κοινότητας, όπου οι μεταβολίτες που παράγονται από το ένα μικροβιακό στέλεχος, αποικοδομούνται περαιτέρω από τα άλλα μικροβιακά στελέχη.

Μέχρι τώρα, έρευνες των βιοχημικών μονοπατιών των μικροοργανισμών που αποικοδομούν ρύπους, και των ενζύμων που καταλύουν τη διεργασία αυτή, έδειξαν ότι η βιοαποδόμηση πραγματοποιείται πιο απλά όταν χρησιμοποιούνται εμπλουτισμένες καλλιέργειες μικροοργανισμών, ή καθαρά στελέχη. Ανάλογα με την προέλευση του δείγματος, προκύπτουν και οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του κατά των εμπλουτισμό των μικροβιακών κοινοτήτων.

Οι ποικιλία των μικροοργανισμών σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα είναι μεγάλη και αυτό κάνει τη βιοχημική ικανότητα αυτής της φυσικής μεικτής μικροβιακής κοινότητας τεράστια. Κάποιες συγκεκριμένες ενζυματικές ιδιότητες προς τον ξενιστή ρύπο είναι παρούσες, αλλά οι μικροοργανισμοί που τις διαθέτουν αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό του μικροβιακού συνόλου.

Για το λόγο αυτό, για την επιτυχή απομόνωση μικροοργανισμών που αποικοδομούν τον επιθυμητό ρύπο, πραγματοποιούνται εμπλουτισμοί των αρχικών δειγμάτων. Οι εμπλουτισμοί πραγματοποιούνται μέσω εκλεκτικού θρεπτικού μέσου και επώασης των δειγμάτων στην

κατάλληλη θερμοκρασία, έτσι ώστε να απομονωθούν μικροοργανισμοί απ' ευθείας από τη φύση. Συνήθως, σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται ο ξενιστής – ρύπος ως μοναδική πηγή άνθρακα, και έτσι απομονώνονται μόνο οι μικροοργανισμοί που διαθέτουν την ιδιότητα να μεταβολίζουν τον ρύπο.

Μία άλλη μέθοδος απομόνωσης της μικροβιακής κοινότητας που αποικοδομεί συγκεκριμένο ρύπο, είναι μέσω της τεχνικής του στερεού υποστρώματος. Χρησιμοποιώντας εκλεκτικό υπόστρωμα και ξεχωρίζοντας τα χαρακτηριστικά κάθε γένους από το είδος των αποικιών που σχηματίζουν, μπορεί να πραγματοποιηθεί αρκετά απλά και γρήγορα διαχωρισμός των διαφορετικών μικροβιακών στελεχών [95].

Το βασικό χαρακτηριστικό των κοινοτήτων που ενδιαφέρει στην περίπτωση της βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου είναι η υδροφοβικότητα, καθώς όσο αυξάνεται η ελαιοφίλη φύση τους, τόσο πιο εύκολη είναι η προσκόλληση τους στο αργό πετρέλαιο και κατά συνέπεια η διάσπαση του συγκεκριμένου ρύπου.

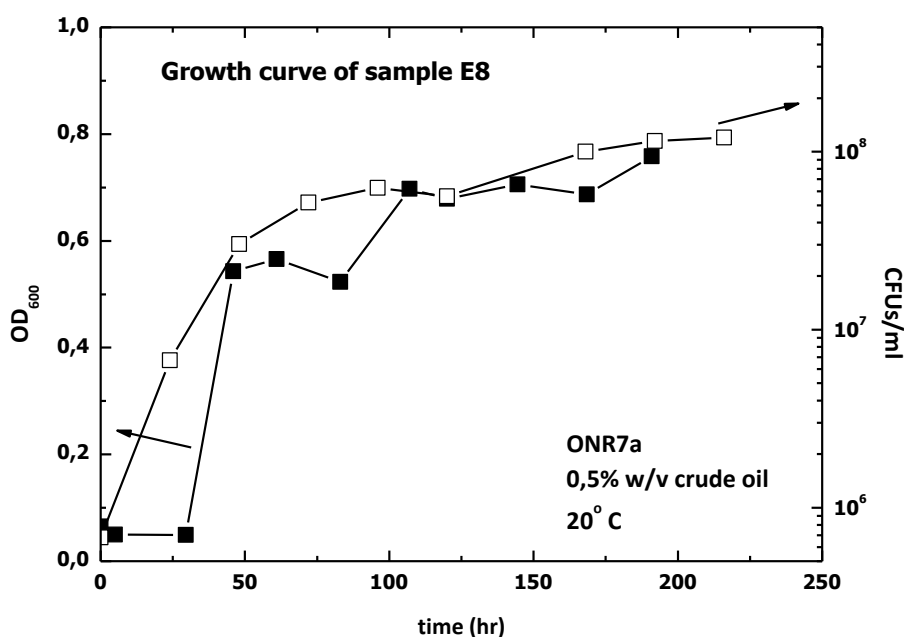
Στη συγκεκριμένη εργασία, στα αρχικά θαλασσινά δείγματα νερού που συλλέχθηκε από ρυπασμένες περιοχές και περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 3, πραγματοποιήθηκαν πέντε συνεχόμενες υγρές ανακαλλιέργειες, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο εμπλουτισμός της βακτηριακής κοινότητας σε μικροοργανισμούς που αποικοδομούν το πετρέλαιο. Στη συνέχεια ακολούθησαν πέντε συνεχόμενες απομονώσεις μέσω στερεού υποστρώματος.

Στα απομονωμένα τελικά δείγματα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του ρυθμού ανάπτυξης, της υδροφοβικότητας και τέλος φυλογενετική ανάλυση.

4.1. ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ (Growth curve)

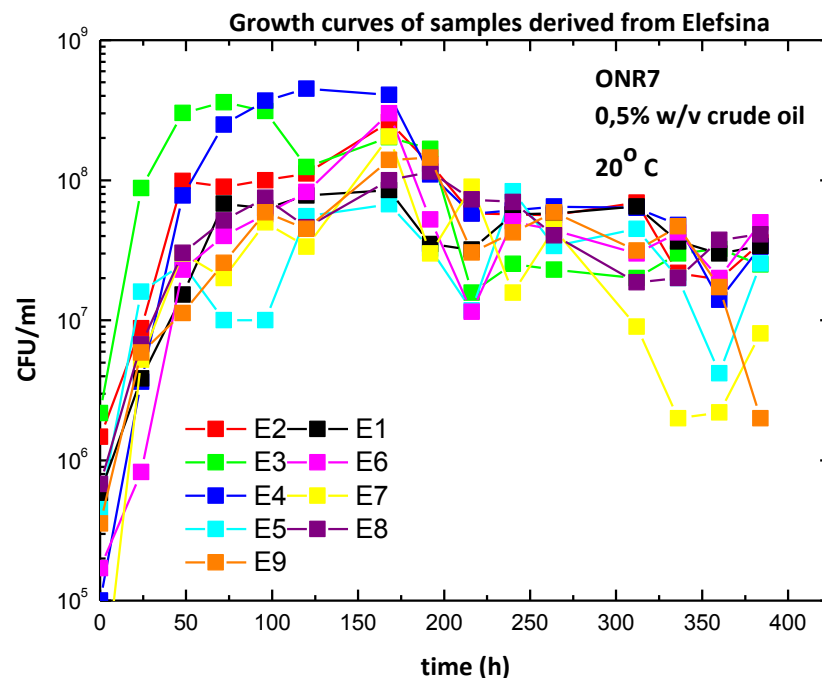
Σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν, δημιουργήθηκε η καμπύλη ανάπτυξης στο θρεπτικό υγρό μέσο ONR7. Στις συνθήκες απουσίας θρεπτικών, που επικρατούν στο υγρό μέσο που χρησιμοποιήθηκε, στις 24 ώρες περνούσαν από τη φάση προσαρμογής στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Μετά από 50 ώρες επώασης στο υγρό θρεπτικό μέσο έφταναν στην στάσιμη φάση, όπου και έμεναν για πάνω από 200 ώρες.

Ενδεικτικά παρατίθεται η καμπύλη ανάπτυξης του δείγματος 8 από την Ελευσίνα, στην οποία συγκρίνονται η μέθοδος της οπτικής απορρόφησης της πυκνότητας με την καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ενώ παρατίθενται και οι καμπύλες ανάπτυξης όλων των εμπλουτισμένων δειγμάτων, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση της βακτηριακής ανάπτυξης μεταξύ των κοινοτήτων. Όλες οι εμφανιζόμενες τιμές αποτελούν μέσο όρο από τις μετρήσεις των πέντε συνεχόμενων εμπλουτισμών.



Σχήμα 4.1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροβιακής κοινότητας που απομονώθηκε από το δείγμα E8. Τα κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, ενώ τα ανοιχτά στις μετρούμενες αποικίες.

Όπως παρατηρείται, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου της οπτικής απορρόφησης και της καλλιεργητικής μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, αν και στην περίπτωση της καλλιεργητικής μεθόδου το υπολογιζόμενο μέγεθος είναι σχετικά αυξημένο σε κάποιες περιπτώσεις. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι ορισμένα στελέχη βακτηρίων δεν μετρώνται κατά την οπτική απορρόφηση. Ειδικά τις πρώτες 24 ώρες όπου οι μικροοργανισμοί έχουν μικρή βακτηριακή δραστηριότητα, δεν δημιουργείται η θολότητα στο μετρούμενο δείγμα, η οποία μετράται κατά την οπτική απορρόφηση.

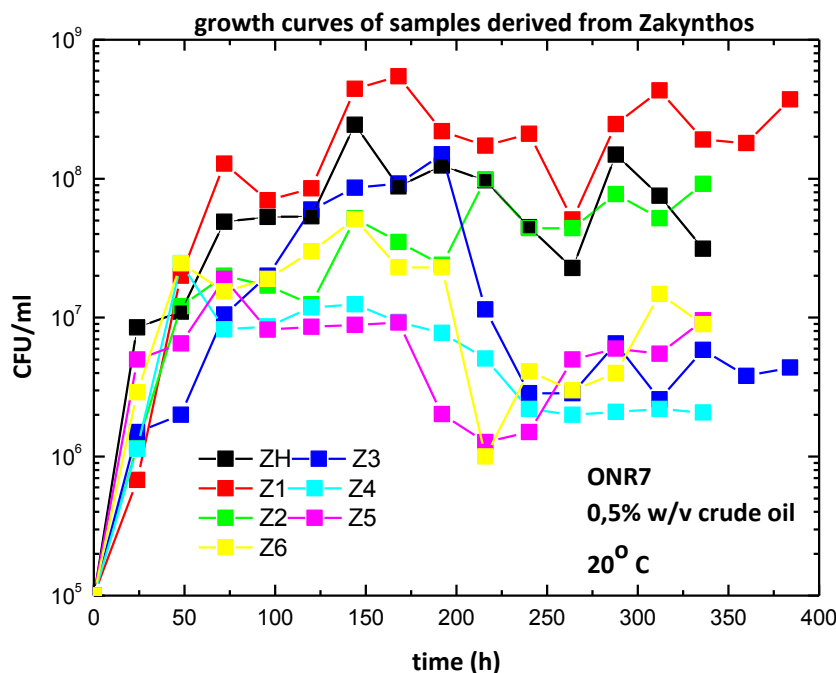


Σχήμα 4.2: Καμπύλη ανάπτυξης των μικροβιακών δειγμάτων που απομονώθηκαν από τον κόλπο της Ελευσίνας.

Όπως φαίνεται από το συγκριτικό διάγραμμα της ανάπτυξης των μικροβιακών κοινοτήτων από την Ελευσίνα, όλες οι κοινότητες φτάνουν σε 50 περίπου ώρες στην στάσιμη φάση και παραμένουν σε αυτή για τις επόμενες 150 ώρες.

Οι καμπύλες ανάπτυξης που παρατίθενται παραπάνω, αναφέρονται σε καλλιέργειες στο υγρό θρεπτικό μέσο ONR7 με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 0,5% w/v στους 20° C.

Η μεγαλύτερη βακτηριακή ανάπτυξη για τις δεδομένες συνθήκες παρατηρούνται για τις κοινότητες E4 και E5, αν και οι διαφορές στο μέγεθος της ανάπτυξης μεταξύ των δειγμάτων είναι μικρές.



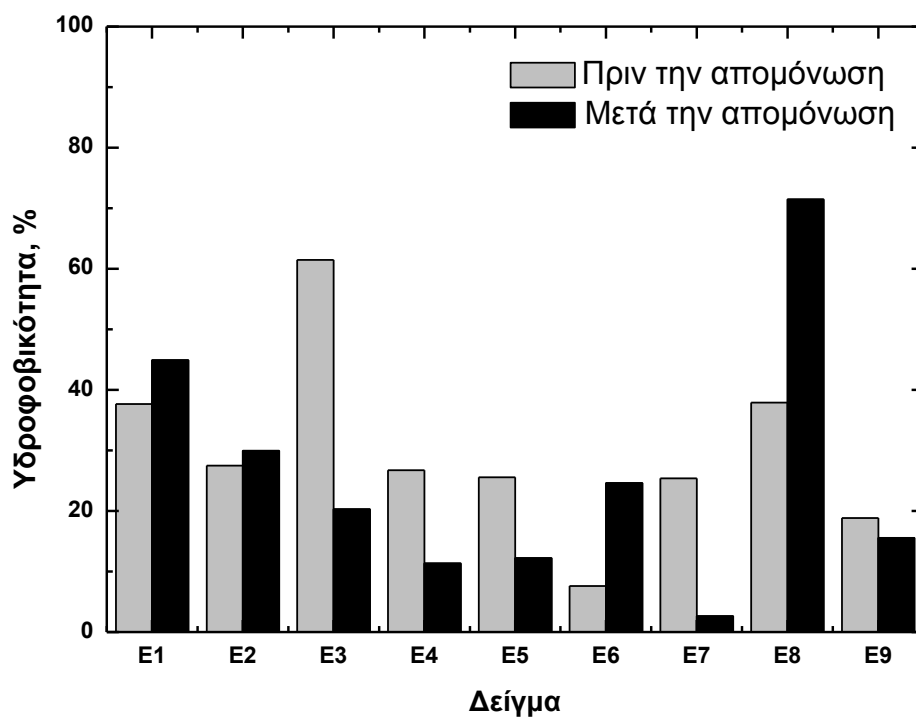
Σχήμα 4.3: Καμπύλη ανάπτυξης των μικροβιακών δειγμάτων που απομονώθηκαν από την Ζάκυνθο.

Οι μικροβιακές κοινότητες που απομονώθηκαν από την Ζάκυνθο, παρουσίασαν αρκετά χαμηλότερη βακτηριακή ανάπτυξη σε σχέση με τις κοινότητες της Ελευσίνας, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 4.3. Μόλις τρεις από τις κοινότητες (ZH, Z1 & Z2) φτάνουν στα επίπεδα της ανάπτυξης των κοινοτήτων της Ελευσίνας. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, από τη στιγμή που τα συγκεκριμένα δείγματα της Ζακύνθου άνηκαν σε σαφώς λιγότερο μολυσμένο περιβάλλον (κόλπος Κερί) από τον συγκεκριμένο ρύπο, σε σχέση με τον μολυσμένο επί χρόνια -λόγω της έντονης βιομηχανικής δραστηριότητας- κόλπο της Ελευσίνας (ΕΛΠΕ).

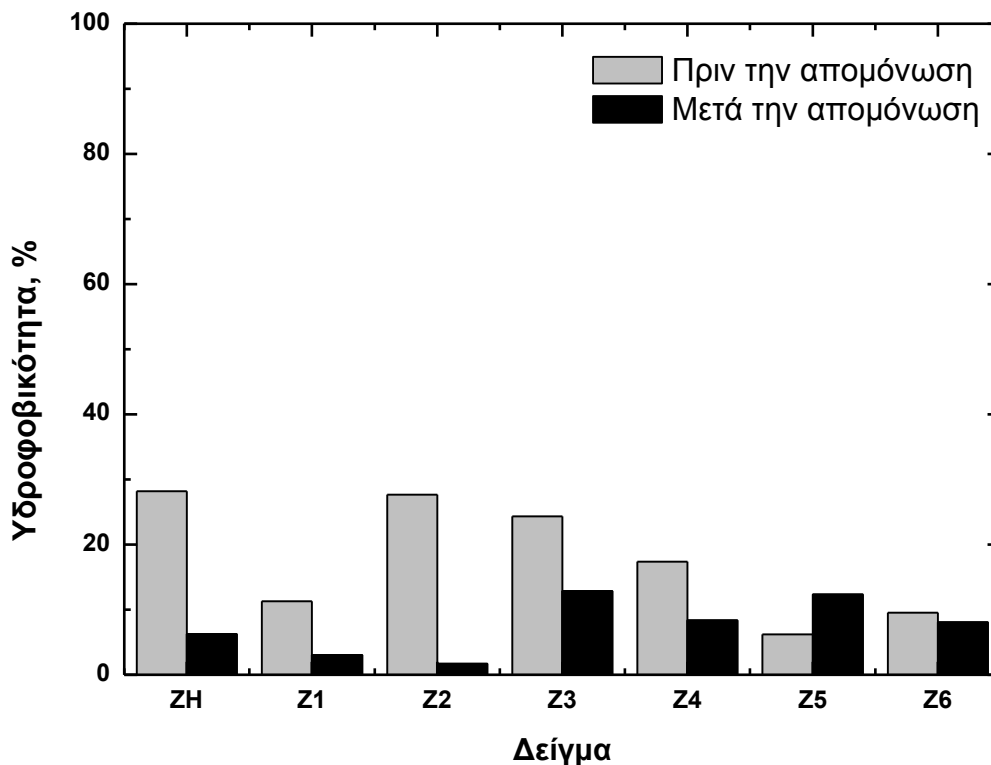
4.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ (MATH test)

Σε κάθε περίπτωση δειγμάτων, Ελευσίνας και Ζακύνθου, υπολογίστηκαν οι υδροφοβικότητες των βακτηριακών δειγμάτων πριν και μετά την απομόνωση τους. Πριν την απομόνωση έχουμε ολόκληρη την μικροβιακή κοινότητα που υπήρχε στο θαλασσινό δείγμα, ενώ μετά έχουμε την κοινότητα που διαθέτει την ικανότητα να αποικοδομεί τα πετρελαιοειδή (Hydrocarbon degraders).

Στα ακόλουθα δύο σχήματα παρατίθενται οι εκτιμώμενες υδροφοβικότητες, για τα δείγματα που απομονώθηκαν από την Ελευσίνα και από την Ζάκυνθο.



Σχήμα 4.4: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών δειγμάτων από τον κόλπο της Ελευσίνας πριν και μετά την απομόνωση.



Σχήμα 4.5: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών δειγμάτων από την Ζάκυνθο πριν και μετά την απομόνωση.

Όπως φαίνεται από τα δύο διαγράμματα, η εκτιμώμενη υδροφοβικότητα των μικροβιακών πληθυσμών στην περίπτωση της Ζακύνθου είναι αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με αυτή που παρουσιάζουν οι μικροβιακές κοινότητες από την Ελευσίνα. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί – έμμεσα- στο συμπέρασμα ότι οι απομονωμένες κοινότητες από την Ελευσίνα αποτελούνται από πολύ περισσότερα στελέχη βακτηρίων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από το ότι ο κόλπος της Ελευσίνας, δεδομένης της ύπαρξης δύο διυλιστηρίων, είναι πιο επιβαρυνμένος από πετρελαιοειδή, και επομένως η μικροβιακή του ποικιλότητα αποτελείται από στελέχη τα οποία είναι εξοικειωμένα με τους συγκεκριμένους ρύπους.

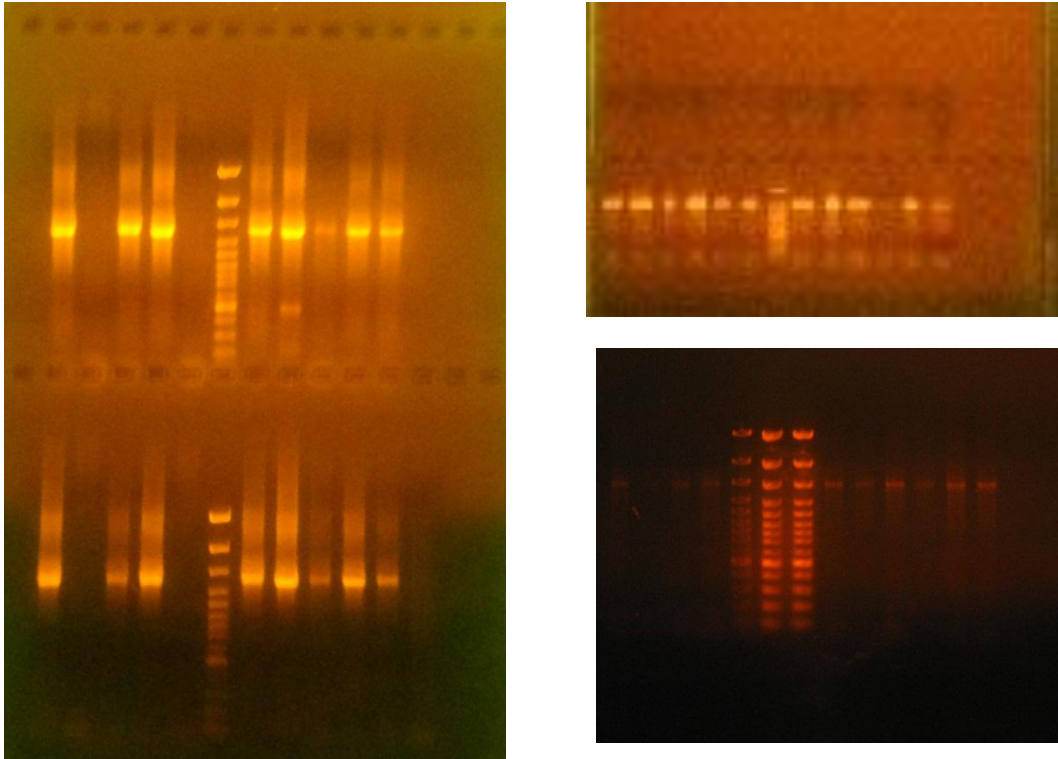
Τέλος, μέσω του συγκεκριμένου τεστ, απομονώθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός κάθε δείγματος που προσκολλήθηκε στην ελαιώδη φάση, ούτως ώστε να καταλήξουμε σε μία απομονωμένη

μικροβιακή κοινότητα από βακτήρια τα οποία παράγουν βιοτασιενεργές ουσίες. Η στρατηγική αυτή βασίστηκε στο ότι από τη στιγμή όπου τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε ελαιώδη φάση, είναι αυτά τα οποία έχουν την αντίστοιχη ιδιότητα προσκόλλησης στο πετρέλαιο, όπου για να γίνει η αποικοδόμηση του, πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση του μέσω των βιοτασιενεργών ουσιών.

4.3. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Εφόσον επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη καλής ποιότητας και αρκετής ποσότητας απομονωμένου γενετικού υλικού μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του γενετικού υλικού από τις κοινότητες που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2.

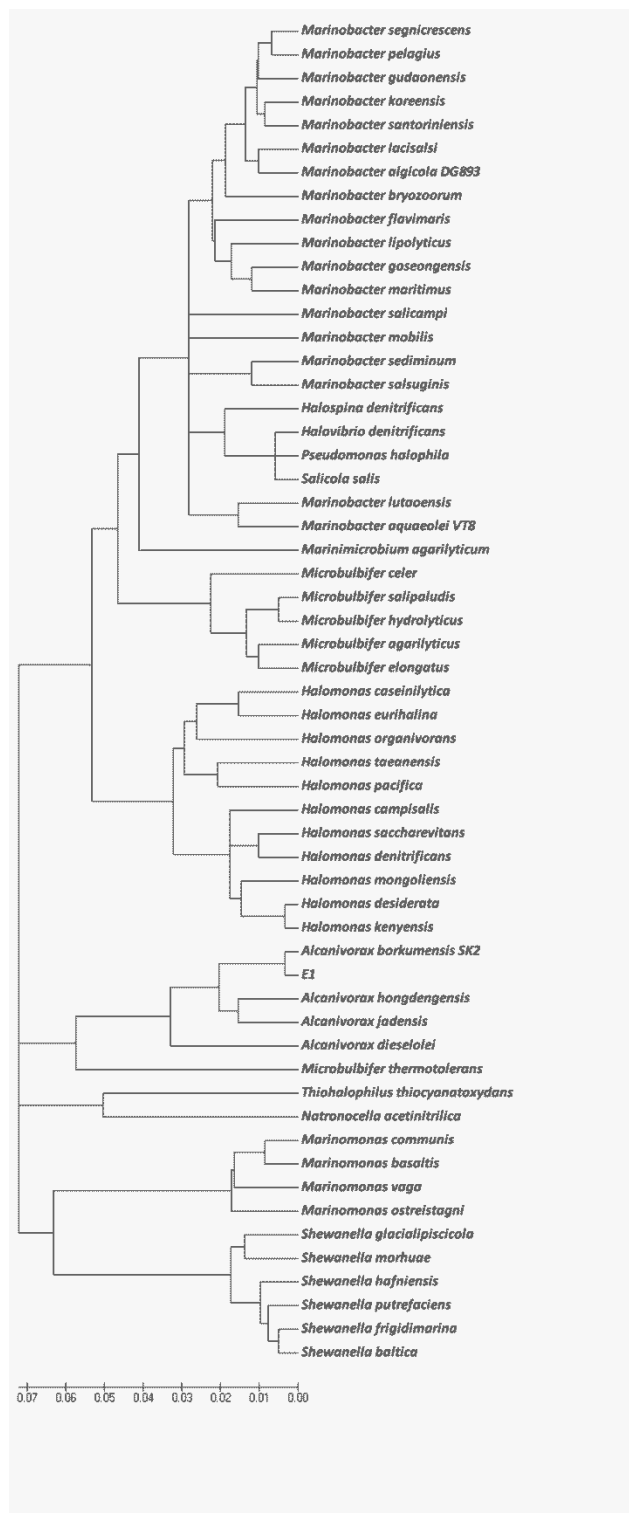
Μετά το πέρας της αντίδρασης της PCR, επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη (Σχήμα 4.6).



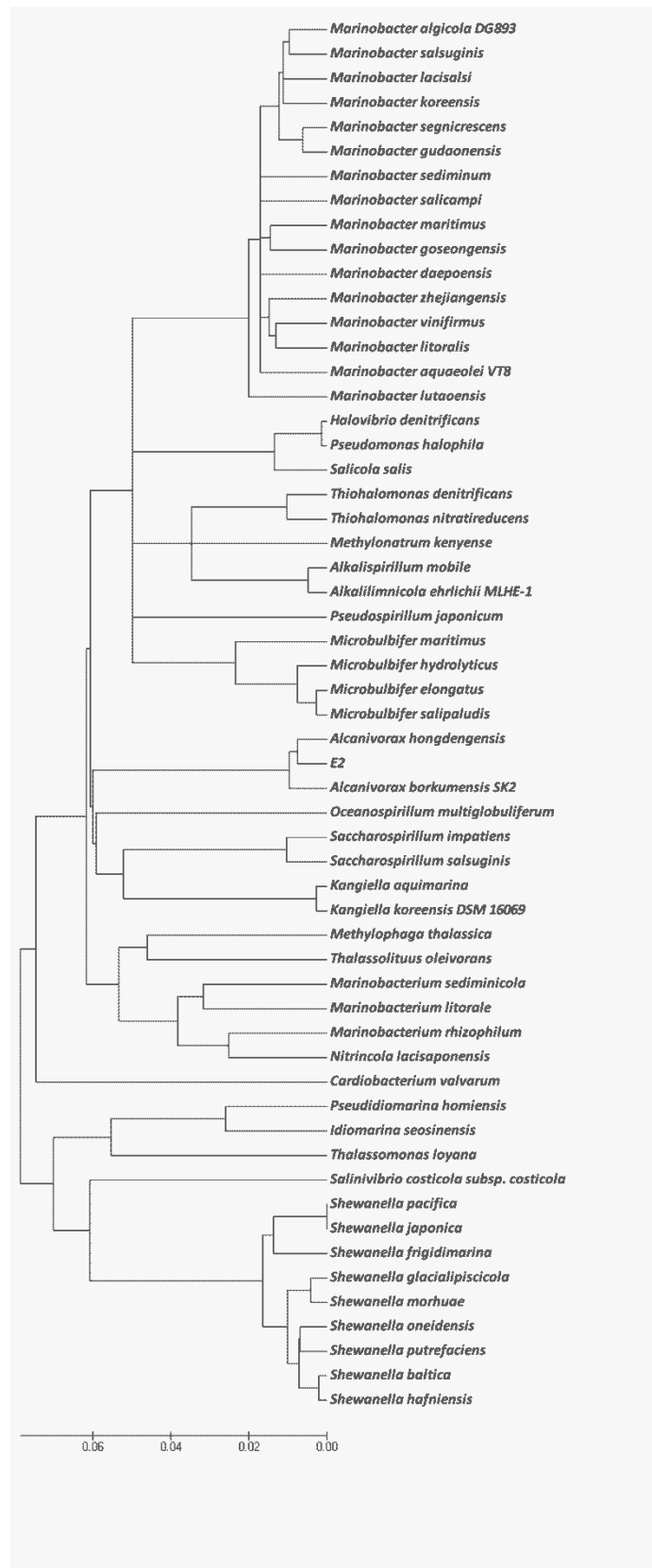
Σχήμα 4.6: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της Ζακύνθου (αριστερά) και της Ελευσίνας (δεξιά – πάν και κάτω) μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στη θέση 6 (αριστερά) και 7 (δεξιά) έχει φορτωθεί ο ιχνηθέτης 100bp plus και 1 Mbp (αντίστοιχα).

Όπως φαίνεται και από την εικόνα, η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος στα 1500 ζεύγη βάσεων είναι εμφανής.

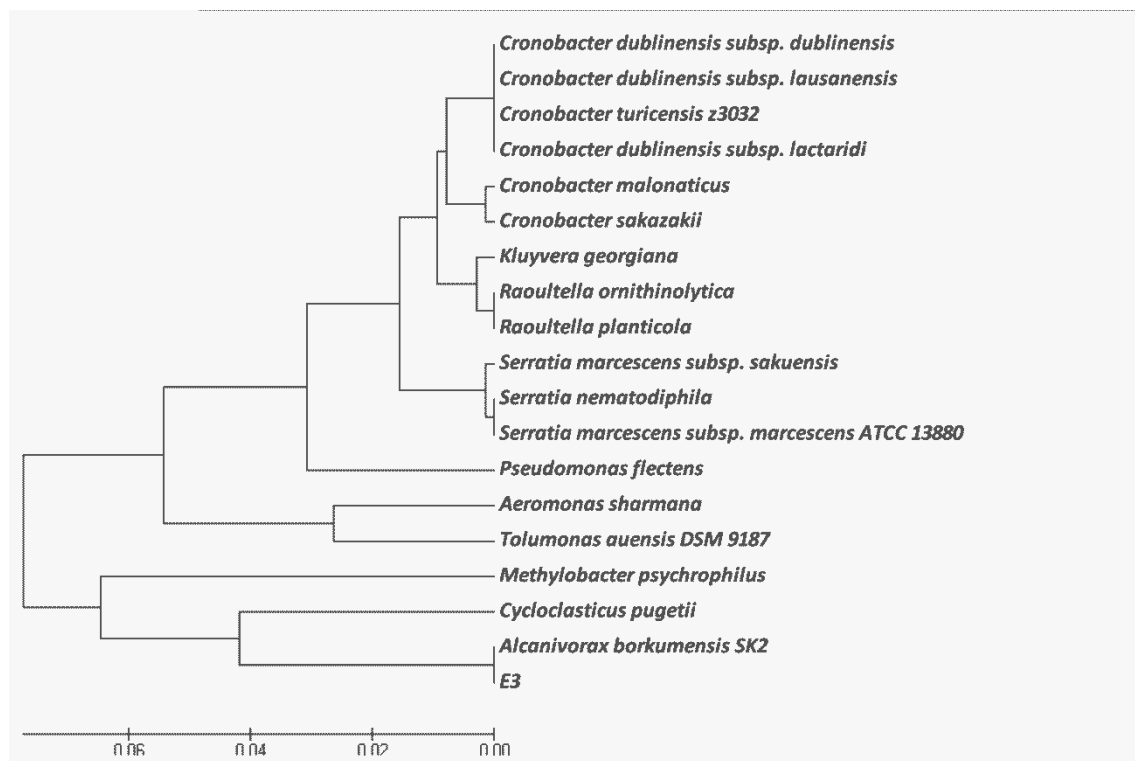
Στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, έγινε καθαρισμός και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Βάσει των αποτελεσμάτων και μετά από την διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, δημιουργήθηκαν τα ακόλουθα φυλογενετικά δένδρα.



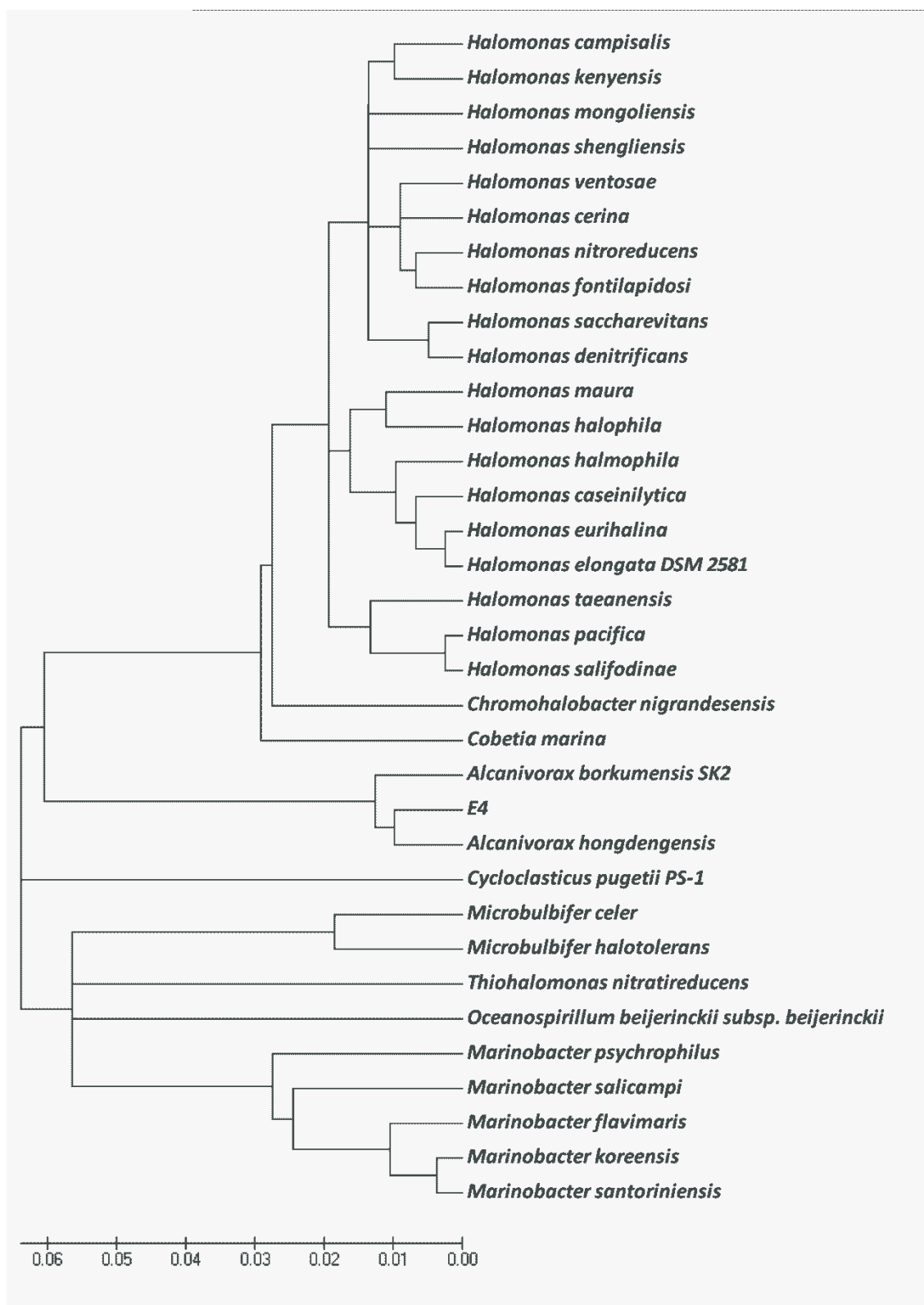
Σχήμα 4.7: Φυλογενετικό δένδρο του απομονωμένου δείγματος E1.



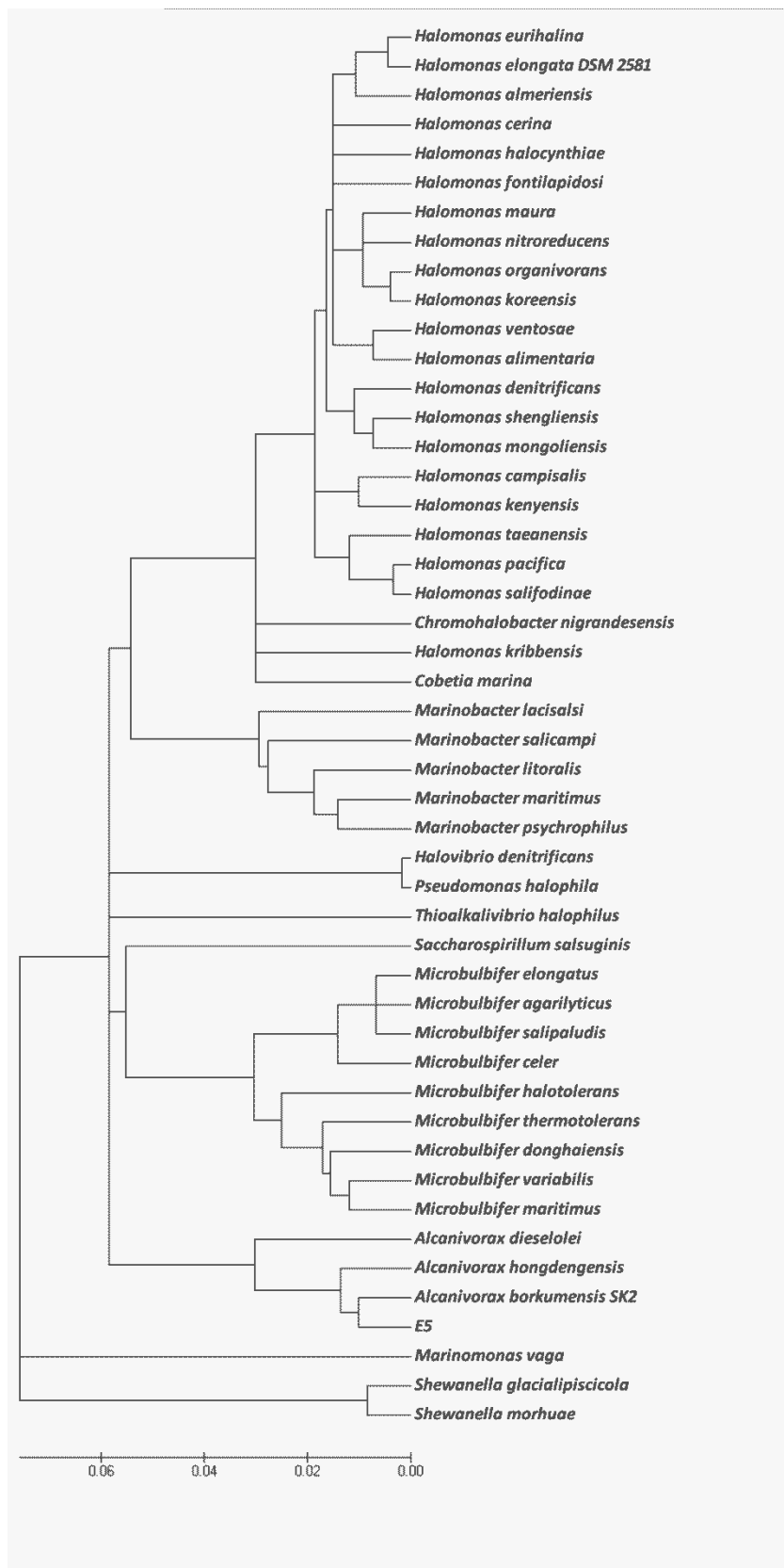
Σχήμα 4.8: Φυλογενετικό δένδρο του απομονωμένου δείγματος E2.



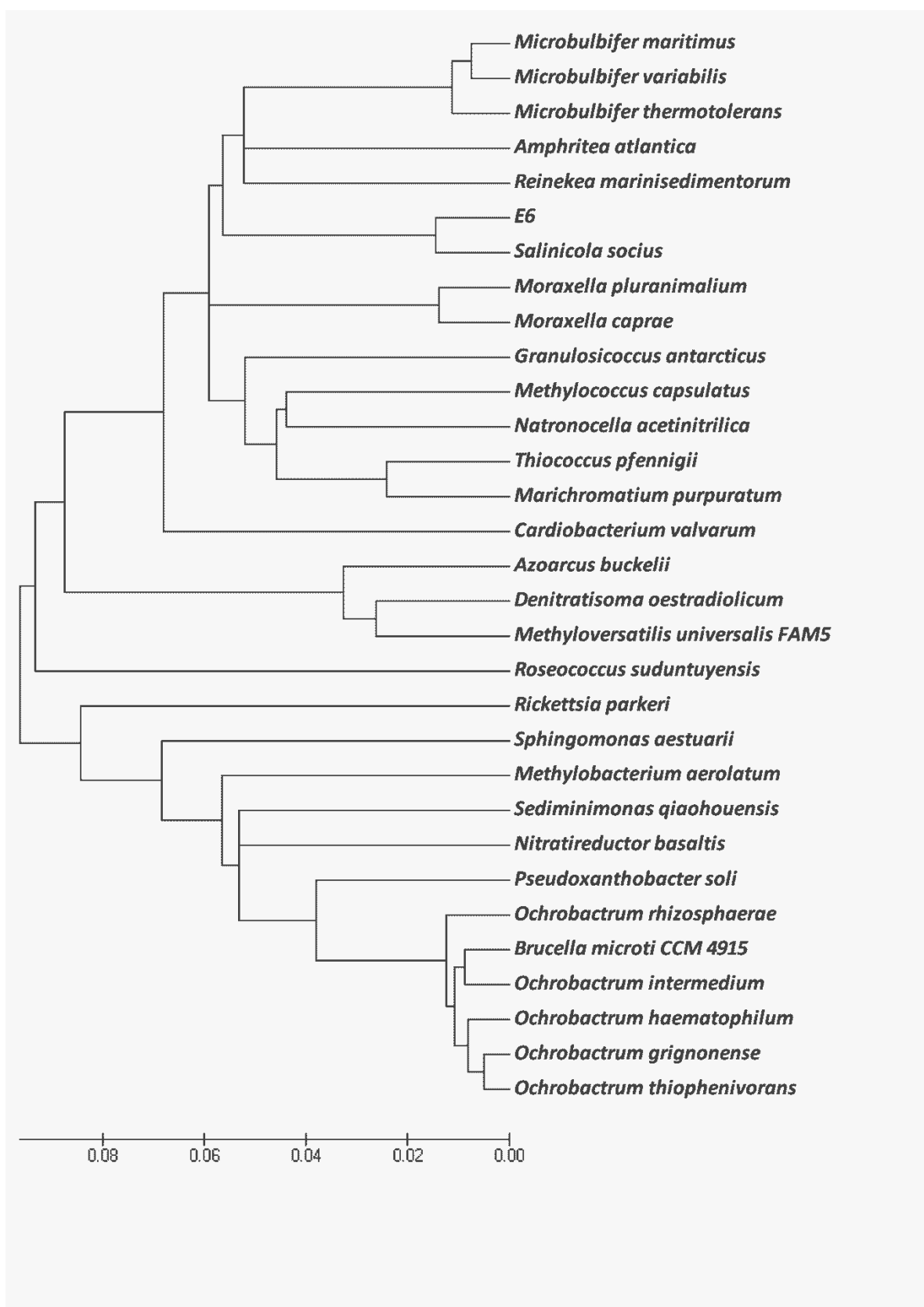
Σχήμα 4.9: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E3.



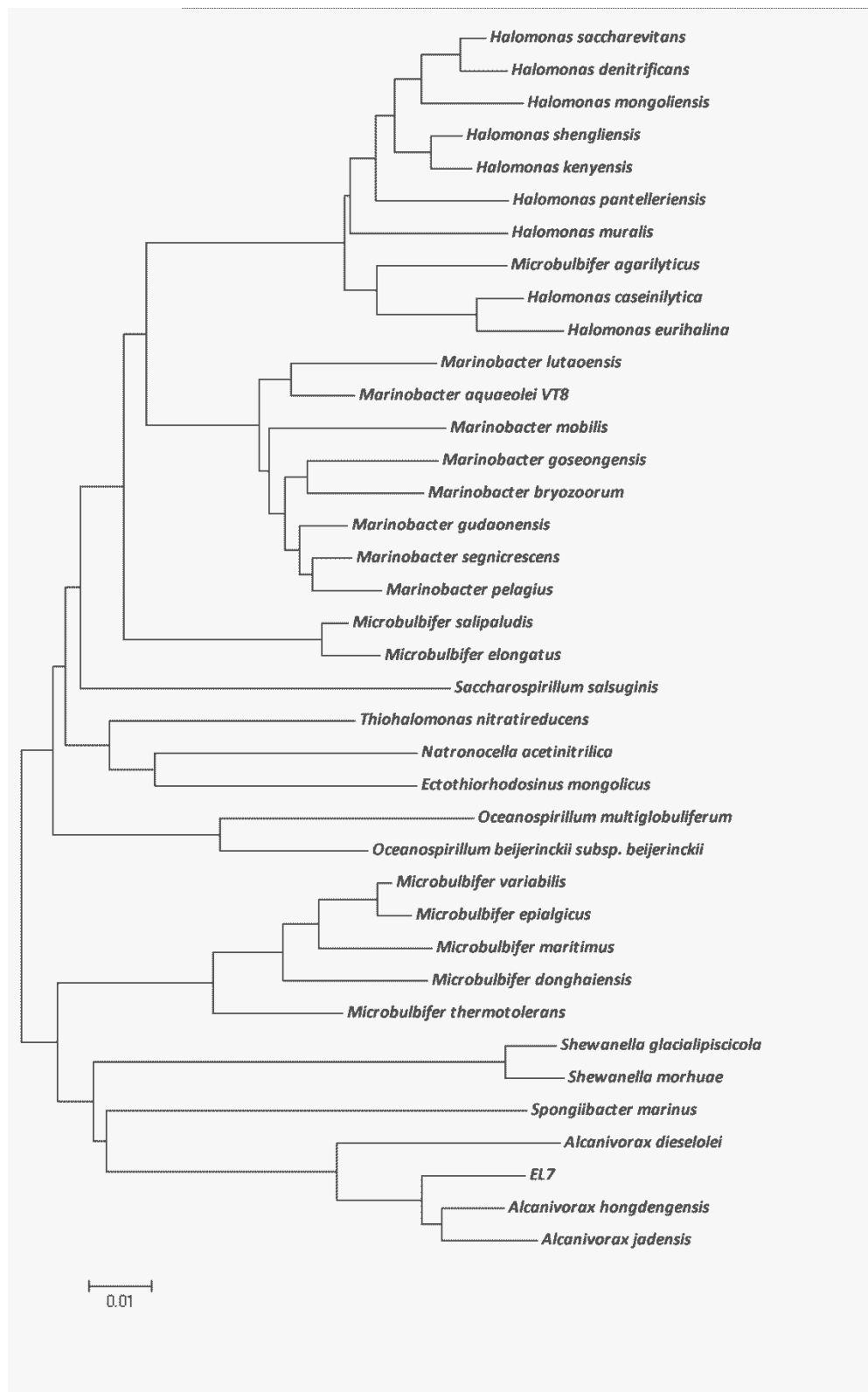
Σχήμα 4.10: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E4.



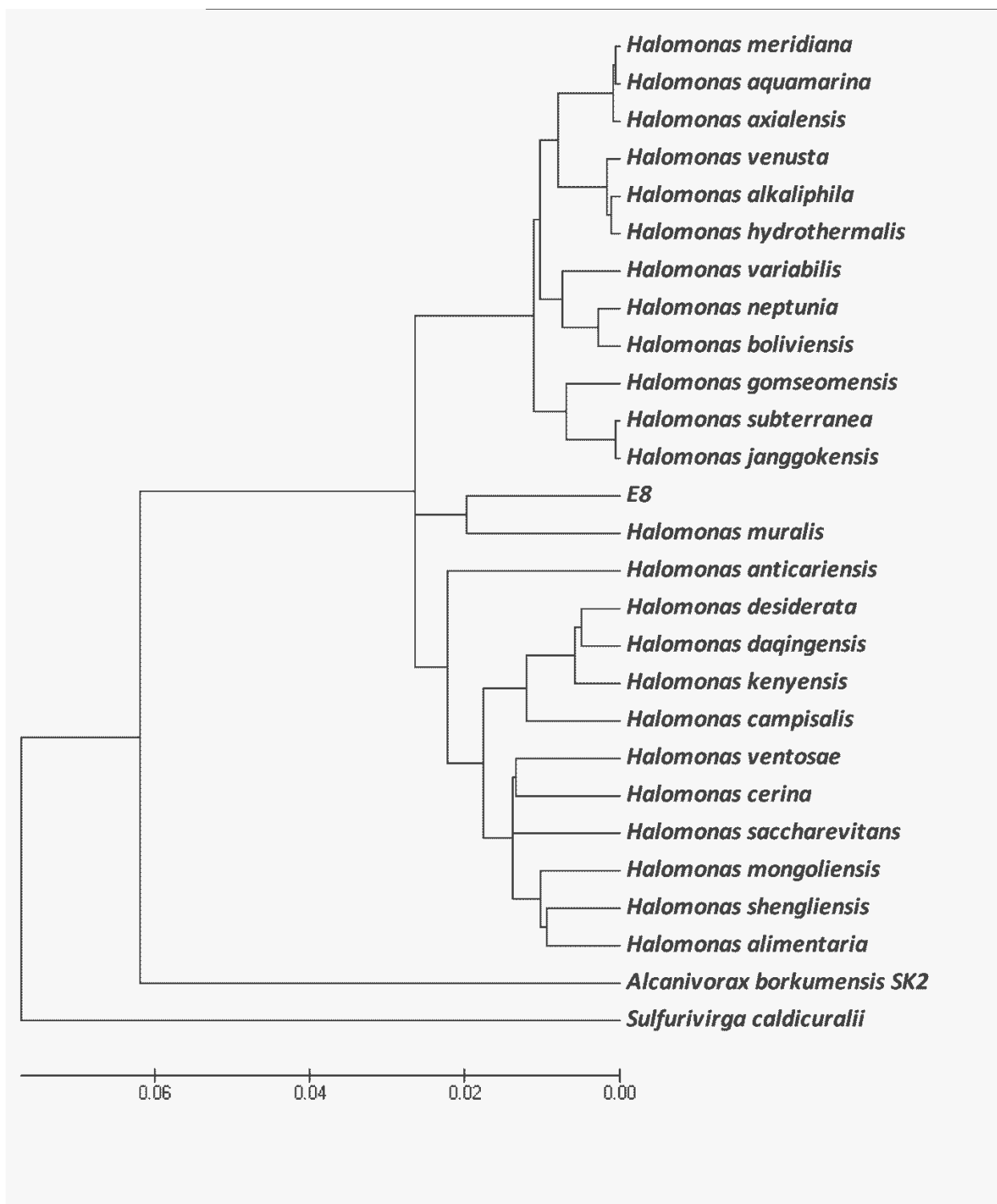
Σχήμα 4.11: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E5.



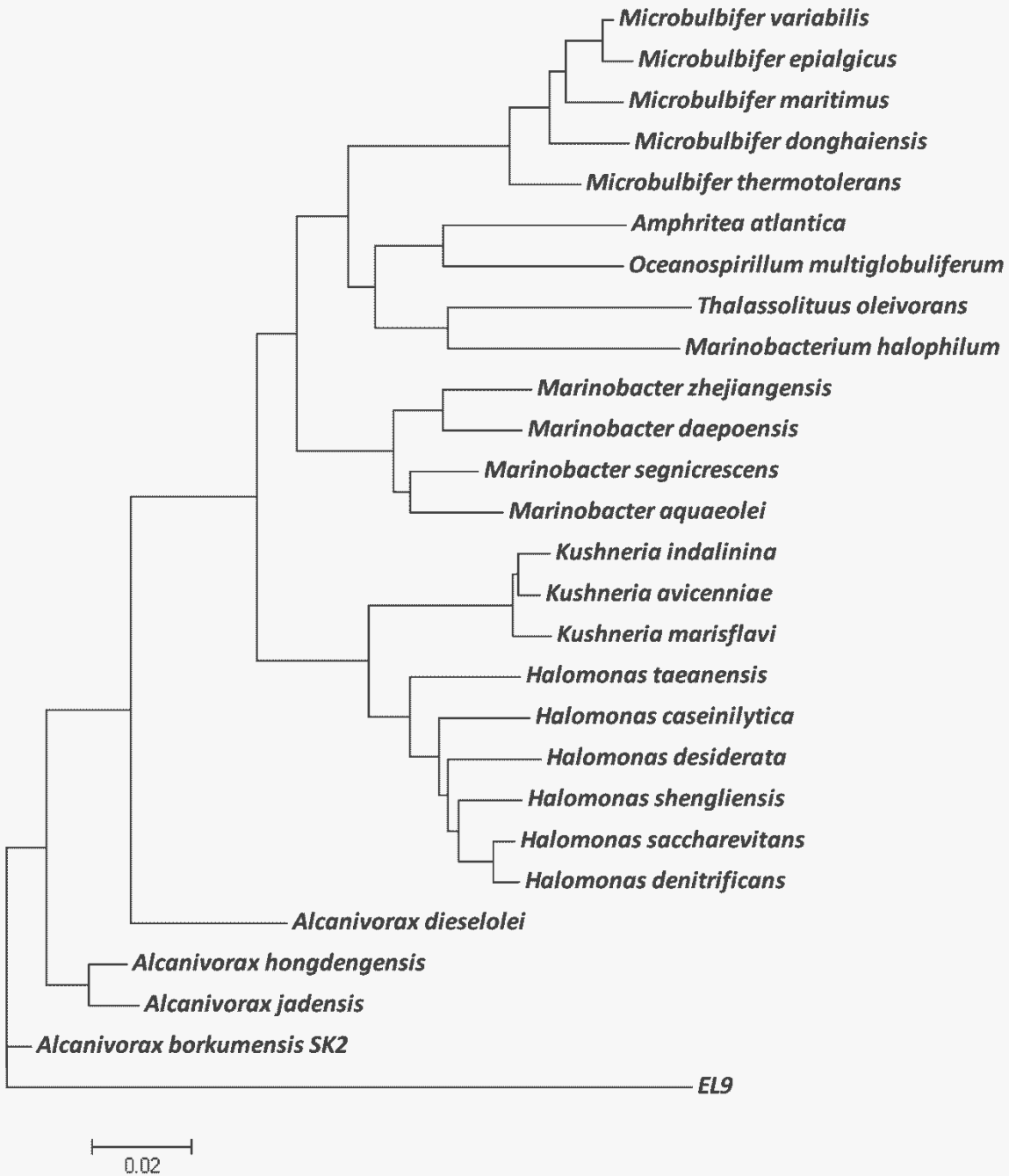
Σχήμα 4.12: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E6.



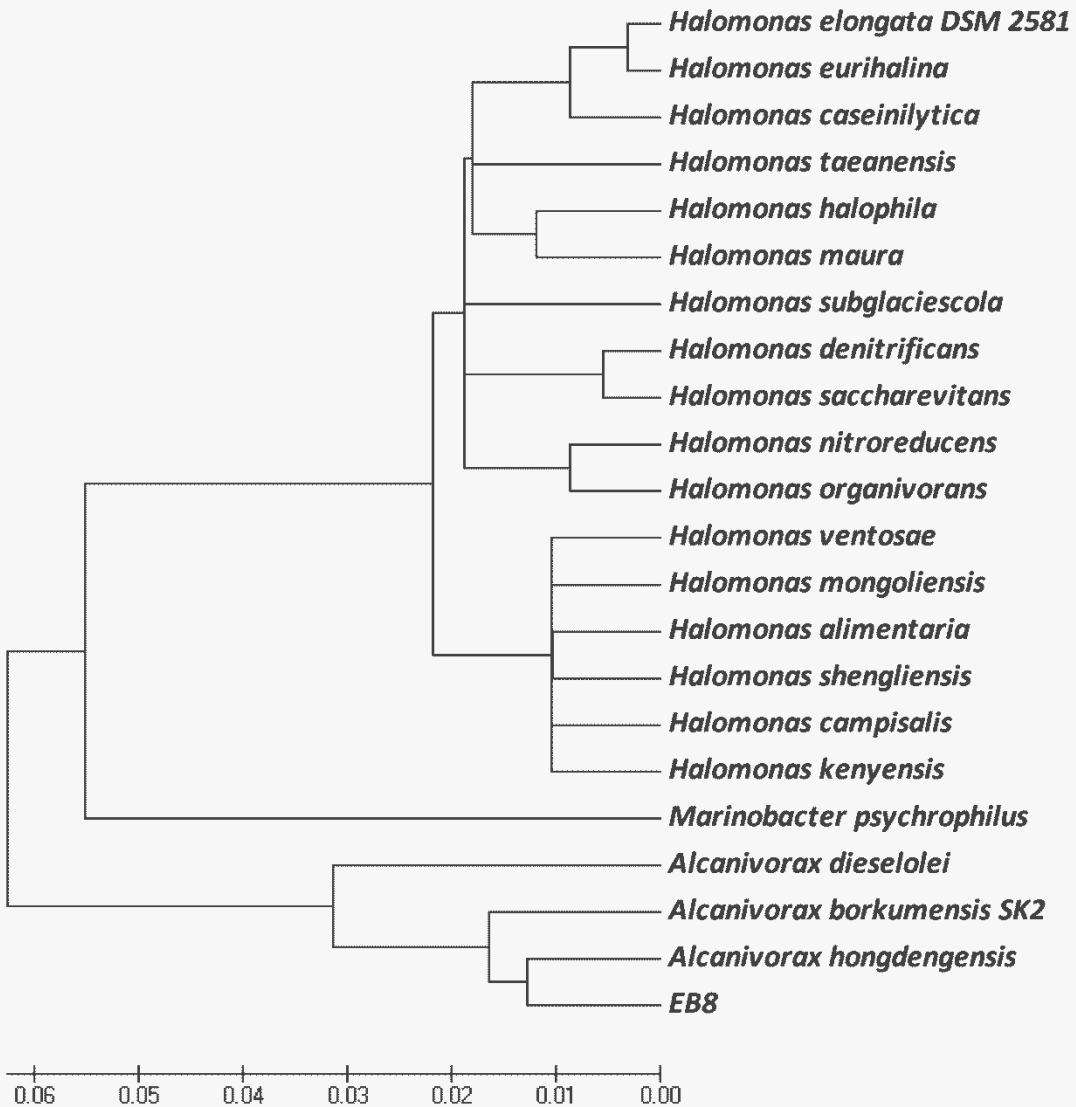
Σχήμα 4.13: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E7.



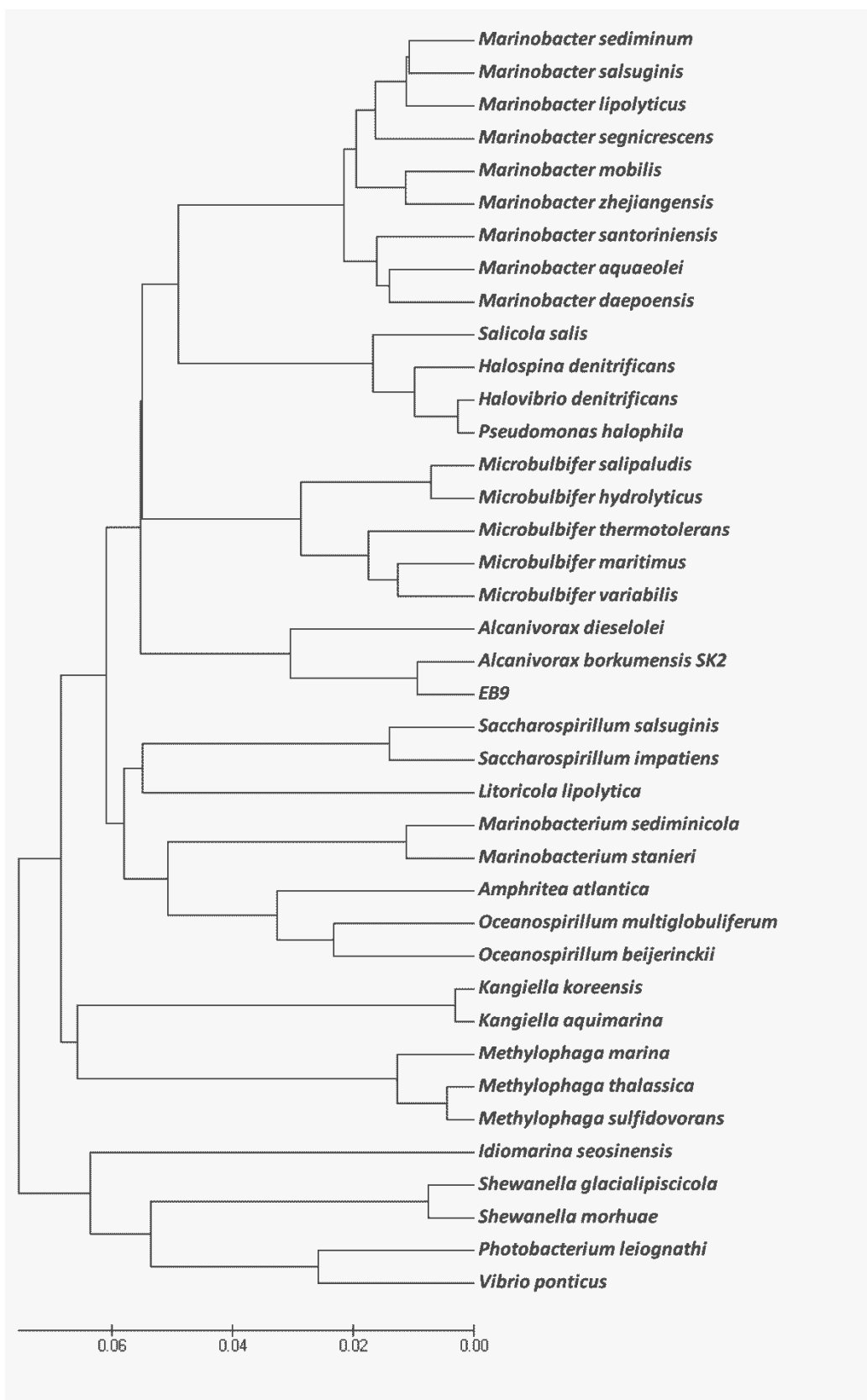
Σχήμα 4.14: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E8.



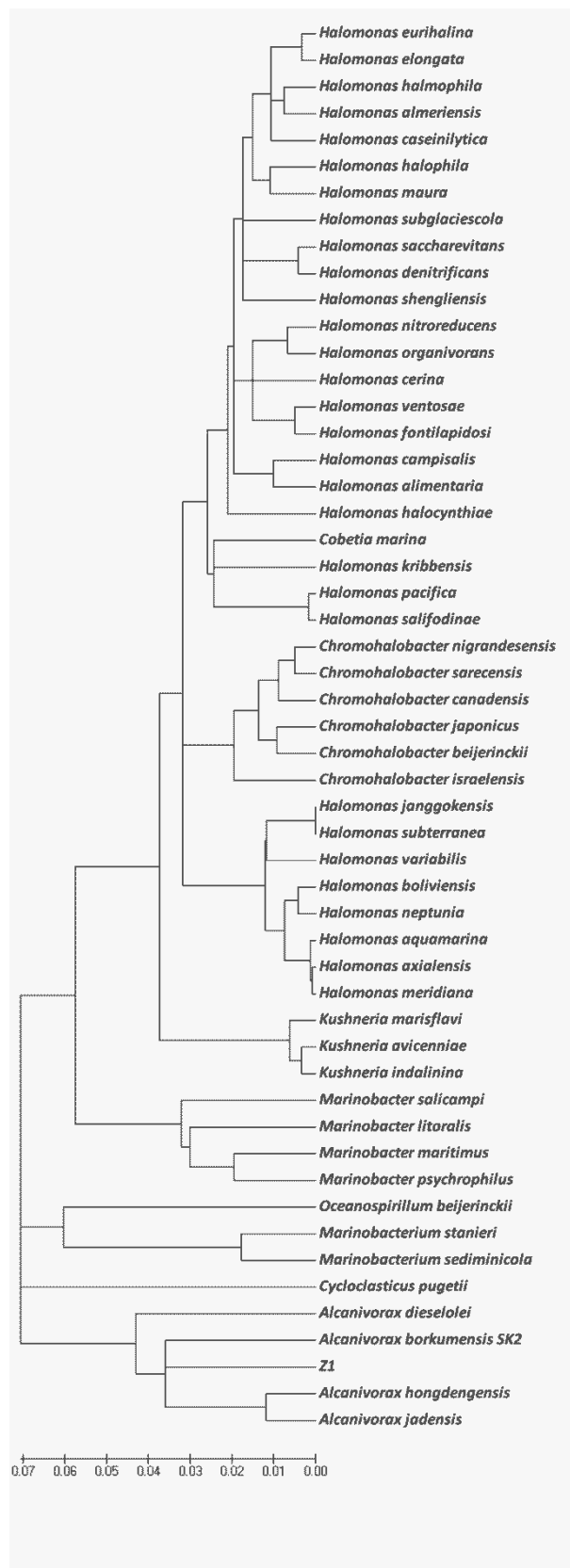
Σχήμα 4.15: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος E9.



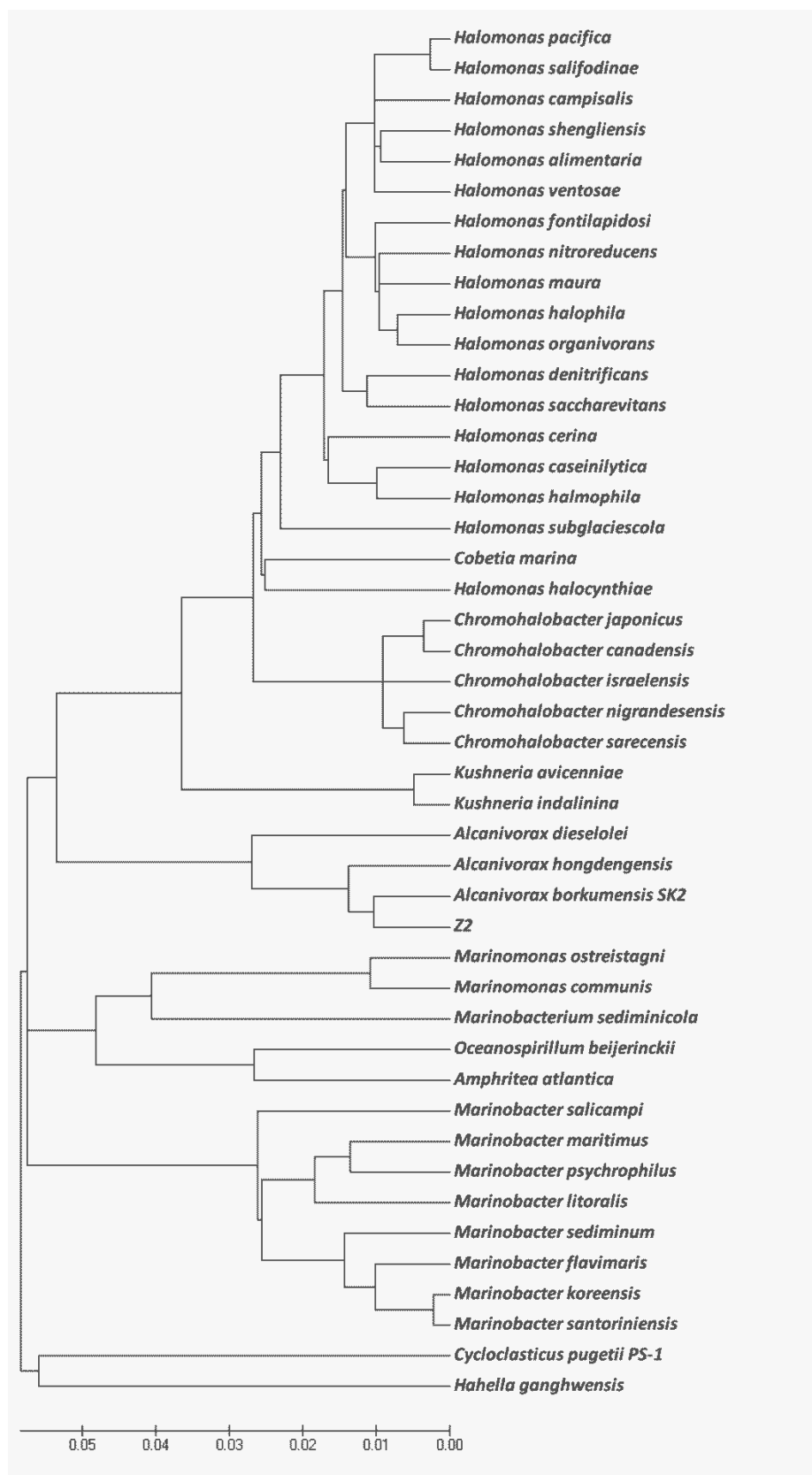
Σχήμα 4.16: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος EB8.



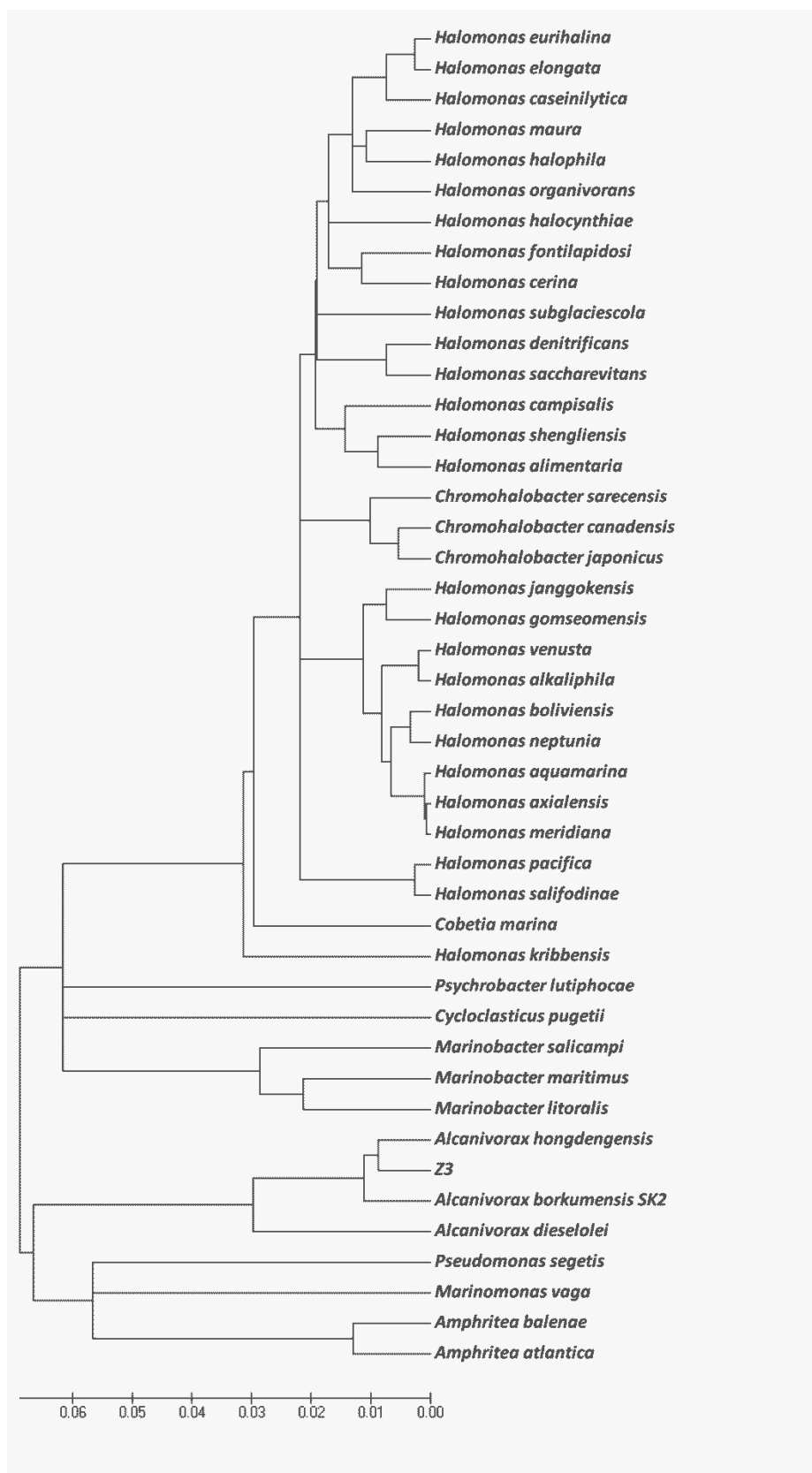
Σχήμα 4.17: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος EB9.



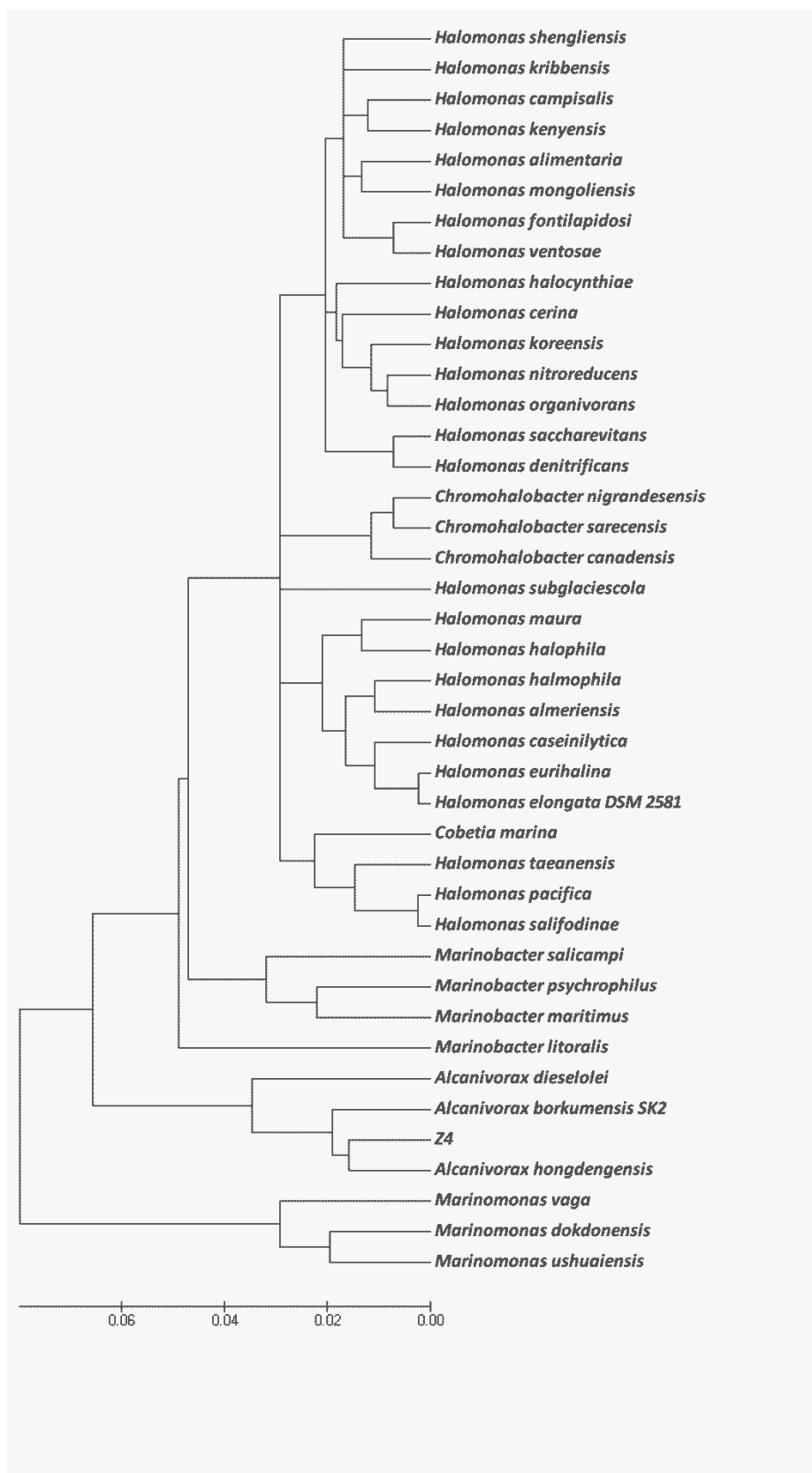
Σχήμα 4.18: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z1.



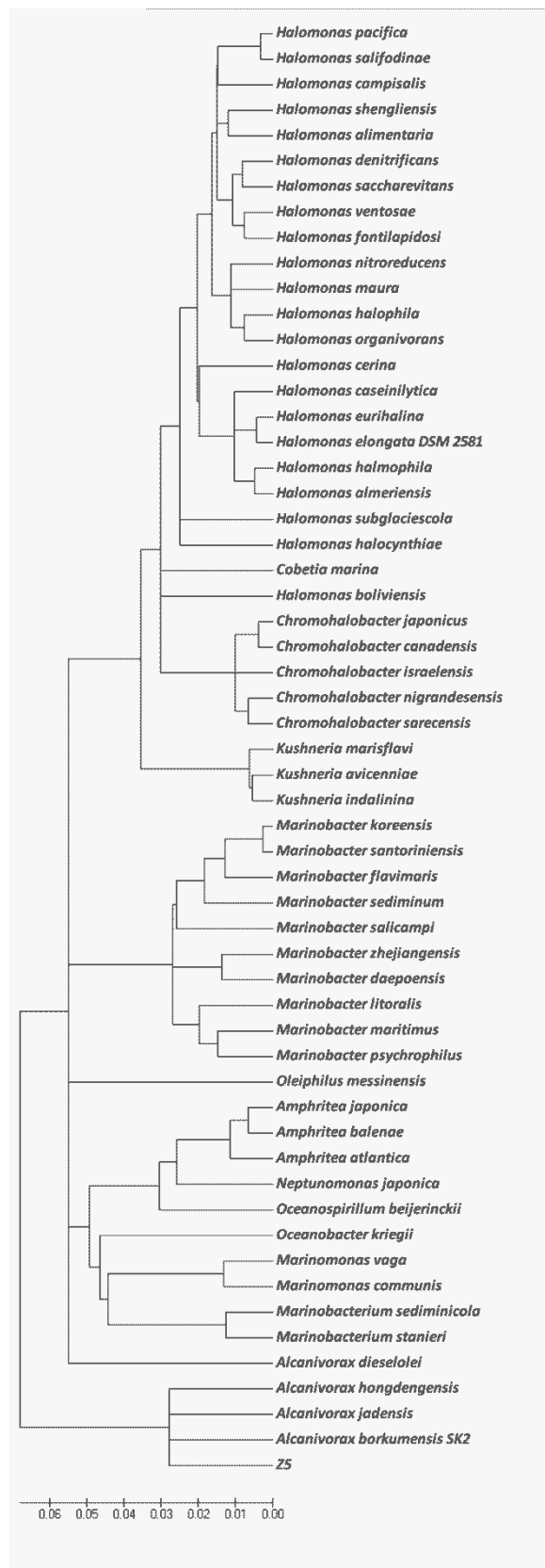
Σχήμα 4.19: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z2.



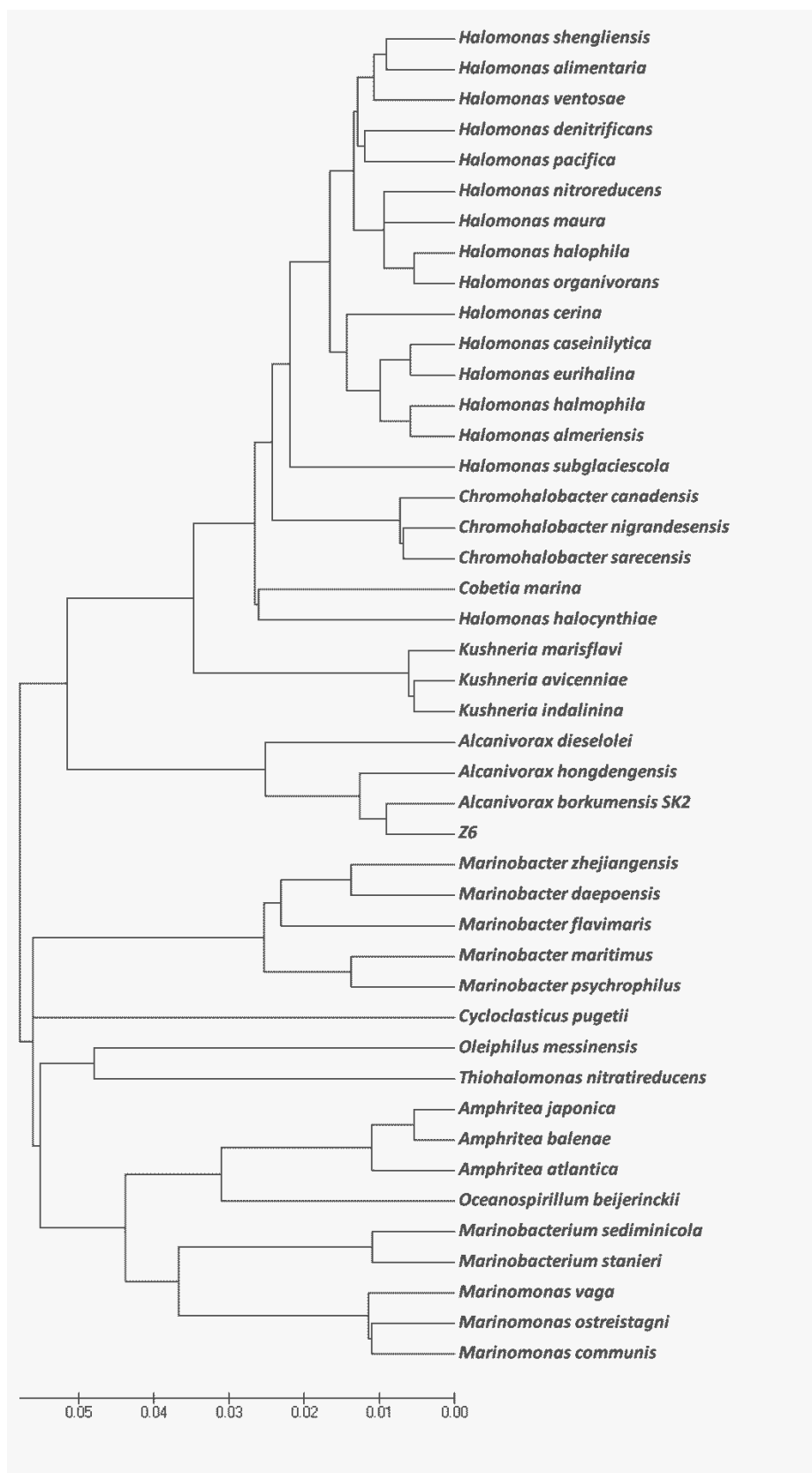
Σχήμα 4.20: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z3.



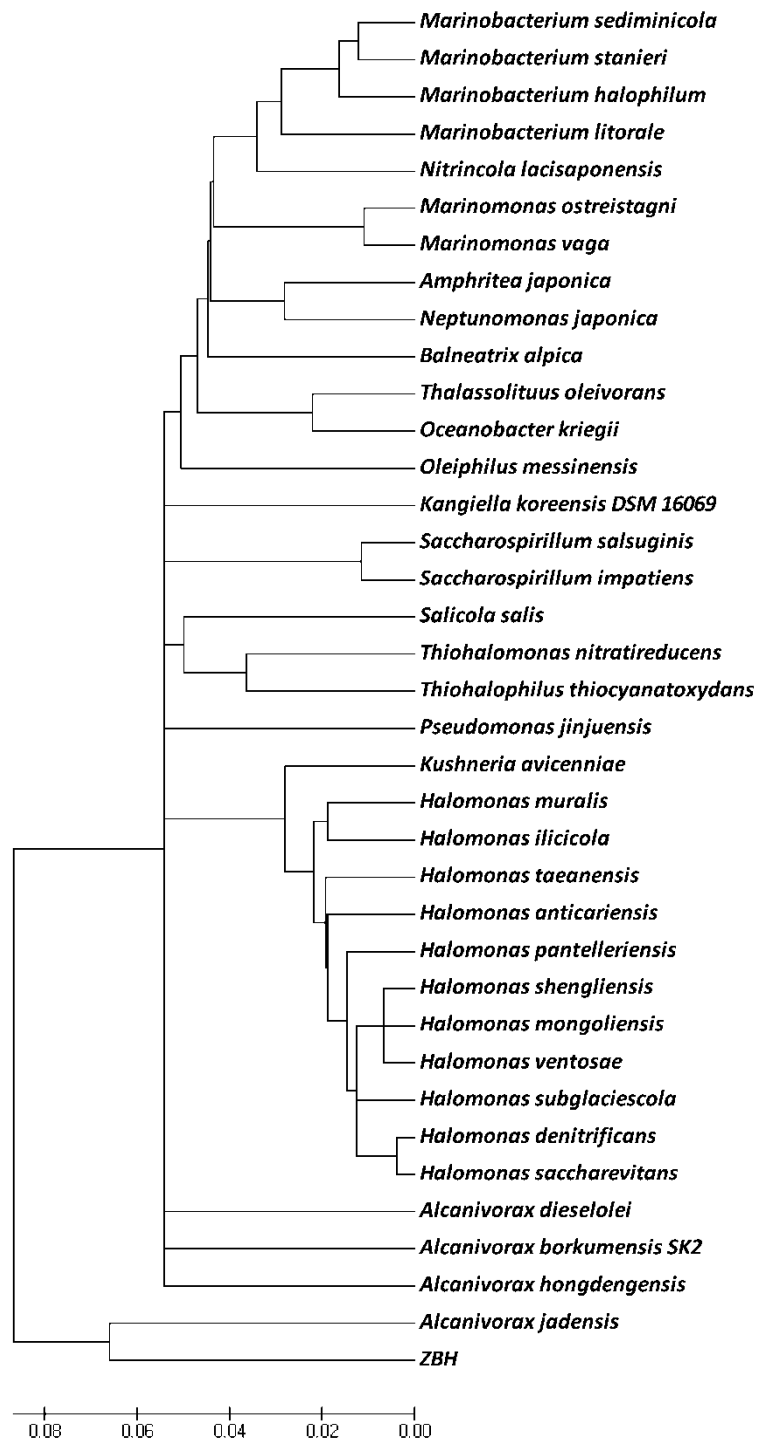
Σχήμα 4.21: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z4.



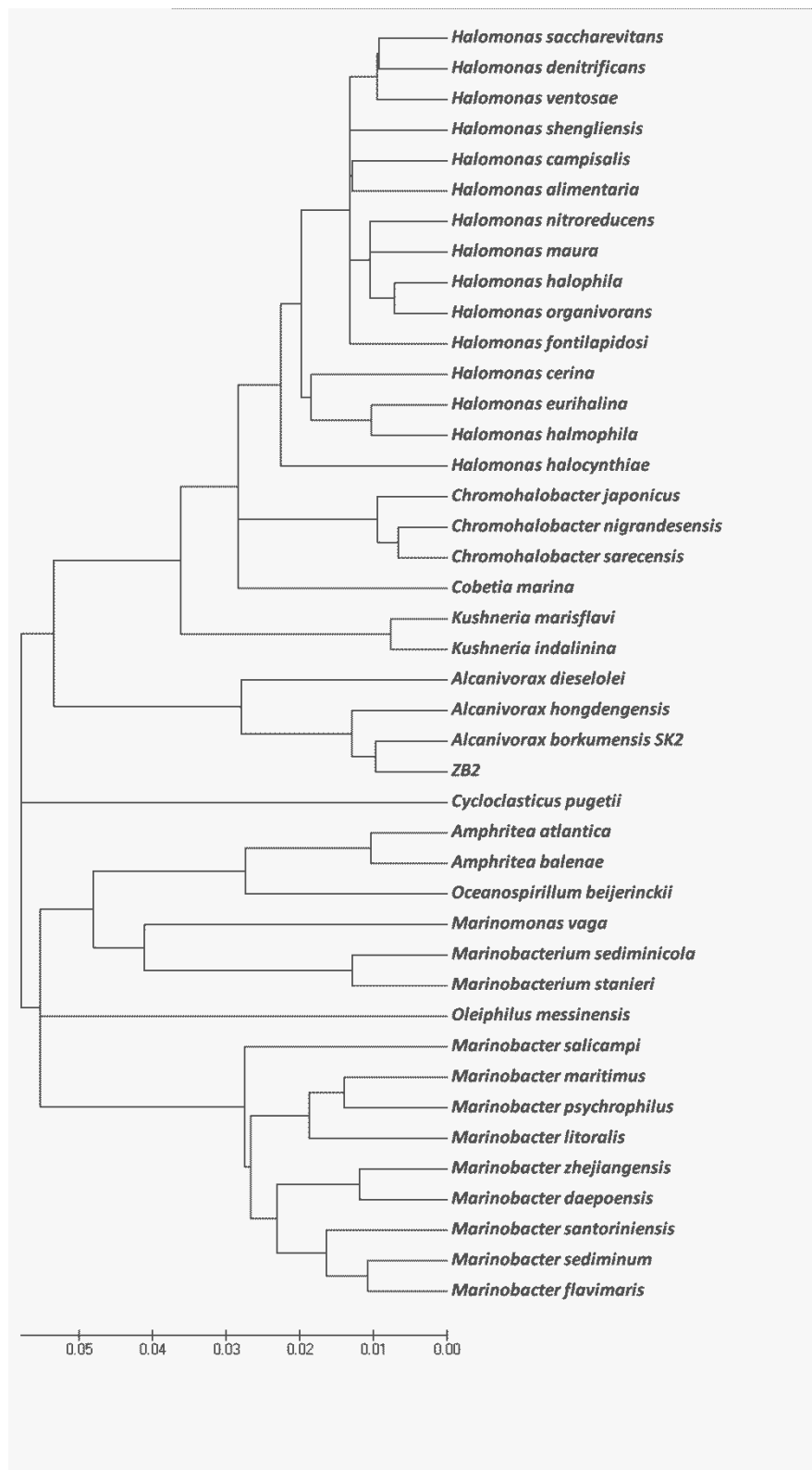
Σχήμα 4.22: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z5.



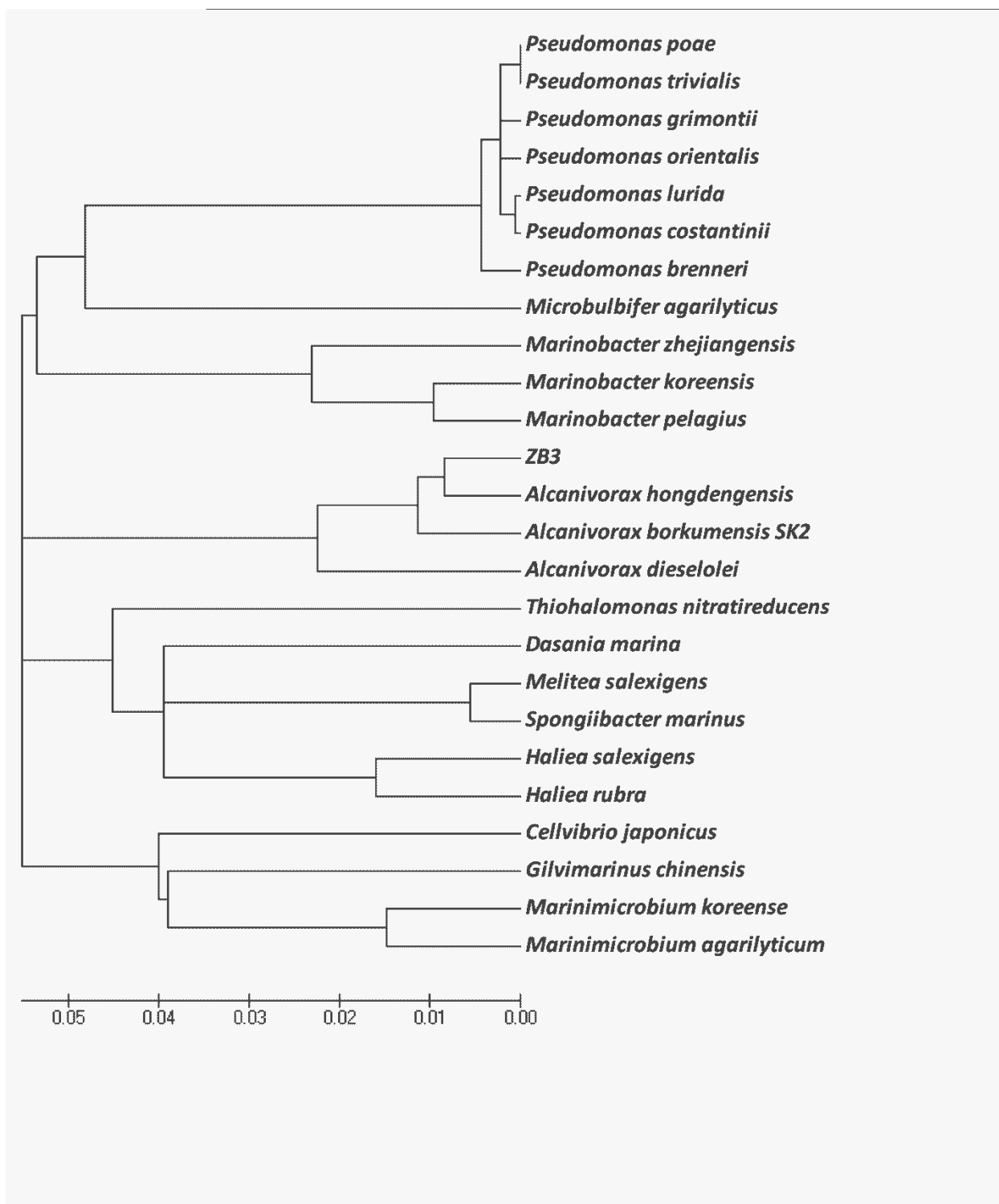
Σχήμα 4.23: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος Z6.



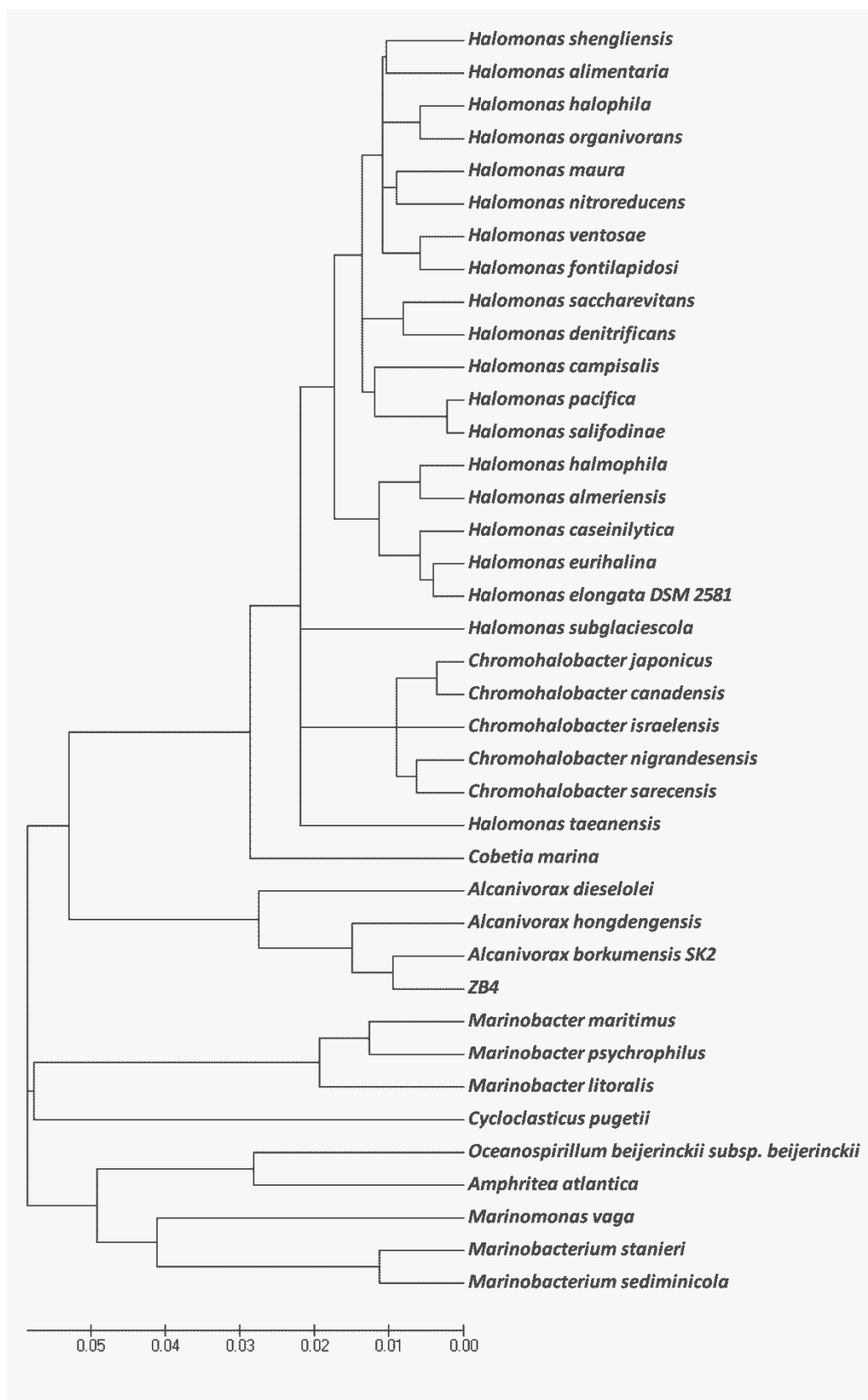
Σχήμα 4.24: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZBH.



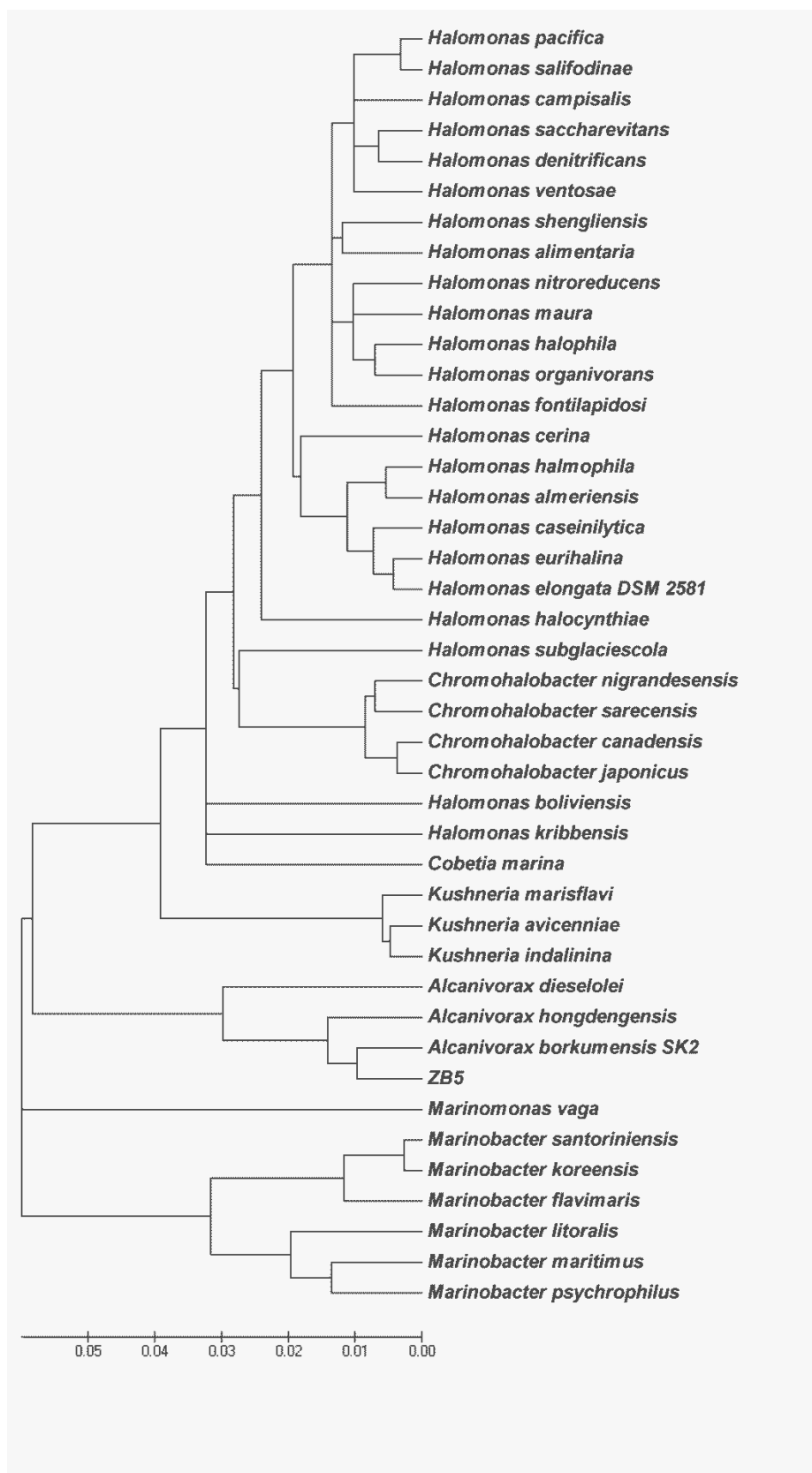
Σχήμα 4.25: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB2.



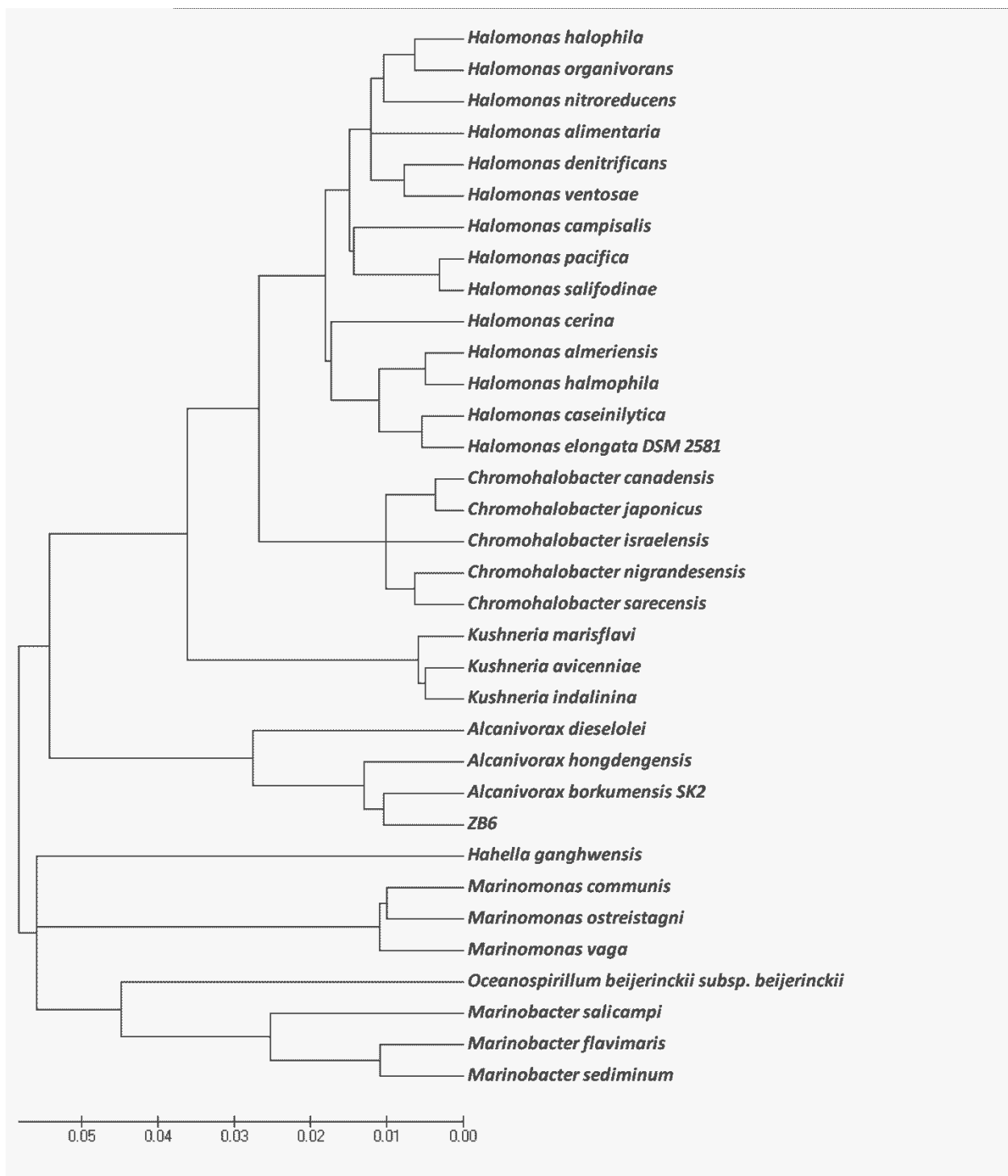
Σχήμα 4.26: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB3.



Σχήμα 4.27: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB4.



Σχήμα 4.28: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB5.



Σχήμα 4.29: Φυλογενετικό δένδρο του δείγματος ZB6.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω φυλογενετικά δένδρα, τα περισσότερα απομονωμένα δείγματα παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με το γένος *Alcanivorax* (και συγκεκριμένα στο *Alcanivorax borkumensis* SK2) ανεξαρτήτως προέλευσης.

Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς τα συγκεκριμένα βακτήρια αποτελούν τους πιο γνωστούς αποικοδομητές αλκανίων και ταυτόχρονα παράγουν σε μεγάλη κλίμακα βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.

Το συγκεκριμένο βακτήριο ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια, το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα με 3, 120, 143 ζεύγη βάσεων και με ένα μέσο όρο G+C της τάξης του 55% [99]. Η γονιδιακή ανάλυση του συγκεκριμένου γένους ανέδειξε την ικανότητα του για αποικοδόμηση αλκανίων (στην οποία εμπεριέχεται η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθώς και η παραγωγή βιοφίλμ), το σύστημα του συγκεκριμένου γένους χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του να δεσμεύει μικρές ποσότητες αζώτου, φωσφόρου, θείου και άλλων στοιχείων των οποίων η ποσότητα είναι περιορισμένη στο θαλάσσιο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ακόμα αποδοτικότερη αποικοδόμηση αλκανίων σε περιβάλλον περιορισμένων θρεπτικών, όπως είναι το θαλάσσιο. Τέλος, το συγκεκριμένο στέλεχος είναι γνωστό για την ικανότητα ανάπτυξης του σε ακραίες συνθήκες, όπως είναι η υψηλή αλατότητα και η ακτινοβολία UV. Όπως είναι γνωστό, στα υψηλότερα στρώματα της θάλασσας συναντάται το υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης ακτινοβολίας UV [99].

Οπότε, δεδομένων των συνθηκών απομόνωσης, με θρεπτικό μέσο τεχνητό θαλασσινό νερό και με μοναδική πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο, τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης είναι αρκετά ικανοποιητικά.

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθεται συνοπτικά η ποικιλότητα για τα δείγματα που απομονώθηκαν από τον κόλπο της Ελευσίνας (Πίνακας 4.1) και από την Ζάκυνθο (Πίνακας 4.2). Όσον αφορά τις κοινότητες της Ελευσίνας, φαίνεται ότι η ομοιότητα των δειγμάτων κυμαίνεται κυρίως μεταξύ των γενών *Halomonas*, *Marinobacter*, *Microbulbifer*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* και *Oceanospirillum*. Τα δείγματα που απομονώθηκαν από τη Ζάκυνθο, φαίνεται ότι συγκλίνουν περισσότερο με τα γένη *Halomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Marinomonas*, *Oceanospirillum*, *Amphitritea*, *Marinobacterium* και *Kushneria*.

Πίνακας 4.1: Φυλογενετική ανάλυση για τα απομονωμένα δείγματα από την Ελευσίνα.

	Γένος	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	EB8	EB9
Γνωστοί αποικοδομητές αλκανίων	<i>Halomonas</i>	+			+	+		+	+	+	+	
	<i>Vibrio</i>											+
	<i>Marinobacter</i>	+	+		+	+		+		+	+	+
	<i>Microbulbifer</i>	+	+		+	+	+	+		+		+
	<i>Alcanivorax</i>	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+		+						+
Γνωστοί αποικοδομητές PAHs	<i>Cycloclasticus</i>			+	+							
	<i>Chromohalobacter</i>				+	+						
Άλλα, βρέθηκαν στις εξεταζόμενες κοινότητες	<i>Cobetia</i>				+	+						
	<i>Marinomonas</i>	+				+						
	<i>Halospina</i>	+										+
	<i>Halovibrio</i>	+	+			+						
	<i>Salicola</i>	+	+				+					+
	<i>Marinimicrobium</i>	+										
	<i>Thiohalophilus</i>	+										
	<i>Natronocella</i>	+					+	+				
	<i>Shewanella</i>	+				+		+				+
	<i>Thiohalomonas</i>		+		+			+				
	<i>Methylinatrum</i>		+									
	<i>Alcalispirillum</i>		+									
	<i>Alcalilimnicolla</i>		+									
	<i>Pseudospirillum</i>		+									
	<i>Oceanospirillum</i>		+		+			+		+		+
	<i>Saccharospirillum</i>		+			+		+				+
	<i>Kangiella</i>		+									+
	<i>Methylophaga</i>		+									+
	<i>Thalassolytuus</i>		+							+		
	<i>Nitrincola</i>		+									
	<i>Cardiobacterium</i>		+				+					
	<i>Pseudidiomarina</i>		+									
	<i>Idiomarina</i>		+									+
	<i>Thalassomonas</i>		+									
	<i>Cronobacter</i>			+								

Γένος	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	EB8	EB9
<i>Kluyvera</i>			+								
<i>Raoultella</i>			+								
<i>Serratia</i>			+								
<i>Aeromonas</i>			+								
<i>Tolumonas</i>			+								
<i>Methylobacter</i>			+								
<i>Thioalalivibrio</i>					+						
<i>Ampitritea</i>						+			+		+
<i>Reineka</i>						+					
<i>Moraxella</i>						+					
<i>Granulosicoccus</i>						+					
<i>Methylococcus</i>						+					
<i>Thiococcus</i>						+					
<i>Marinichromatium</i>						+					
<i>Azoarcus</i>						+					
<i>Denitratisoma</i>						+					
<i>Methyloversatilis</i>						+					
<i>Roseococcus</i>						+					
<i>Rickettsia</i>						+					
<i>Sphingomonas</i>						+					
<i>Methylobacterium</i>						+					
<i>Sediminimonas</i>						+					
<i>Nitratireductor</i>						+					
<i>Pseudomonaxanthobacter</i>						+					
<i>Ochrobactrum</i>						+					
<i>Brucella</i>						+					
<i>Ectothiohordosinus</i>							+				
<i>Spongibacter</i>							+				
<i>Sulfurivirga</i>								+			
<i>Marinobacterium</i>									+		+
<i>Kushneria</i>									+		
<i>Litoricolla</i>											+
<i>Photobacterium</i>											+

Πίνακας 4.2: Φυλογενετική ανάλυση για τα απομονωμένα δείγματα της Ζακύνθου.

Γένος	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	ZBH	ZB2	ZB3	ZB4	ZB5	ZB6
<i>Halomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Vibrio</i>												
<i>Marinobacter</i>	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+
<i>Microbulbifer</i>									+			
<i>Alcanivorax</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>			+				+		+			
<i>Cycloclasticus</i>	+	+	+			+		+		+		
<i>Chromohalobacter</i>	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
<i>Cobetia</i>	+	+	+	+	+	+		+		+	+	
<i>Marinomonas</i>		+		+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Salicola</i>							+					
<i>Marinimicrobium</i>									+			
<i>Thiohalophilus</i>							+					
<i>Thiohalomonas</i>						+	+		+			
<i>Oceanospirillum</i>	+	+			+	+		+		+		+
<i>Saccharospirillum</i>							+					
<i>Kangiella</i>							+					
<i>Thalassolytuus</i>							+					
<i>Nitrincola</i>							+					
<i>Amphitritea</i>		+	+		+	+	+	+		+		
<i>Marinobacterium</i>	+	+			+	+	+	+		+		
<i>Kushneria</i>	+	+			+	+	+	+			+	+
<i>Oleiphilus</i>					+		+	+				
<i>Neptunomonas</i>					+		+					
<i>Oceanobacter</i>					+		+					
<i>Balneatrix</i>							+					

<i>Γένοç</i>	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	ZBH	ZB2	ZB3	ZB4	ZB5	ZB6
<i>Dasania</i>									+			
<i>Haliea</i>									+			
<i>Cellvibrio</i>									+			
<i>Gilvimarinus</i>									+			
<i>Hahella</i>												+

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοειδών, είτε με τη μορφή της βιοδιέγερσης, είτε με τη μορφή της βιοενίσχυσης, αποτελεί μία καινοτόμο μέθοδο, που έχει αρχίσει να αναπτύσσεται ραγδαία τα τελευταία χρόνια, καθώς οι συμβατικές χημικές μέθοδοι καθαρισμού των πετρελαιοειδών από το φυσικό περιβάλλον οδηγούσαν σε παραγωγή άλλων τοξικών παραπροϊόντων. Η ανάγκη τις σύγχρονης κοινωνίας για στροφή σε φιλικές στο περιβάλλον τεχνικές, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτή, καθώς εκτός από όλα τα άλλα, αποτελεί και οικονομικότερη μέθοδο, αν συγκριθεί με τις ως τώρα χρησιμοποιούμενες μεθόδους.

Κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου, το αργό πετρέλαιο χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα κατά τη διάρκεια μίας μικροβιακής διεργασίας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των συστατικών του πετρελαίου σε συστατικά μικρότερου μοριακού βάρους [83].

Οι έρευνες μέχρι τώρα έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το πετρέλαιο (βακτήρια και ζύμες) υπάρχουν σε ευρεία κλίμακα στο θαλάσσιο περιβάλλον και στο έδαφος. Ταυτόχρονα, είναι αποδεδειγμένο από την επιστημονική κοινότητα ότι κανένα είδος μικροοργανισμού δεν είναι ικανό να αποικοδομήσει τελείως τους υδρογονάνθρακες [84]. Η αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων είναι αποτέλεσμα κοινοπραξίας διαφορετικών ειδών και γένων μικροοργανισμών. Τα πιο γνωστά γένη που συναντώνται στη βιβλιογραφία για την ικανότητα τους να αποικοδομούν τα συστατικά του πετρελαίου είναι τα *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacchain*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alcanivorax*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* [85-88].

Από τα διαφορετικά κλάσματα του πετρελαίου, τα n-αλκάνια ενδιάμεσου μεγέθους (C12-C20) αποτελούν το επιθυμητό υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς και συνεπώς το πιο εύκολο αποικοδομήσιμο κλάσμα, ενώ τα μικρότερης αλυσίδας αλκάνια είναι πολύ πιο τοξικά. Τα μεγαλύτερης αλυσίδας αλκάνια (C20-C40), γνωστά και ως κηροί, έχουν υδρόφοβη στερεή φύση, και συνεπώς είναι πιο δύσκολη η αποικοδόμησή τους, εξαιτίας της μικρής διαλυτοποίησής τους στο νερό και της βιοδιαθεσιμότητας τους [89]. Τα αλκάνια διακλαδισμένης αλυσίδας αποικοδομούνται με πολύ πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τα κανονικά αλκάνια.

Πολύ μικροοργανισμοί είναι γνωστοί για την αποικοδόμηση των αρωματικών υδρογονανθράκων [90-92]. Η βιοαποικοδόμηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων εξαρτάται κυρίως από την έκταση του μοριακού τους βάρους [92-93]. Το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας αναφέρεται σε αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι το ναφθαλένιο, το ανθρακένιο και το φενανθρένιο [89-92].

Τα πειράματα που έλαβαν χώρα στην παρούσα εργασία για την μελέτη της βιοαποικοδόμησης των πετρελαιοειδών από τη μικροβιακή κοινότητα E1 (περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3), ήταν το εξής:

B1C: πείραμα βιοαποικοδόμησης με την βακτηριακή κοινότητα E1 και με αργό πετρέλαιο 0,5% w/v.

B1CF: πείραμα βιοαποικοδόμησης με την βακτηριακή κοινότητα E1, με αργό πετρέλαιο 0,5% w/v και ενισχυτικό βιοαποικοδόμησης (bioremediation agent) S-200 0,05% w/v.

B1M: πείραμα βιοαποικοδόμησης με την βακτηριακή κοινότητα E1, με μαζούτ 0,5% w/v.

B1MF: πείραμα βιοαποικοδόμησης με την βακτηριακή κοινότητα E1, με μαζούτ 0,5% w/v και ενισχυτικό βιοαποικοδόμησης (bioremediation agent) S-200 0,05% w/v.

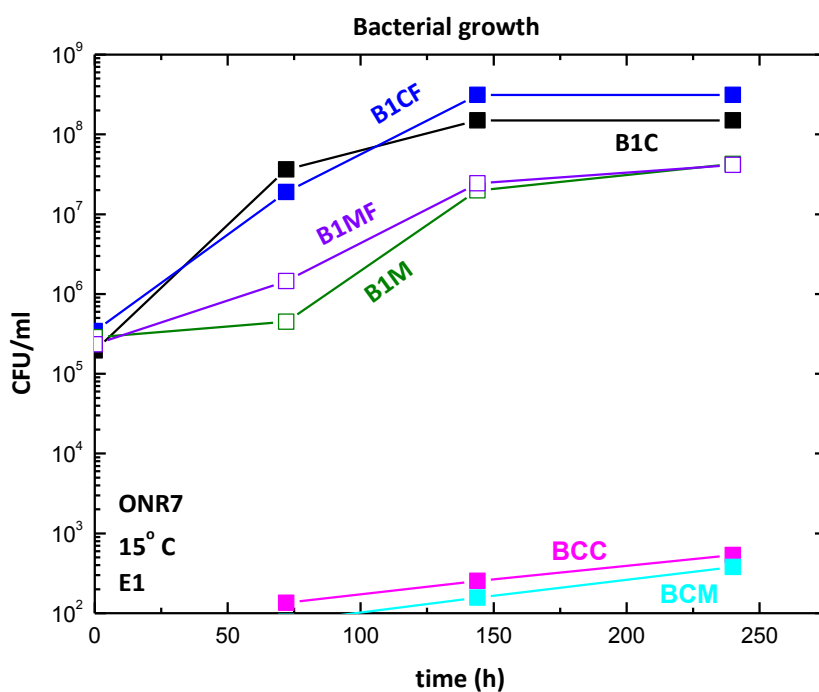
BCC: πείραμα βιοαποικοδόμησης χωρίς μικροοργανισμούς, με πετρέλαιο 0,5% w/v (μάρτυρας - control)

BCM: πείραμα βιοαποικοδόμησης χωρίς μικροοργανισμούς, με μαζούτ 0,5% w/v (μάρτυρας - control)

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν στους 15° C (± 2), η ανακίνηση των δειγμάτων είχε ρυθμιστεί στα 150 rpm, ενώ το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ONR7.

5.1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Από τα έξι πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η μικροβιακή ανάπτυξη στις διαφορετικές συνθήκες παρατίθεται στο Σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1: Μικροβιακή ανάπτυξη των τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων βιοαποικοδόμησης που πραγματοποιήθηκαν συναρτήσει του χρόνου.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα παραπάνω, τα δείγματα που είχαν αργό πετρέλαιο ως μοναδική πηγή άνθρακα, παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που είχαν μαζούτ. Το γεγονός αυτό

είναι απολύτως φυσιολογικό, καθώς όπως περιγράφηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η απομόνωση των μικροοργανισμών έγινε με χρήση αργού πετρελαίου ως μοναδική πηγή άνθρακα, οπότε ήταν εγκλιματισμένα στη συγκεκριμένη μορφή πετρελαιοειδών. Ταυτόχρονα, όπως είναι γνωστό, το μαζούτ αποτελείται από μεγαλύτερης αλυσίδας αλκάνια και αρωματικά, τα οποία αποικοδομούνται με πολύ πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τα μεσαίου μεγέθους n-αλκάνια και αρωματικά. Οπότε, όσο πιο αργά αποικοδομούνται τα συγκεκριμένα συστατικά του πετρελαίου, τόσο πιο δύσκολη είναι η κατανάλωση του άνθρακα, και επομένως του υποστρώματος, άρα τόσο πιο αργά θα λαμβάνει χώρα η μικροβιακή ανάπτυξη. Για αυτό το λόγο, η μικροβιακή ανάπτυξη με πηγή άνθρακα το μαζούτ, είναι χαμηλότερη, σε σχέση με την αντίστοιχη με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο.

Στο παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής η επίδραση του S-200 και στις δύο περιπτώσεις των πειραμάτων. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η προσθήκη λιπάσματος αυξάνει την βακτηριακή ανάπτυξη και στις δύο περιπτώσεις πετρελαιοειδών (μαζούτ και αργό πετρέλαιο), αλλά η θετική του επίδραση είναι πιο εμφανής στην περίπτωση όπου η πηγή άνθρακα είναι το αργό πετρέλαιο. Και αυτό το γεγονός είναι λογικό, καθώς όπως είναι φυσικό, σε συνθήκες περιορισμένων θρεπτικών (αζώτου και φωσφόρου) η μικροβιακή ανάπτυξη είναι περιορισμένη. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια, ότι ο ρυθμός ανάπτυξης είναι της ίδιας τάξης στις περιπτώσεις με και χωρίς λίπασμα.

Τέλος, τα δύο δείγματα τα οποία δεν εμπεριέχουν μικροβιακές κοινότητες έχουν πολύ μικρή ανάπτυξη, που τείνει στο μηδέν. Η ύπαρξη μικρού μικροβιακού φορτίου πιθανό να οφείλεται σε επιμόλυνση, είτε κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, είτε κατά την επίστρωση των τρυβλίων.

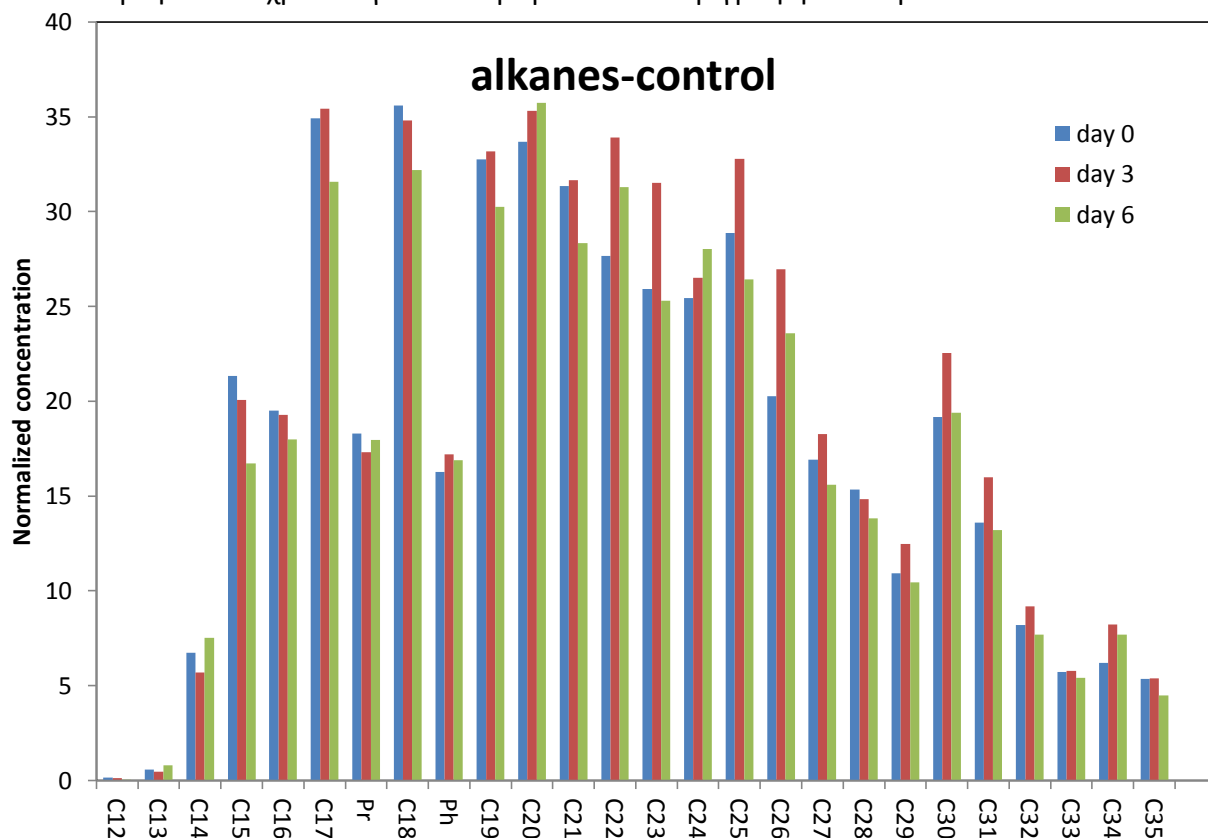
5.2. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

Κατά τις εκχυλίσσεις που πραγματοποιήθηκαν, τα εκχυλίσματα που ανακτήθηκαν οδηγήθηκαν στις SPE στήλες, για να γίνει ο διαχωρισμός των αλκανίων και των αρωματικών. Στη συνέχεια, τα δύο διαφορετικά κλάσματα οδηγήθηκαν στον αέριο

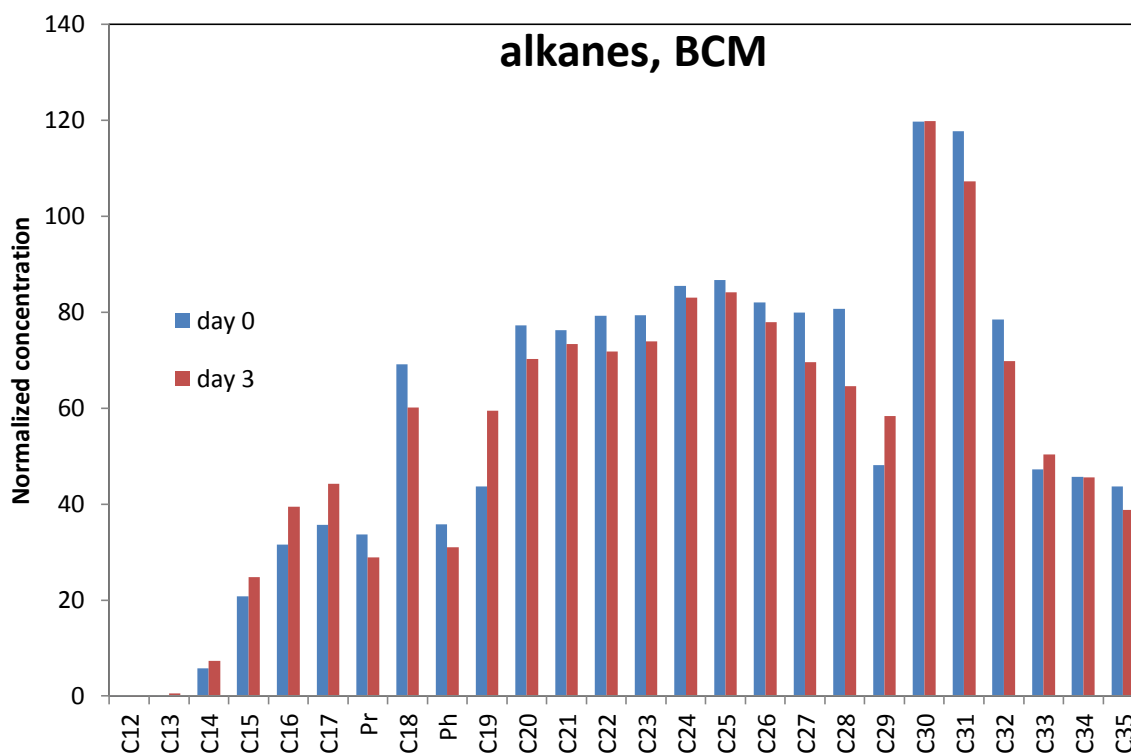
χρωματογράφο GC-MS, όπου πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των συστατικών.

- **Αλκάνια**

Στα σχήματα που ακολουθούν παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των αλκανίων συναρτήσει του χρόνου για τα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω.

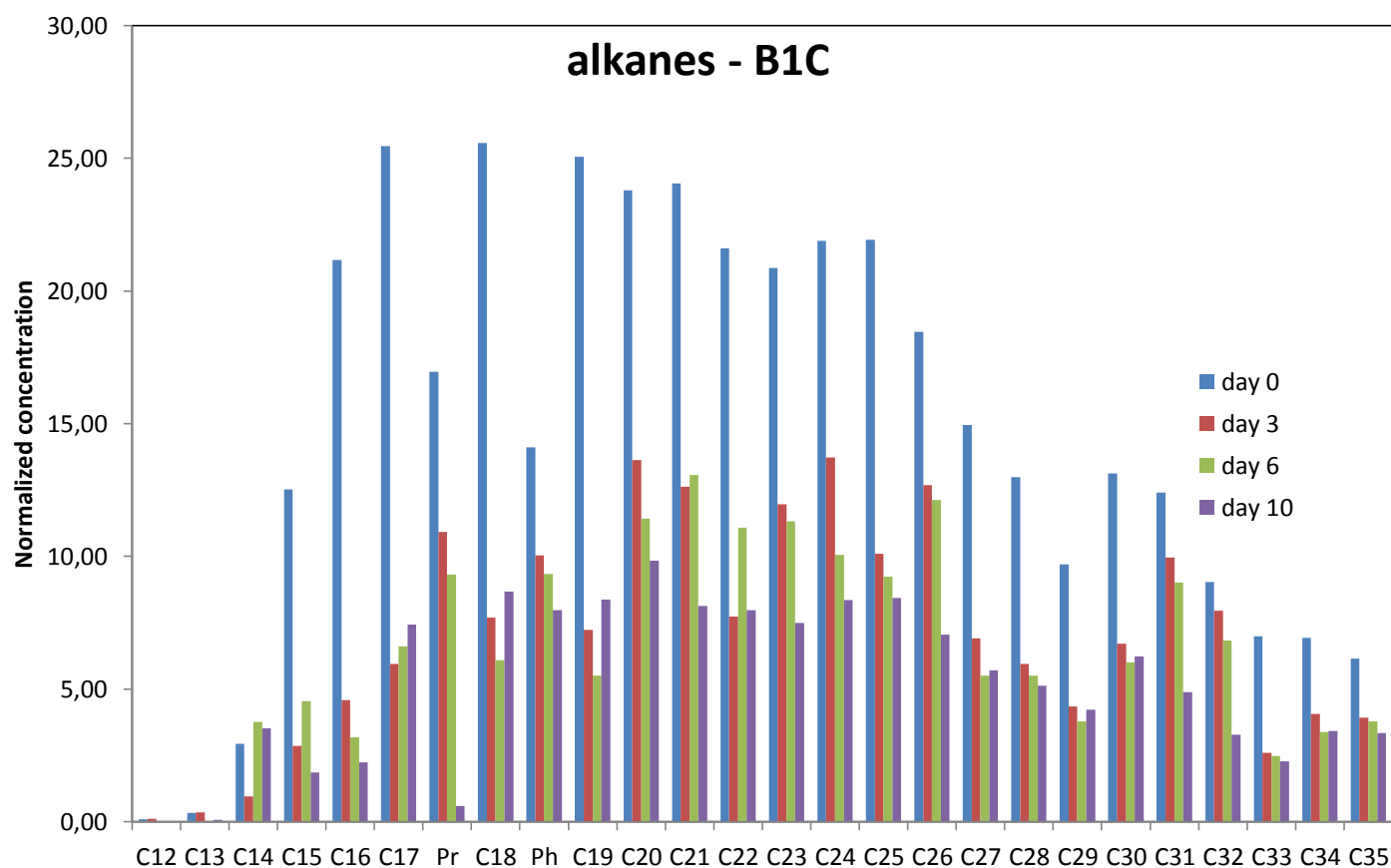


Σχήμα 5.2: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα απουσία μικροβιακής κοινότητας, με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 0,5% w/v, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.



Σχήμα 5.3: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα απουσία μικροβιακής κοινότητας, με πηγή άνθρακα μαζούτ 0,5% συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Στα δύο παραπάνω διαγράμματα φαίνεται καθαρά ότι απουσία μικροβιακού φορτίου, δεν πραγματοποιείται αποικοδόμηση των αλκανίων. Οι διακυμάνσεις που υπάρχουν μεταξύ ορισμένων συστατικών είναι λογικές, και οφείλονται κυρίως στην δειγματοληψία.



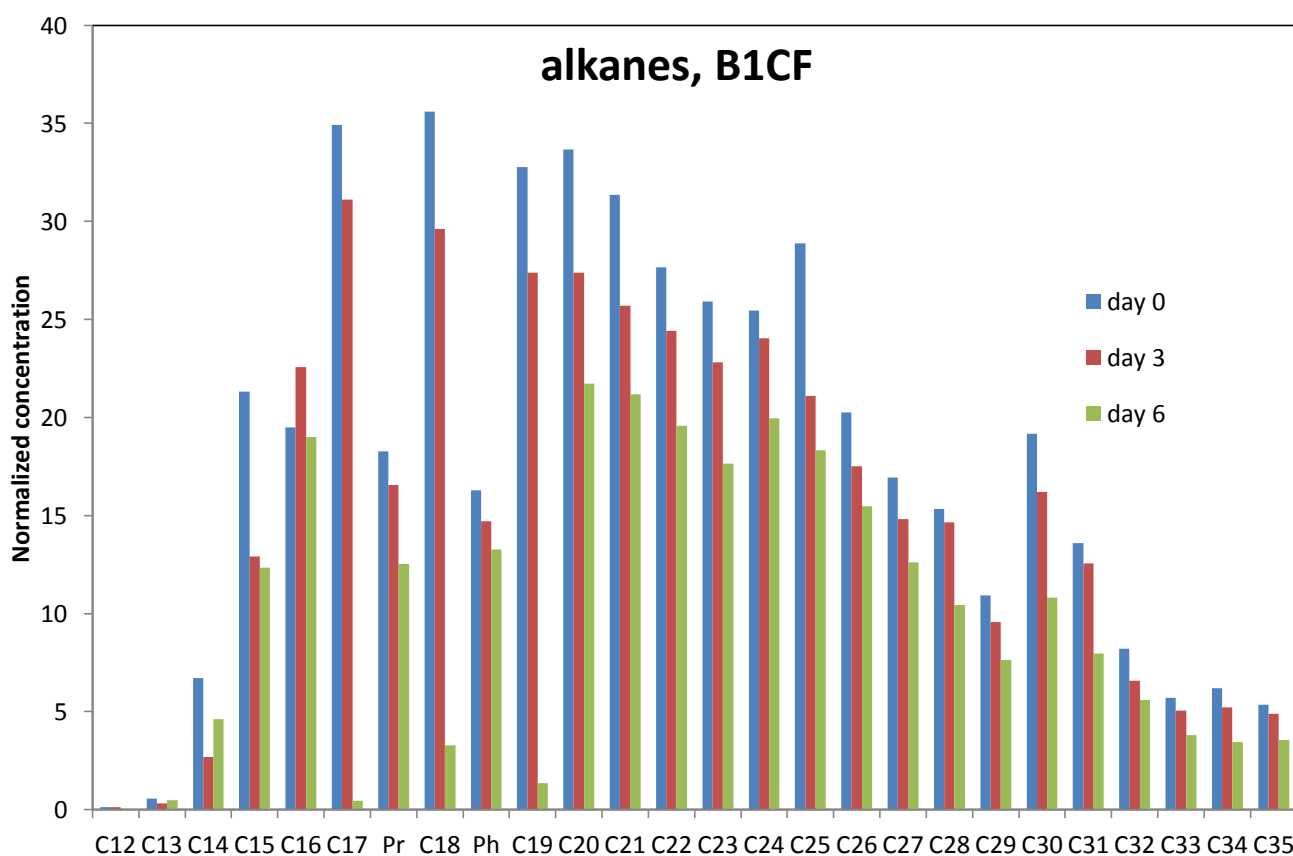
Σχήμα 5.4: Συγκέντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.4 στο οποίο παρατίθενται τα αποτελέσματα από το πείραμα βιοαποικοδόμησης με πηγή άνθρακα πετρέλαιο, σε τεχνητό θαλασσινό νερό με την μικροβιακή κοινότητα E1, η αποικοδόμηση είναι εμφανής στα περισσότερα αλκάνια. Παρατηρείται ότι ενώ στα μικρής αλυσίδας αλκάνια, η απόδοση της βιοαποικοδόμησης φτάνει το 97%, όσο αυξάνεται η αλυσίδα των αλκανίων, τόσο μειώνεται η απόδοση, με το αλκάνιο C35 να αποικοδομείται μόλις κατά 38%.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της βιοαποικοδόμησης τελείται μέσα στις τρεις πρώτες μέρες του πειράματος. Τις υπόλοιπες μέρες ο ρυθμός της διεργασίας μειώνεται, και σε κάποιες περιπτώσεις παραμένει σταθερός.

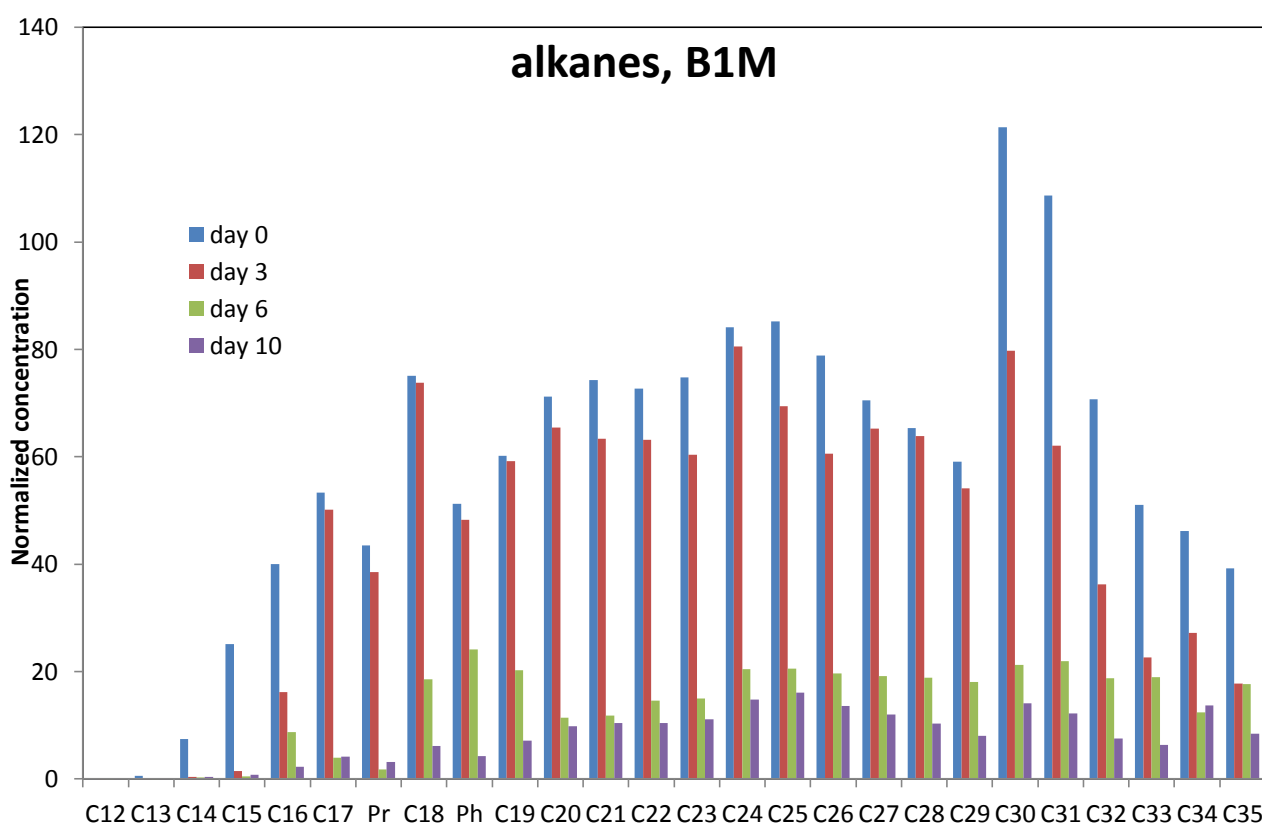
Οι διακυμάνσεις που υπάρχουν μεταξύ των ημερών, είναι πιθανό να οφείλονται σε εσφαλμένη δειγματοληψία, καθώς το πετρέλαιο δεν είναι δυνατόν να ομογενοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα, και συνεπώς σε κάθε δειγματοληψία δεν λαμβάνονταν ίση ποσότητα του.

Τα αποτελέσματα του πειράματος με πετρέλαιο και S-200, B1CF, παρατίθενται στο ακόλουθο διάγραμμα. Η δέκατη μέρα του πειράματος απουσιάζει λόγω σφάλματος κατά τις SPE στήλες. Παρά το γεγονός αυτό, η βιοαποικοδόμηση και σε αυτή την περίπτωση λαμβάνει χώρα με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πάντως και σε αυτό το πείραμα, ενώ η αποικοδόμηση έχει απόδοση στα πρώτα αλκάνια (C15) περίπου 90%, όσο αυξάνεται το μέγεθος του αλκανίου η απόδοση μειώνεται, και φτάνει για το C35 το 30%. Τα αποτελέσματα δεν μπορούν να συγκριθούν με το παραπάνω πείραμα, καθώς εδώ έχουμε τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης για έξι μέρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αντίστοιχες αποδόσεις για το προηγούμενο πείραμα (B1C) σε βάθος έξι ημερών ξεκινάνε για τα μικρά αλκάνια από το 95%, ενώ όσο αυξάνεται η ανθρακική αλυσίδα πέφτει, μέχρι που φτάνει το 20% για το αλκάνιο C35.



Σχήμα 5.5: Συγκέντρωση αλκανίων κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης των αλκανίων στο πείραμα με μαζούτ (B1M) και την μικροβιακή κοινότητα E1, παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα (Σχήμα 5.6). Η αποδόμηση των αλκανίων είναι εμφανής, με μόνη διαφορά το ότι η μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης στα επιμέρους αλκάνια λαμβάνει χώρα μεταξύ τρίτης και έκτης ημέρας, ενώ στα προηγούμενα πειράματα με αργό πετρέλαιο, το μεγαλύτερο ποσοστό της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιούνταν σε τρεις μέρες.

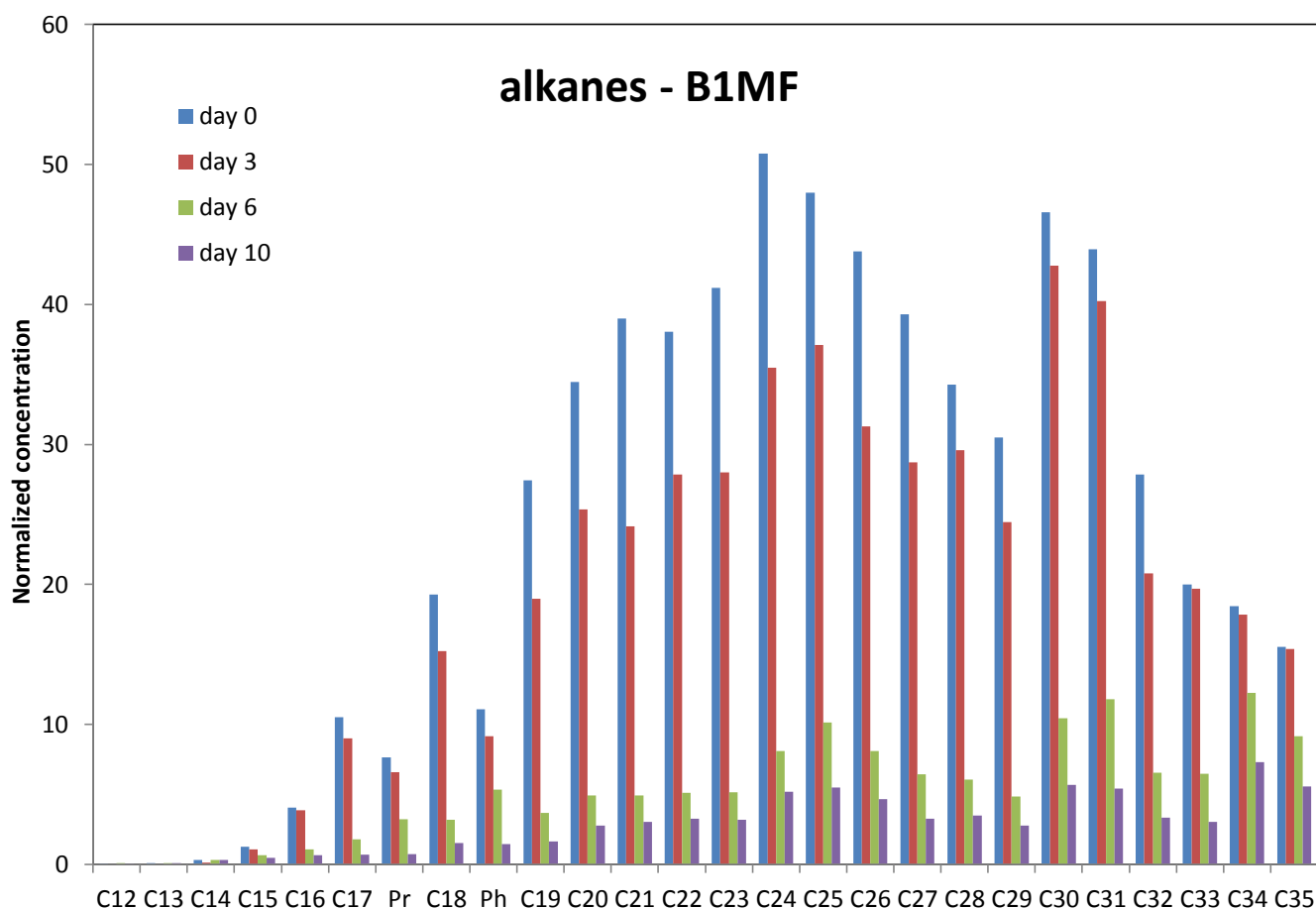


Σχήμα 5.6: Συγκεντρώσεις αλκανίων κατά το πείραμα με μαζούτ και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει του χρόνου. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Στη περίπτωση αυτή, η εκατοστιαία αποικοδόμηση είναι λίγο μικρότερη στα μικρά κλάσματα, με την % αποικοδόμηση του C12 να είναι μόλις 20%, αλλά σε αρκετά υψηλά επίπεδα στα μεγαλύτερης αλυσίδας αλκάνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μαζούτ αποτελείται κυρίως από μεγάλης αλυσίδας υδρογονάνθρακες, όντας ένα από το χαμηλότερα κλάσματα της απόσταξης, και επομένως αυτοί είναι οι υδρογονάνθρακες που καταναλώνονται από τη μικροβιακή κοινότητα. Το ότι η

αποικοδόμηση αργεί να λάβει χώρα δείχνει την μη-εξοικείωση της μικροβιακής κοινότητας με το συγκεκριμένο κλάσμα του αργού πετρελαίου, εφόσον η κοινότητα απομονώθηκε με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο.

Στο αντίστοιχο πείραμα με προσθήκη του S-200, παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα. (Σχήμα 5.7).



Σχήμα 5.7: Συγκέντρωση αλκανίων κατά το πείραμα με μαζούτ, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αλκανίων είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Η εκατοστιαία αποικοδόμηση κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με το προηγούμενο πείραμα, χωρίς λίπασμα. Πιο συγκεκριμένα, στο μικρότερης αλυσίδας αλκάνιο, C12, η αποικοδόμηση είναι 18%, ενώ στο μεγαλύτερης αλυσίδας, C35, φτάνει το 64%.

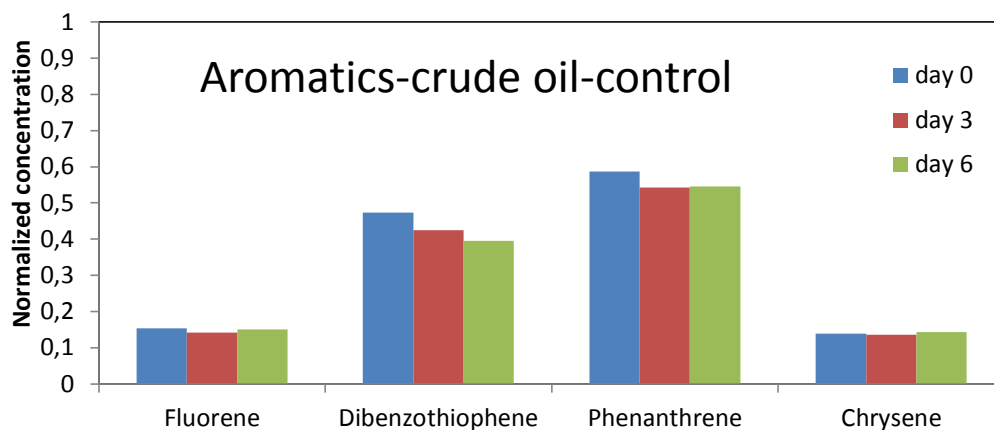
Στον Πίνακα 5.2, παρατίθεται η εκατοστιαία αποικοδόμηση των επιμέρους αλκανίων στις δέκα μέρες των πειραμάτων. Για το πείραμα B1CF, η χρονική διάρκεια της βιοαποικοδόμησης είναι οι έξι ημέρες, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα υπόλοιπα αποτελέσματα.

Πίνακας 5.2: Εκατοστιαία βιοαποικοδόμηση των αλκανίων για τα τέσσερα πειράματα που έλαβαν χώρα.

Depletion, %								
Sample	B1C		B1CF		B1M		B1MF	
Compound	6 days	10 days	6 days	10 days	6 days	10 days	6 days	10 days
C12	89,95	97,45	93,50		31,38	19,89	29,15	19,24
C13	80,55	97,74	13,70		87,19	82,91	13,90	7,68
C14	20,24	28,47	31,18		95,63	94,89	3,32	4,99
C15	85,21	63,67	42,12		98,03	96,83	49,60	64,54
C16	89,43	85,01	2,54		78,24	94,18	73,58	83,48
C17	70,82	74,02	98,72		92,49	92,12	83,06	93,41
Pr	45,03	96,53	31,49		95,99	92,64	57,99	90,27
C18	66,10	76,19	90,74		75,28	91,78	83,57	92,04
Ph	43,50	33,79	18,55		52,95	91,59	51,70	86,80
C19	66,55	78,03	95,89		66,36	88,11	86,58	94,04
C20	58,62	51,97	35,46		83,90	86,14	85,75	92,02
C21	66,18	45,69	32,48		84,17	86,00	87,41	92,25
C22	63,11	48,74	29,23		79,96	85,68	86,56	91,40
C23	64,10	45,74	31,92		79,90	85,12	87,50	92,30
C24	61,82	54,03	21,55		75,63	82,46	84,09	89,81
C25	61,58	57,93	36,52		75,83	81,08	78,86	88,59
C26	61,77	34,39	23,69		75,09	82,82	81,55	89,37
C27	61,88	63,23	25,50		72,80	82,92	83,67	91,68
C28	60,44	57,59	31,97		71,12	84,15	82,31	89,81
C29	56,53	61,08	30,20		69,43	86,43	84,15	90,90
C30	52,49	54,21	43,65		82,46	88,42	77,64	87,82
C31	60,60	27,27	41,48		79,77	88,76	73,14	87,71
C32	63,82	24,57	31,66		73,41	89,37	76,53	88,08
C33	67,49	64,45	33,43		62,73	87,61	67,71	84,76
C34	50,51	51,32	44,53		73,03	70,29	33,60	60,49
C35	45,50	38,59	33,59		54,94	78,42	41,16	64,16

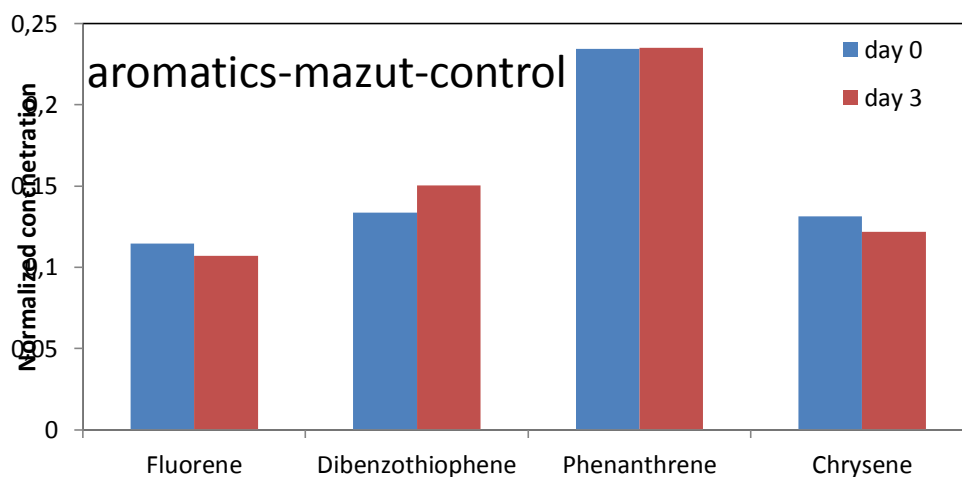
- **Αρωματικά**

Η βιοαποικοδόμηση των αρωματικών σε σχέση με την αντίστοιχη των αλκανίων κυμαίνεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς τα αρωματικά με την πιο πολύπλοκη δομή τους και το μεγάλο μοριακό βάρος τους, καθιστούν πολύ δύσκολη την αποδιάταξη της δομής τους.



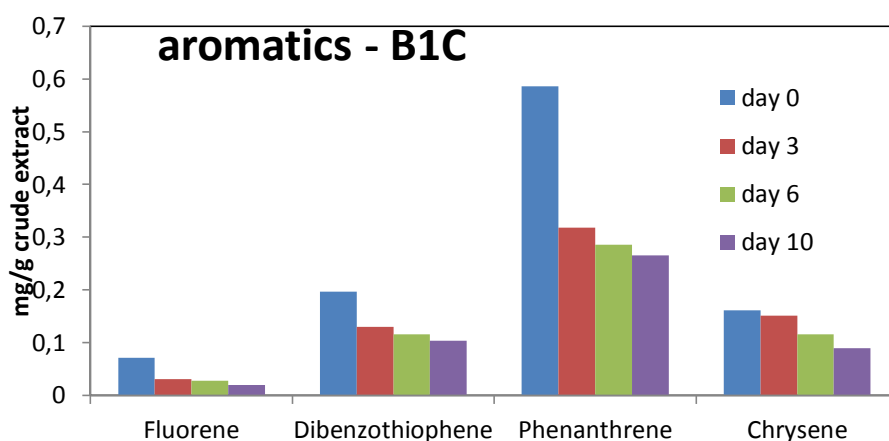
Σχήμα 5.8: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο απουσία μικροβιακού φορτίου, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Στα δύο διαγράμματα, που δεν έχει προστεθεί μικροβιακό φορτίο, φαίνεται καθαρά ότι τα μελετώμενα συστατικά δεν μεταβάλλονται συναρτήσει του χρόνου (Σχήμα 5.8, 5.9).



Σχήμα 5.9: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ απουσία μικροβιακού φορτίου, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

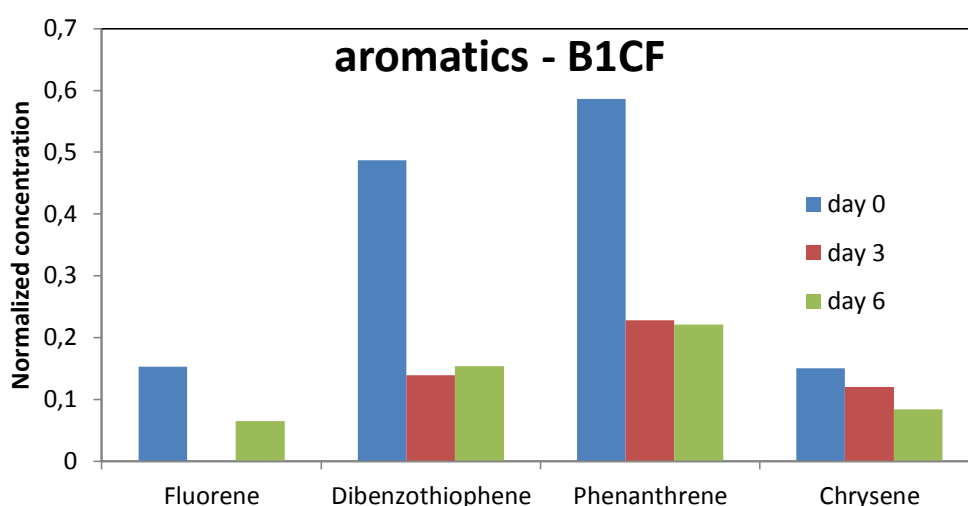
Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζεται η βιοαποικοδόμηση των αρωματικών για το πείραμα B1C, με αργό πετρέλαιο και την μικροβιακή κοινότητα E1.



Σχήμα 5.10: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο και την μικροβιακή κοινότητα E1, συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Σε όλα τα υπό εξέταση συστατικά φαίνεται η μείωση της συγκέντρωσης τους συναρτήσει του χρόνου. Η εκατοστιαία αποικοδόμηση είναι πολύ μικρή και φτάνει το 30% για το φενανθρένιο.

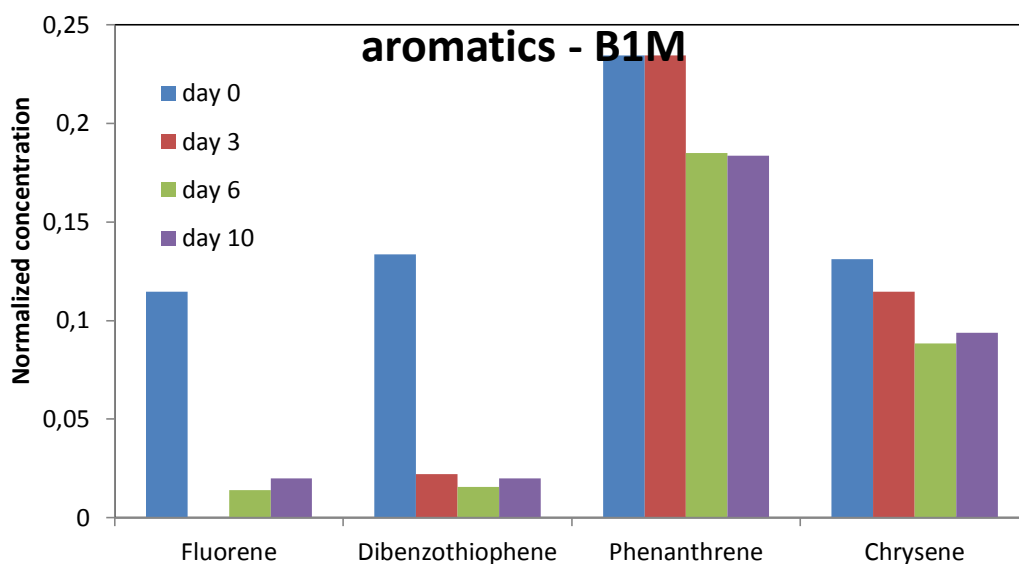
Στο επόμενο πείραμα που παρουσιάζεται (Σχήμα 5.11), στο οποίο έχει προστεθεί το ενισχυτικό βιοαποικοδόμησης, η βιοαποικοδόμηση των αρωματικών είναι αρκετά υψηλή, παρά το ότι η χρονική διάρκεια του πειράματος είναι μόλις έξι ημέρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης παρατηρείται για το φενανθρένιο και το διβενζοθειοφένιο, που είναι μεγαλύτερο από 50%.



Σχήμα 5.11: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με αργό πετρέλαιο, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1 συναρτήσει χρόνου. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

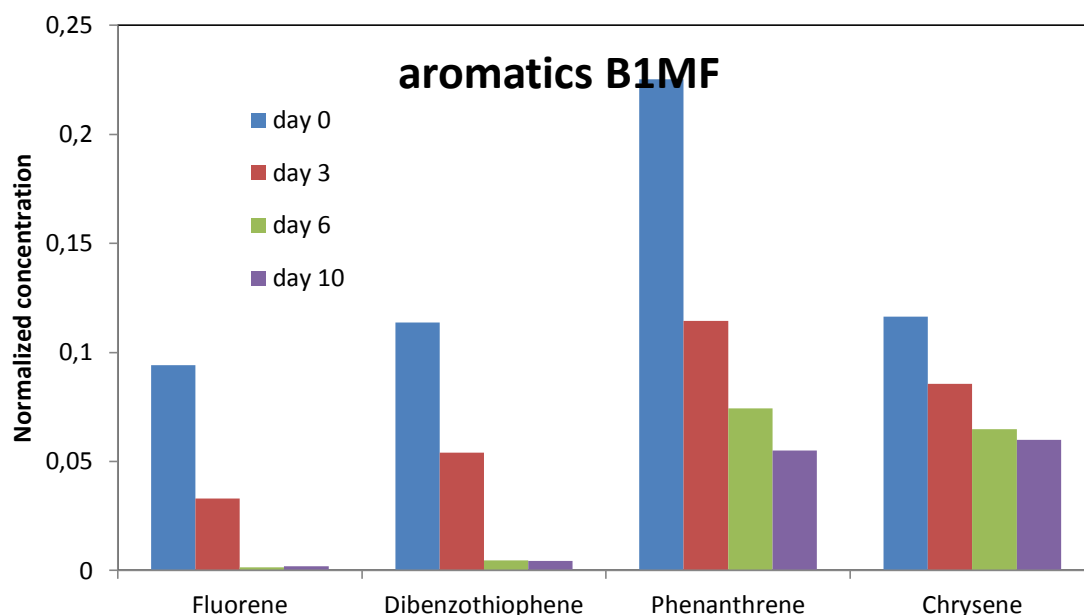
Παρά το ότι το πείραμα διήρκεσε μόνο έξι μέρες, είναι φανερό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης των συγκεκριμένων αρωματικών λαμβάνει χώρα τις τρεις πρώτες μέρες.

Στη πειράματα με το μαζούτ και την μικροβιακή κοινότητα παρατηρείται αρκετά μεγάλο ποσοστό αποικοδόμησης των αρωματικών φλουορένιο και δεβενζοθειοφένιο, >80%, ενώ στους δύο άλλους αρωματικούς υδρογονάνθρακες είναι πολύ μικρότερη (13-20%). Και σε αυτή την περίπτωση, το μεγαλύτερο ποσοστό της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιείται μέσα σε τρεις μέρες.



Σχήμα 5.12: Συγκέντρωση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Η προσθήκη του S-200 στην καλλιέργεια με το μαζούτ, οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης της μεγαλύτερης αλυσίδας αρωματικών. Συγκεκριμένα, για το φενανθρένιο, η αποικοδόμηση πλησιάζει το 80% (Σχήμα 5.13). Και εδώ το μεγαλύτερο ποσοστό της βιοαποικοδόμησης λαμβάνει χώρα στις έξι πρώτες μέρες.



Σχήμα 5.13: Βιοαποικοδόμηση αρωματικών κατά το πείραμα με μαζούτ, S-200 και την μικροβιακή κοινότητα E1. Η συγκέντρωση των αρωματικών είναι κανονικοποιημένη ως προς το χοπάνιο.

Πίνακας 5.3: Εκατοστιαία βιοαποικοδόμηση των αρωματικών για τα τέσσερα πειράματα που έλαβαν χώρα.

Sample	Depletion, %							
	B1C		B1CF		B1M		B1MF	
	6 days	10 days	6 days	10 days	6 days	10 days	6 days	10 days
Fluorene	39,15	37,58	43,36		84,79	79,99	98,80	98,66
Dibenzothiophene	23,79	16,74	57,60		85,48	82,85	97,01	97,56
Phenanthrene	37,01	28,80	49,36		2,25	9,85	75,37	84,36
Chrysene	6,85	12,67	24,76		16,51	17,74	58,49	66,99

Πίνακας 5.4: Ειδικός ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος (μ) και ο ειδικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης (q_s) για κάποια συστατικά του πετρελαίου.

		B1C	B1CF
μ (1/h)		0,028	0,047
q_s (ng compound/g crude oil)/(CFU/ml*h)	C15	0,12	0,16
	C20	0,15	0,21
	C25	0,148	0,091
	C30	0,074	0,154
	Fluorene	$1,57 \cdot 10^{-4}$	$2,62 \cdot 10^{-4}$
	Dibenzothiophene	$11,54 \cdot 10^{-4}$	$20,60 \cdot 10^{-4}$
	Phenanthrene	$41,83 \cdot 10^{-4}$	$86,61 \cdot 10^{-4}$
	Chrysene	$8,76 \cdot 10^{-4}$	$14,23 \cdot 10^{-4}$

Αυτό που αξίζει να παρατηρηθεί κατά τις περιπτώσεις της βιοαποικοδόμησης που μελετήθηκαν, είναι ότι η προσθήκη S-200 και στις δύο περιπτώσεις πετρελαϊκής μόλυνσης, δεν επηρέασαν ιδιαίτερα την βιοαποικοδόμηση των αλκανίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι, όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 4, η συγκεκριμένη βακτηριακή κοινότητα παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με το γένος *Alcanivorax Borkumensis*. Το συγκεκριμένο βακτήριο διαθέτει ούτως ή άλλως την ικανότητα αποικοδόμησης των αλκανίων. Γι' αυτό το λόγο, η επίδραση του λιπάσματος είναι εμφανής κυρίως στα αρωματικά που εξετάστηκαν.

Στον Πίνακα 5.3, φαίνεται ότι το λίπασμα ενίσχυσε την αποικοδόμηση των αρωματικών υδρογονανθράκων, πέραν μίας περίπτωσης, και σε κάποιες περιπτώσεις σχεδόν διπλασίασε την εκατοστιαία αποικοδόμηση των συγκεκριμένων συστατικών.

Από τους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης, μεταξύ των διαφορετικών πειραμάτων, παρατηρείται η προσθήκη S-200 στη μικροβιακή καλλιέργεια οδηγεί σε διπλασιασμό του ρυθμού ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό συνδέεται με το ότι και ο ειδικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης των περισσότερων εξεταζόμενων συστατικών – κυρίως αρωματικών- αυξάνεται, πράγμα που υποδηλώνει ότι η βιοαποικοδόμηση σχετίζεται με τη βακτηριακή ανάπτυξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν μέρος της ομάδας των τασιενεργών ενώσεων, βιολογικής προέλευσης. Αποτελούνται από υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα, συσσωρεύονται σε διεπιφάνειες, σχηματίζουν μικκύλια, μειώνουν την επιφανειακή τάση και με αυτό τον τρόπο ενισχύουν την διαλυτότητα των ασθενά διαλυτών ενώσεων στο νερό. Εξαιτίας της μη-τοξικότητας τους και της υψηλής αποδοτικότητας τους, αποτελούν το βέλτιστο μέσο για βιομηχανικές εφαρμογές, όπως είναι η ανάκτηση πετρελαίου [58-59], και η επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης των μολυσμένων περιοχών από πετρελαιοειδή [107].

Παρόλο που οι διάφορες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν κοινά αμφίφιλα χαρακτηριστικά, η βασική τους δομή κυμαίνεται σε ευρύ φάσμα. Τα γλυκολιπίδια είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, με πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα τα ραμνολιπίδια και τα σοφορολιπίδια[98-99]. Για αυτό το λόγο, η παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών στην παρούσα εργασία, είχε ως στόχο αυτά τα δύο γλυκολιπίδια.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή ραμνολιπιδίων και σοφορολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, των θρεπτικών και της θερμοκρασίας, ενώ ταυτόχρονα για όλα τα πειράματα ελέγχθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη κάθε καλλιέργειας, με οπτική απορρόφηση και με την καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι μικροβιακές κοινότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η EB8 κατά κύριο λόγο, μία μικροβιακή κοινότητα που απομονώθηκε βάσει της ιδιότητας της να παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, ενώ ταυτόχρονα ελέγχθηκε και η μικροβιακή κοινότητα E8.

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6.1: Πειραματικές συνθήκες για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ, °C	ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ N, P	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ, ΗΜΕΡΕΣ
20-25-30	Αργό πετρέλαιο (0.5% w/v) Μελάσα & αργό πετρέλαιο (0.25% w/v το καθένα)	ONR7, Προσθήκη N, P (100:10:1) Θαλασσινό νερό	5-10

Η αναλογία C:P:N στο θρεπτικό μέσο ONR7 χωρίς προσθήκη επιπλέον θρεπτικών N, P, είναι 100:0,28:0,26 (w:w:w).

Για την δημιουργία υγρών καλλιιεργειών, χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες Erlenmeyer 250 ml, στις οποίες επώζονταν 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου, με την επιθυμητή μικροβιακή κοινότητα και θρεπτικά. Η ανακίνηση των καλλιιεργειών ήταν σταθερή σε όλα τα πειράματα και ίση με 150 rpm. Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, στις καλλιέργειες γινόταν εκχύλιση και εν συνεχεία χρωματογραφία στήλης, έτσι ώστε να απομονωθεί η επιθυμητή βιοεπιφανειοδραστική ένωση.

Μετά την απομόνωση της ένωσης, επιβεβαιωνόταν η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος με τη μέθοδο FT-IR.

Οι καλλιέργειες που μελετήθηκαν για την παραγωγή ραμνολιπιδίων και σοφορολιπιδίων ήταν οι εξής:

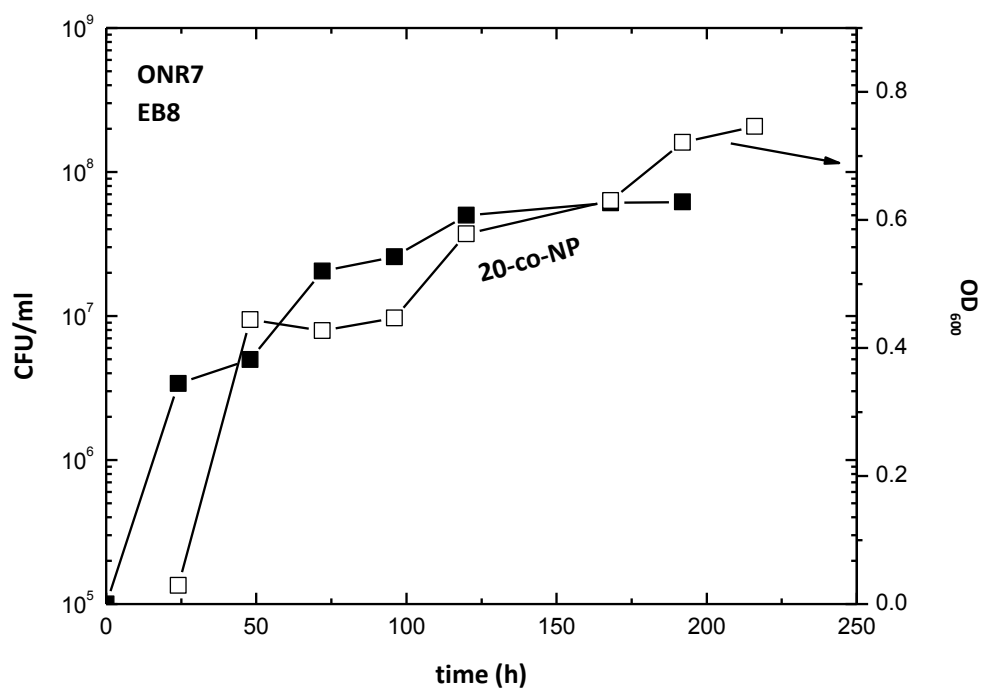
- **20-co-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο (0,5%w/v), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 20° C.
- **20-mol-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο και μελάσα (0,25% w/v το καθένα), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 20° C.
- **25-co-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο (0,5% w/v), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 25° C.

- **25-mol-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο και μελάσα (0,25% w/v το καθένα), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 25° C.
- **30-co:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο (0,5% w/v), την βακτηριακή κοινότητα EB8 και επώαση στους 30° C.
- **30-mol:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο και μελάσα (0,25% w/v το καθένα), την βακτηριακή κοινότητα EB8 και επώαση στους 30° C.
- **30-co-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο (0,5% w/v), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 30° C.
- **30-mol-NP:** καλλιέργεια με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο και μελάσα (0,25% w/v το καθένα), την βακτηριακή κοινότητα EB8, με πρόσθετα θρεπτικά N, P και επώαση στους 30° C.

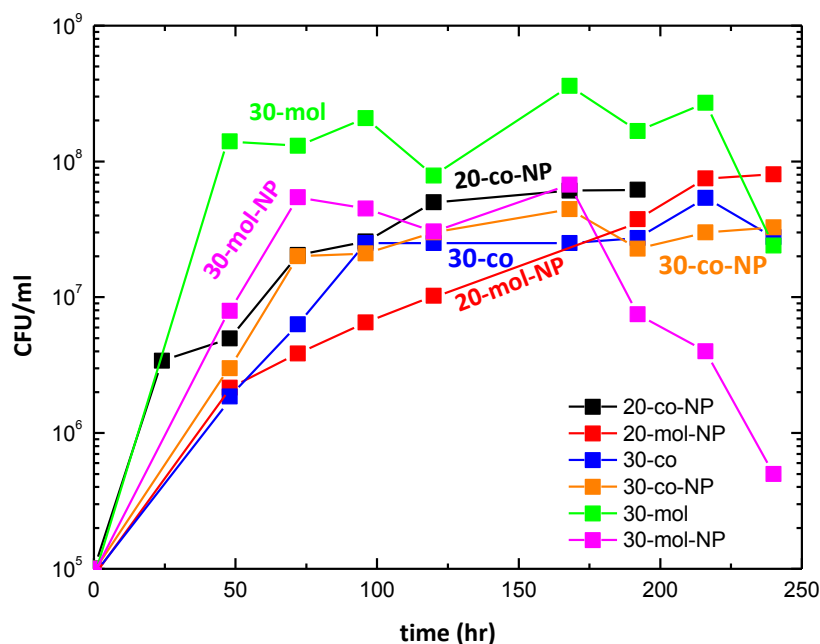
6.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ EB8 ΥΠΟ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Για την παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, έπρεπε αρχικά να διασφαλιστεί η επιτυχής ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό τις αντίστοιχες συνθήκες.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρατίθεται η ανάπτυξη της χρησιμοποιούμενης μικροβιακής κοινότητας, στις διαφορετικές συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων.



Σχήμα 6.1: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας EB8, στους 20° C, σε θρεπτικό μέσο ONR7a, με επιπλέον θρεπτικά N,P και με πηγή άνθρακα, 0,5% w/v αργό πετρέλαιο. Τα ανοιχτά σύμβολα αντιστοιχούν στην οπτική πυκνότητα των δειγμάτων, ενώ τα κλειστά αντιστοιχούν στις μετρούμενες αποικίες κατά τη μέθοδο της επίστρωσης των τρυβλίων.



Σχήμα 6.2: Καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής κοινότητας EB8, σε όλες τις συνθήκες των πειραμάτων.

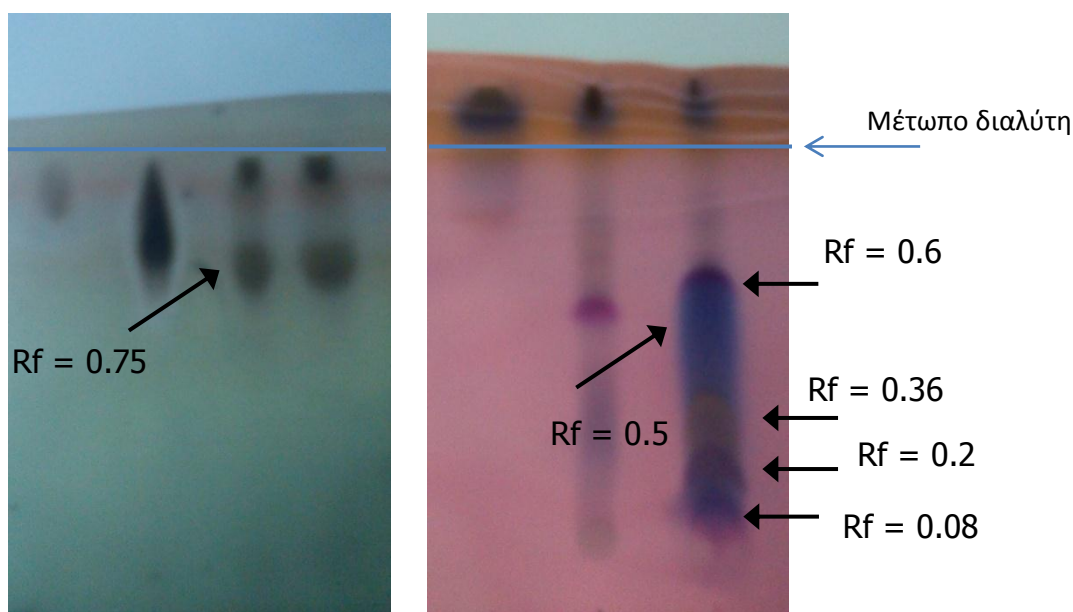
Από το Σχήμα 6.1 φαίνεται η σύγκλιση των αποτελεσμάτων της οπτικής απορρόφησης με τα αποτελέσματα της καλλιεργητικής μεθόδου διαδοχικών αραιώσεων. Η μεγάλη διαφορά εμφανίζεται τις πρώτες μέρες, όπου λόγω μειωμένης μικροβιακής δραστηριότητας η απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας δίνει χαμηλές τιμές, ενώ και τις τελευταίες μέρες υπάρχει απόκλιση, καθώς κατά τη μέθοδο της οπτικής απορρόφησης λαμβάνονται υπόψη και τα νεκρά κύτταρα.

Από το γράφημα όπου γίνεται η σύγκριση της ανάπτυξης μεταξύ των διαφορετικών πειραμάτων (Σχήμα 6.2) φαίνεται ότι σε όλες τις διαφορετικές συνθήκες, η ανάπτυξη της κοινότητας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και θρεπτικών, ενώ η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρουσιάζεται για την καλλιέργεια που επώαστηκε στους 30° C, με πηγή άνθρακα μελάσα και αργό πετρέλαιο, χωρίς προσθήκη N,P.

6.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Η επιβεβαίωση της ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είτε στο εκχύλισμα, είτε στα διάφορα κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης επιβεβαιώθηκε από την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ τα κλάσματα της στήλης χαρακτηρίστηκαν από την φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).

Στην πρώτη εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας για τα ραμνολιπίδια και τα σοφορολιπίδια.



Σχήμα 6.7: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τα ραμνολιπίδια στην αριστερή φωτογραφία και για τα σοφορολιπίδια στην δεξιά.

Στην χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, το χαρακτηριστικό μέγεθος R_f , που φαίνεται και στις δύο περιπτώσεις βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, είναι αυτό που οδηγεί στο χαρακτηρισμό της κάθε ένωσης. Το μέγεθος R_f ορίζεται ως το ύψος εμφάνισης της κουκίδας προς το ύψος που έχει ανέλθει ο διαλύτης.

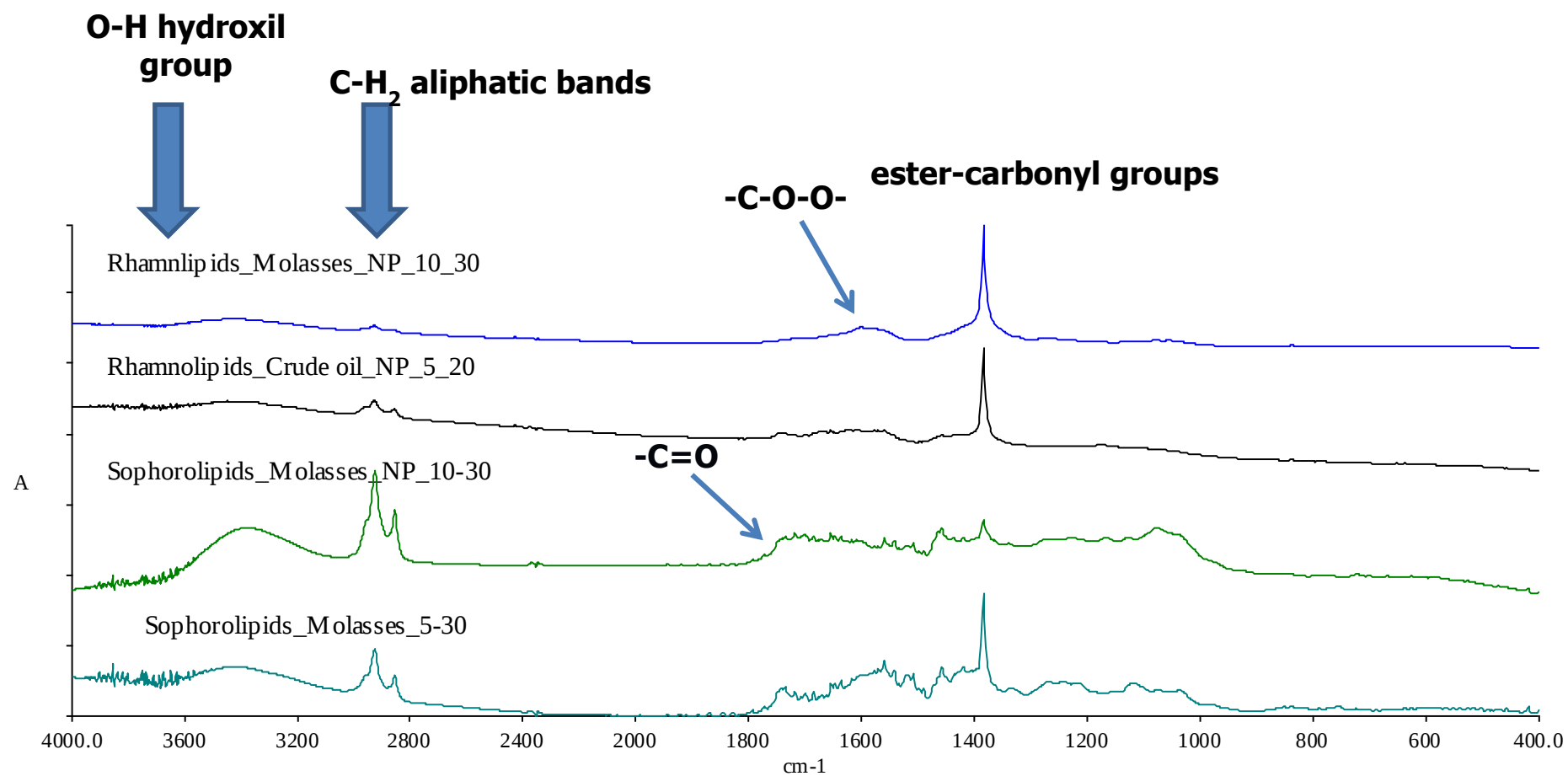
Στην περίπτωση των ραμνολιπιδίων, στην τιμή $R_f=0,75$ αντιστοιχεί σε γνωστό ραμνολιπίδιο, που συναντάται στην βιβλιογραφία [110].

Ταυτόχρονα, τα διάφορα σημεία που εμφανίζονται στην δεξιά εικόνα, κατά την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά ως σοφορολιπίδια [111-113].

Το προφίλ που προέκυψε από τη φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, παρουσιάζει τις δύο απομονωμένες βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις. Τα ραμνολιπίδια αντιστοιχούν στη μπλε και στη μαύρη γραμμή, ενώ τα σοφορολιπίδια στην πράσινη και την γαλάζια.

Η κορυφή στα 3161 cm^{-1} , είναι χαρακτηριστικό ύπαρξης ομάδας υδροξυλίων, ενώ η κορυφή στα 2967 cm^{-1} υποδηλώνει μεθυλομάδες αλειφατικής αλυσίδας. Η απορρόφηση στα 1721 cm^{-1} δείχνει την ύπαρξη του δεσμού C=O -, στα 1570 cm^{-1} COO- ενώ η κορυφή στα 1250 cm^{-1} υποδηλώνει ύπαρξη καρβονυλίου.

Όλες αυτές οι κορυφές υποδεικνύουν την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικής ένωσης - και συγκεκριμένα γλυκολιπιδίων- στα απομονωμένα μετρούμενα δείγματα [114-115]. Η ύπαρξη καθαρών κορυφών επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομόνωσης των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Επίσης, φαίνεται και στις δύο περιπτώσεις βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας, το προφίλ της κάθε είδους ένωσης επαναλαμβάνεται, παρουσιάζοντας κορυφές στα ίδια σημεία.



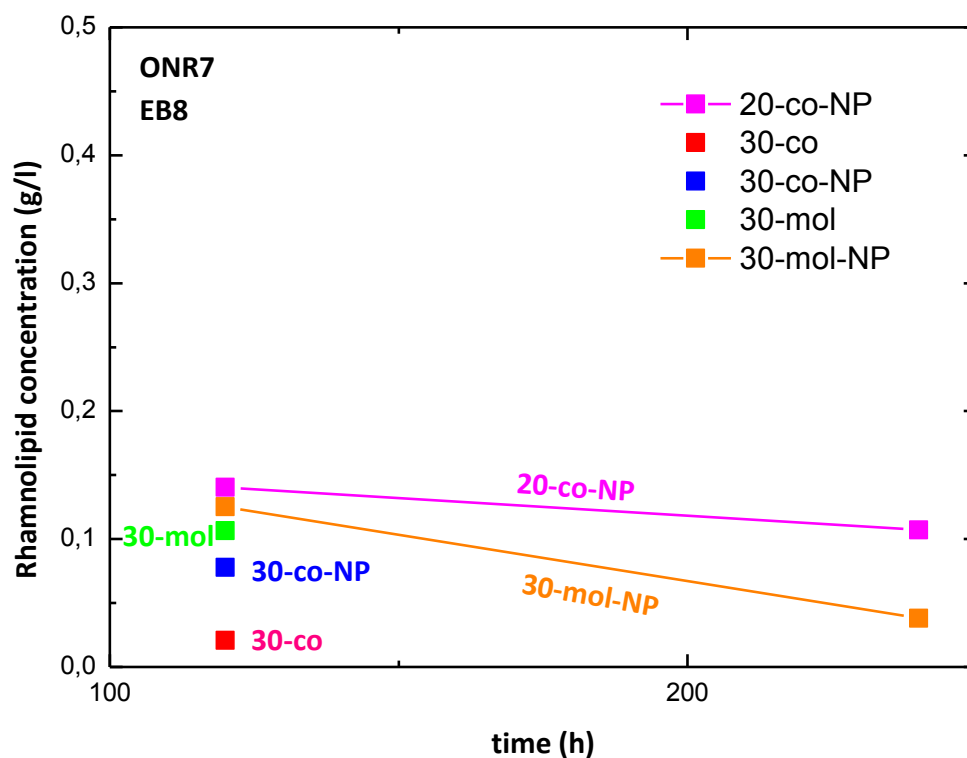
Σχήμα 6.7: Φασματοφωτομετρικό προφίλ των λυοφιλοποιημένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που απομονώθηκαν.

6.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Στα πειράματα που έγιναν για την παραγωγή ραμνολιπιδίων στις 5 και στις 10 μέρες, η παραγωγή της συγκεκριμένης επιφανειοδραστικής ουσίας φαίνεται να παραμένει σταθερή, με μικρή καθοδική κλίση.

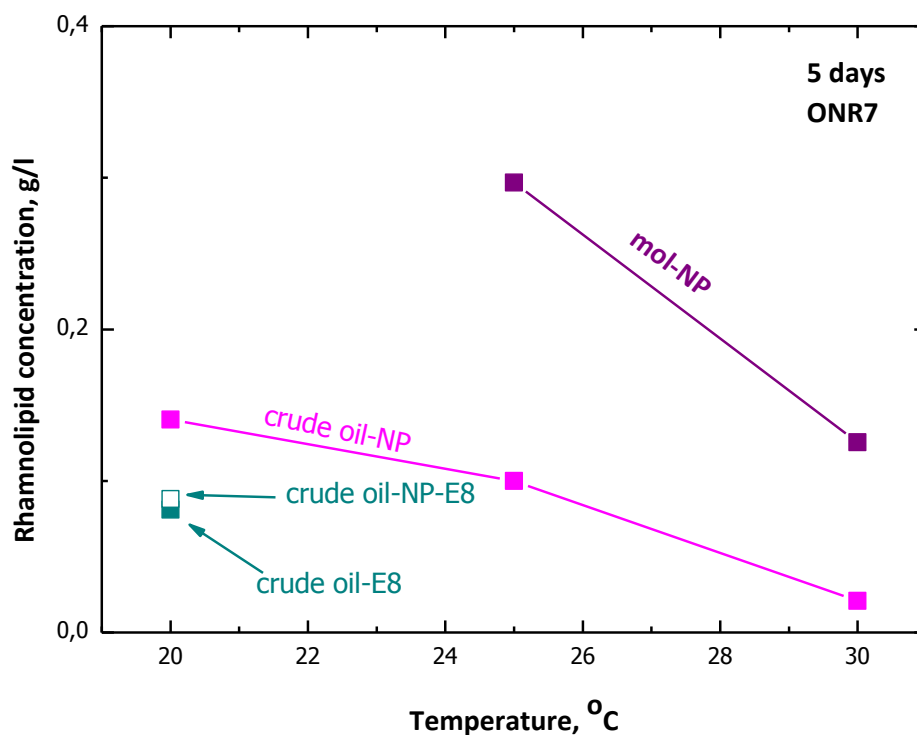
Συγκεκριμένα, στο σχήμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται η παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου από την κοινότητα EB8, σε διάφορες θερμοκρασίες, με πηγή άνθρακα το πετρέλαιο και μελάσα με πετρέλαιο ενώ συγκρίνονται οι περιπτώσεις προσθήκης ή μη θρεπτικών N, P.

Σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα, παρατηρείται μικρή μείωση στην παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, για τις δεδομένες συνθήκες, η όποια θα μπορούσε να θεωρηθεί και σταθερή. Ταυτόχρονα, η προσθήκη των θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής των συγκεκριμένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.



Σχήμα 6.3: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, γίνεται η σύγκριση της παραγωγής των ραμνολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας. Στο Σχήμα 6.4 εκτός από τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν για την παραγωγή ραμνολιπιδίων από την κοινότητα EB8, με πράσινα σύμβολα παρατίθεται η παραγωγή των συγκεκριμένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από την κοινότητα E8.



Σχήμα 6.4: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας, από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές θρεπτικών.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης των δειγμάτων οδηγεί σε μείωση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, είτε για τα δείγματα με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο, είτε για τα δείγματα με πηγή άνθρακα μελάσα και αργό πετρέλαιο. Αυτό το γεγονός είναι απόλυτο λογικό, καθώς η συγκεκριμένη βακτηριακή κοινότητα έχει απομονωθεί από τη θάλασσα, της οποίας η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 12 έως 15° C, οπότε είναι εγκλιματισμένη στις αντίστοιχες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Ταυτόχρονα παρατηρείται ότι για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, η βέλτιστη πηγή άνθρακα είναι ο συνδυασμός μελάσας με αργό πετρέλαιο στους 25° C, αν και είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί πείραμα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για την επιβεβαίωση των παραπάνω.

Αξίζει να επισημανθεί, το ότι η χαμηλότερη παραγωγή των ραμνολιπιδίων παρουσιάζεται στην περίπτωση του πειράματος που έγινε με την συνολική κοινότητα E8 (hydrocarbon degraders-πράσινα σημεία). Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα της παραγωγής των ραμνολιπιδίων από την βακτηριακή κοινότητα E8.

Πίνακας 6.2: παραγωγή ραμνολιπιδίων από την βακτηριακή κοινότητα E8, στις συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, για χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Θερμοκρασία (°C)	Προσθήκη N,P	Συγκέντρωση απομονωμένων ραμνολιπιδίων (g/l)
20	✓	0,0879
20	-	0,08105

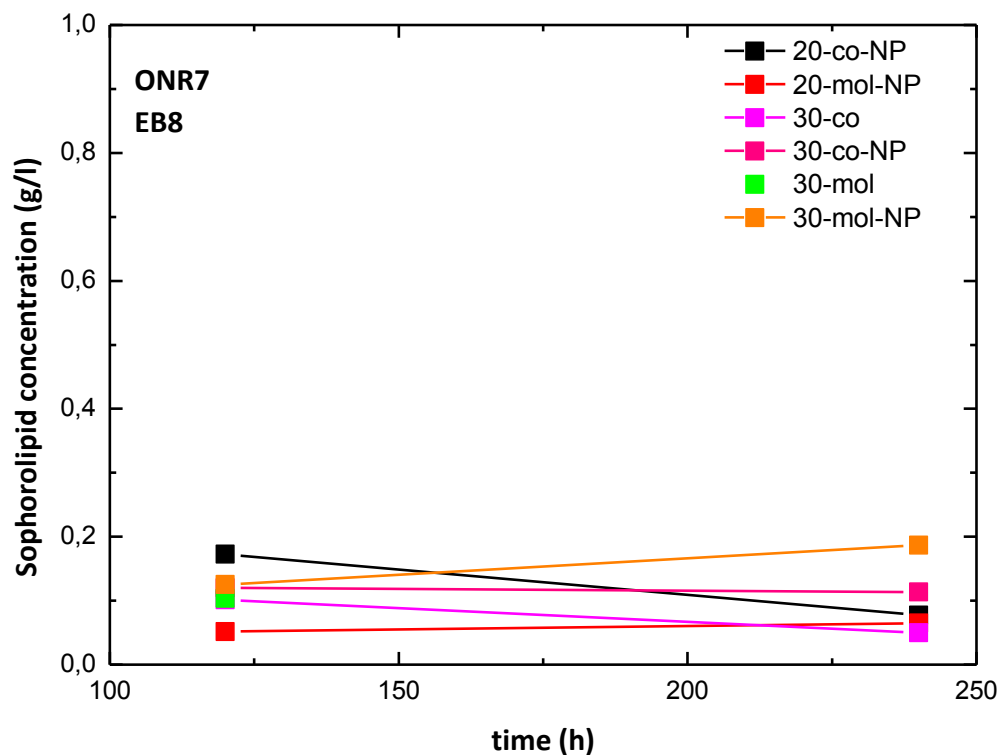
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η παραγωγή των ραμνολιπιδίων από την συγκεκριμένη βακτηριακή κοινότητα είναι αρκετά χαμηλή, οπότε τα πειράματα εστιάστηκαν κυρίως στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από την βακτηριακή κοινότητα EB8, η οποία απομονώθηκε βάσει του χαρακτηριστικού της να παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες (biosurfactant producers). Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση στην οποία στηρίχτηκε η απομόνωση των μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.

6.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Η παραγωγή των σοφορολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας παρουσιάζει σταθερότητα συναρτήσει του χρόνου. Για όλα τα πειράματα που έλαβαν χώρα, η παραγωγή των σοφορολιπιδίων ήταν μικρή και σταθερή, με μέγιστη παραγωγή τα 0,18 g/l για τους 20° C ως θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας, με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο και με πρόσθετα θρεπτικά N, P.

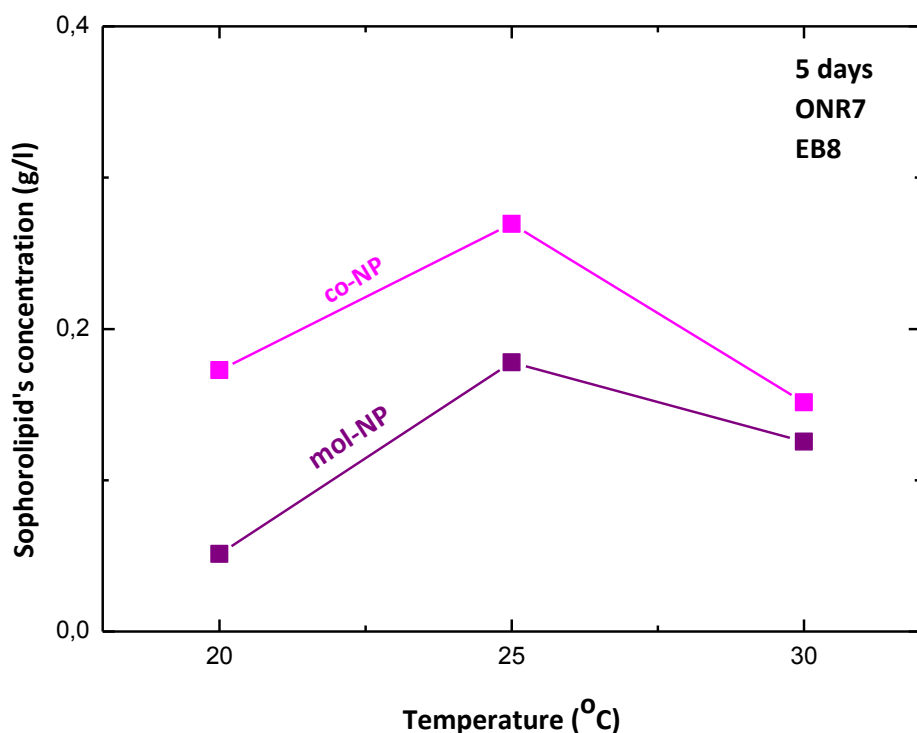
Η σταθερή παραγωγή των δύο αυτών τύπων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, σοφορολιπίδια και ραμνολιπίδια (Σχήμα 6.5 και 6.3 αντίστοιχα), είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι τα βακτήρια παράγουν τόση ποσότητα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, όση χρειάζονται για να διαλυτοποιήσουν το πετρέλαιο, επομένως δεν είναι δυνατόν να συσσωρευτεί παραπάνω με το πέρασμα του χρόνου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι μέρος των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιείται ταυτόχρονα για την διαλυτοποίηση του πετρελαίου. Οπότε, αυτή η φαινομενική σταθερή παραγωγή, στη πραγματικότητα ενδέχεται να είναι αυξημένη, αλλά για την επιβεβαίωση των παραπάνω, επιβάλλεται να μελετηθεί περαιτέρω το φαινόμενο της παραγωγής των ουσιών αυτών.

Στο Σχήμα 6.6 παρουσιάζεται η παραγωγή των σοφορολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα διαφορετικά πειράματα που έλαβαν χώρα.



Σχήμα 6.5: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων.

Η παραγωγή των σοφορολιπιδίων για διαφορετικές θερμοκρασίες φαίνεται να παρουσιάζει ίδιο μοτίβο με το προηγούμενο διάγραμμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δύο σημεία στους 25° C δεν είναι αντιπροσωπευτικά, καθώς έχει πραγματοποιηθεί μόνο ένα πείραμα.



Σχήμα 6.6: Παραγωγή των σοφορολιπιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας από την βακτηριακή κοινότητα EB8, στις διαφορετικές συνθήκες θρεπτικών.

Στην περίπτωση των σοφορολιπιδίων φαίνεται ότι η βέλτιστη πηγή άνθρακα για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια είναι το αργό πετρέλαιο.

Συνοψίζοντας, το βασικό που μπορεί να παρατηρηθεί από τη συγκεκριμένη έρευνα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, είναι ότι παρόλο που για την βακτηριακή ανάπτυξη οι βέλτιστες συνθήκες επώασης της μικροβιακής κοινότητας είναι στους 30° C, με μελάσα και πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα, σε καμία περίπτωση η συγκεκριμένη θερμοκρασία δεν ευνοεί την παραγωγή των μελετούμενων ουσιών. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι εφόσον οι μικροοργανισμοί έχουν άμεσα διαθέσιμη πηγή άνθρακα, η οποία δεν χρειάζεται διαλυτοποίηση (μελάσα), δεν αποτελεί επιτακτική ανάγκη η διαλυτοποίηση του πετρελαίου, και επομένως η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκε δείγμα για την απομόνωση μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο (Ζάκυνθος, Ελευσίνα), δεν βρέθηκαν ρυπασμένες από τους ρύπους που μελετήθηκαν. Το διαλυμένο και το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο κυμαίνονταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Το ίδιο ισχύει και για τα χλωριόντα, τα αιωρούμενα στερεά και τα μέταλλα που μελετήθηκαν. Τέλος, ως προς το μικροβιακό φορτίο, τα συγκεκριμένα νερά μπορούν να θεωρηθούν ως ύδατα εξαιρετικής ποιότητας.
- Όσον αφορά τις απομονωμένες κοινότητες, η ανάπτυξη όλων των βακτηριακών κοινοτήτων που απομονώθηκαν, έφτανε στη στάσιμη φάση για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την Ελευσίνα στις 50 ώρες, ενώ για τη Ζάκυνθο στις 75, στην οποία και παρέμεναν για περίπου 200 ώρες. Το γεγονός αυτό δείχνει τον αυξημένο εγκλιματισμό των κοινοτήτων της Ελευσίνας στο συγκεκριμένο ρύπο.
- Οι κοινότητες που απομονώθηκαν από την Ελευσίνα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη υδροφοβικότητα, σε σχέση με τις αντίστοιχες της Ζακύνθου. Το συγκεκριμένο μέγεθος ουσιαστικά αποτελεί έμμεση εκτίμηση του ποσοστού των κυττάρων που προσκολλώνται στο πετρέλαιο και επομένως είτε το χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα, είτε προκαλούν τη διαλυτοποίηση του παράγοντας βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Το γεγονός αυτό είναι απόλυτο λογικό, καθώς ο κόλπος της Ελευσίνας είναι επιβαρυμένος εδώ και χρόνια από πετρελαιοειδή, και επομένως οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν είναι πιο εγκλιματισμένοι στις συγκεκριμένες συνθήκες.
- Η φυλογενετική ανάλυση των κοινοτήτων, έδειξε ότι οι απομονωμένες κοινότητες έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα με το γένος *Alcanivorax*, ανεξαρτήτως προέλευσης, αλλά ταυτόχρονα τα κοινά γένη βακτηρίων τα οποία εμφανίζονται στις περισσότερες κοινότητες είναι τα *Halomonas*, *Marinobacter*, *Cycloclasticus*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Marinomonas*.

- Η κοινότητα E1 διαθέτει ικανοποιητικές ιδιότητες αποικοδόμησης των πετρελαιοειδών. Σε μόλις δέκα μέρες, σε περιβάλλον μειωμένων θρεπτικών, η αποδόμηση των μικρής αλυσίδας αλκανίων έφτασε το 97% (C12-C13), ενώ για τα υπόλοιπα κορεσμένα συστατικά του πετρελαίου η αποικοδόμηση ήταν μεταξύ του 40-60%, στην περίπτωση του αργού πετρελαίου. Παρόμοια συμπεριφορά έδειξε και στην περίπτωση ρύπανσης από μαζούτ. Η αποικοδόμηση κατά το πείραμα με μαζούτ ήταν πολύ αυξημένη στα μεγαλύτερης αλυσίδας αλκάνια, στα οποία έφτασε και το 85%.
- Η βιοαποικοδόμηση από την βακτηριακή κοινότητα E1, στην περίπτωση όπου ο ρύπος είναι αργό πετρέλαιο λαμβάνει χώρα σε τρεις μέρες, ενώ όταν ο ρύπος είναι μαζούτ πραγματοποιείται σε έξι μέρες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η κοινότητα εμπλουτίστηκε και απομονώθηκε με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο, γεγονός που υποδεικνύει εξοκείωση με τον συγκεκριμένο ρύπο.
- Η προσθήκη ενισχυτικού βιοαποικοδόμησης, S-200, ενίσχυσε κυρίως την βιοαποικοδόμηση των αρωματικών, τα οποία στην περίπτωση του αργού πετρελαίου παρουσίασαν εκατοστιαία αποικοδόμηση για το φλουορένιο 47%, έναντι του 37% που έλαβε χώρα χωρίς το S-200. Ίδια είναι και η διαφορά στην περίπτωση του μαζούτ, όπου από 75% για το φλουορένιο, φτάνουμε στο 83% της μείωσης του με την προσθήκη του S-200. Η διαφορά αυτή είναι λογική, καθώς εφόσον η κοινότητα παρουσιάζει ομοιότητα κυρίως με το γένος *Alcanivorax*, διαθέτει ούτως ή άλλως την ικανότητα αποικοδόμησης των αλκανίων.
- Ταυτόχρονα, η κινητική της αποικοδόμησης έδειξε ότι με προσθήκη S-200, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης διπλασιάζεται ενώ την ίδια στιγμή για οχτώ εξεταζόμενα συστατικά αυξάνεται και ο ειδικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι η διεργασία της βιοαποικοδόμησης σχετίζεται με την βακτηριακή ανάπτυξη.
- Στην παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, παρατηρήθηκε ότι η κοινότητα EB8 παράγει σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα ραμνολιπιδίων, σε σχέση με την κοινότητα E8, της οποίας αποτελεί τμήμα. Πράγμα που σημαίνει ότι η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την απομόνωση κοινοτήτων που παράγουν επιτυχώς βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ήταν σωστή.

- Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παρατηρήθηκε συναρτήσει του χρόνου, ακολουθεί σταθερή τιμή. Ταυτόχρονα όμως, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μέρος των παραγόμενων επιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση του αργού πετρελαίου και τη χρήση του ως υπόστρωμα, οπότε αυτή η σταθερή παραγωγή είναι μόνο φαινομενική.
- Στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών συναρτήσει της θερμοκρασίας, παρατηρήθηκε πτώση της παραγωγής με αύξηση της θερμοκρασίας. Το γεγονός αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν προέρχονται από θαλάσσιο περιβάλλον και επομένως η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης τους είναι χαμηλή ($\sim 15^{\circ}\text{C}$).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σ . Μπινιάρης, Το περιβάλλον – Ρύπανση και προστασία, Αθήνα 2004
2. Ghose, A.K.; Crippen, G.M. *J. Chem. Znf: Comput. Sci.* **1987**, 27, 21-35.
3. http://www.aqualex.org/elearning/marine_environment/greek/chap2/chap2-2.html. Last accessed 12 May 2012.
4. Μ. Βεργέτης, Γ. Τριανταφύλλου, Περιβάλλον και Ανάπτυξη, Σημειώσεις, Αθήνα, 2004
5. Α. Γράψας, Βιομηχανική ανάπτυξη και Περιβάλλον, Σημειώσεις, Πειραιάς, 2008
6. http://www.na.teiath.gr/research/archimedes_8/description.html. Last access 28 May 2012
7. Β.Σ. Τσελέντης, Επιπτώσεις στα θαλάσσια οικοσυστήματα, Πειραιάς, 2009.
8. Bouchez-Naitali, M.; Rakatozafy, H.; Marchal, R.; Leveau, J.-Y.; Vandecasteele J.-P. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, 86, 421-428.
9. Barathi, S; Vasudevan, N. *Environ. Intl.* **2001**, 26, 413-416.
10. OSHA Technical Manual, Section iv: Chapter 2: Petroleum Refining Processes
σελ.10
11. Saadoun, I. *J. Basic Microbiol.* **2002**, 42, 420-428
12. Rahman, K.S.M; Thasira-Rahman, J; Lakshmanaperumalsamy, P; Banat, I.M. *Bioresource Technol.* **2002**, 85, 257-261.
13. Vinas, D.L.; Franco, H.A.; Gonzalez-Fernandez, J.J. *Polycyc. Aromat. Comp.* **2002**, 22, 161-173.
14. Bento, F.M.; Englert, G.E.; Gaylarde, C.C.; Muller, I.L. *Mater. Corros.* **2004**, 55, 577-585.
15. George, S.C.; Boreham, C.J.; Minifie, S.A; Teerman, S.C. *Org. Geochem.* **2002**, 33, 1293-1317.
16. Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. *Mol. Microbiol.* **2003**, 67, 503-549.
17. <http://www.google.gr/imgres?hl=el&client=firefox-a&hs=hx&sa=X&rls=org.mozilla:en-US:official&biw=1366&bih=580&tbnid=WVoo4F9->

- [NL0beM:&imgrefurl=http://news.discovery.com/tech/tech-used-clean-up-oil-spill.html&docid=MZuPIIqTGEX9bM&imgurl=http://news.discovery.com/tech/2010/05/01/boom-skimmer-825x625.jpg&w=825&h=625&ei=bpz6T8DfCjR4QSUmlly&zoom=1&iact=hc&vpx=83&vpy=141&dur=1690&hovh=195&hovw=258&tx=162&ty=114&sig=111959170033086209160&page=1&tbnh=118&tbnw=143&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0,i:69](http://news.discovery.com/tech/tech-used-clean-up-oil-spill.html&docid=MZuPIIqTGEX9bM&imgurl=http://news.discovery.com/tech/2010/05/01/boom-skimmer-825x625.jpg&w=825&h=625&ei=bpz6T8DfCjR4QSUmlly&zoom=1&iact=hc&vpx=83&vpy=141&dur=1690&hovh=195&hovw=258&tx=162&ty=114&sig=111959170033086209160&page=1&tbnh=118&tbnw=143&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0,i:69). Last access 10 June 2012.
18. <http://news.discovery.com/tech/tech-used-clean-up-oil-spill.html>. Last access 2 June 2012.
 19. <http://www.itopf.com/spill-response/clean-up-and-response/dispersants/>. Last access 2 June 2012.
 20. Buist, I.; McCourt, J.; Potter, S.; Ross, S.; Trudel, K. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 43–65
 21. Katsivela, E.; Moore, E.R.B.; Kalogerakis, N. *Water Air Soil Poll.* **2003**, 3, 103–115.
 22. Wilson, S.C.; Jones, K.C. *Environ. Pollut.* **1993**, 81, 229–249.
 23. Margesin, R.; Schinner, F. *Appl. Environ. Microb.* **2001**, 56, 650–663.
 24. Sepic, E.; Leskovsek, H.; Trier, C. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 695, 515–523.
 25. Madsen, E.L. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, 26, 1663–1673.
 26. Scow, K.M.; Hicks, K.A. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, 16, 246–253.
 27. Raymond, J.W.; Rogers, T.N.; Shonnard, D.R.; Kline, A.A. *J. Hazard. Mater.* **2001**, 84, 189–215.
 28. Diaz, L.F.; Munoz, R.; Burdel, S.; Villaverde, S. *Biodegradation* **2008**, 19, 197–208.
 29. http://www.google.gr/imgres?hl=el&client=firefox-a&hs=CTr&sa=X&rls=org.mozilla:en-US:official&biw=1366&bih=580&tbn=isch&prmd=imvnsb&tbnid=S3kOc2ryJb0LRM:&imgrefurl=http://www.webapps.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/tce/tce.html&docid=aCp7eAIFLGs8PM&imgurl=http://www.webapps.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/tce/flowcht.jpg&w=491&h=625&ei=Fa76T_hHzNLhBNWV6c8G&zoom=1&iact=hc&vpx=742&vpy=222&dur=318&hovh=167&hovw=131&tx=109&ty=210&sig=111959170033086209160&page=3&tbnh=126&tbnw=99&start=48&ndsp=25&ved=1t:429,r:10,s:48,i:254Mueller. Last access 5 June 2012.

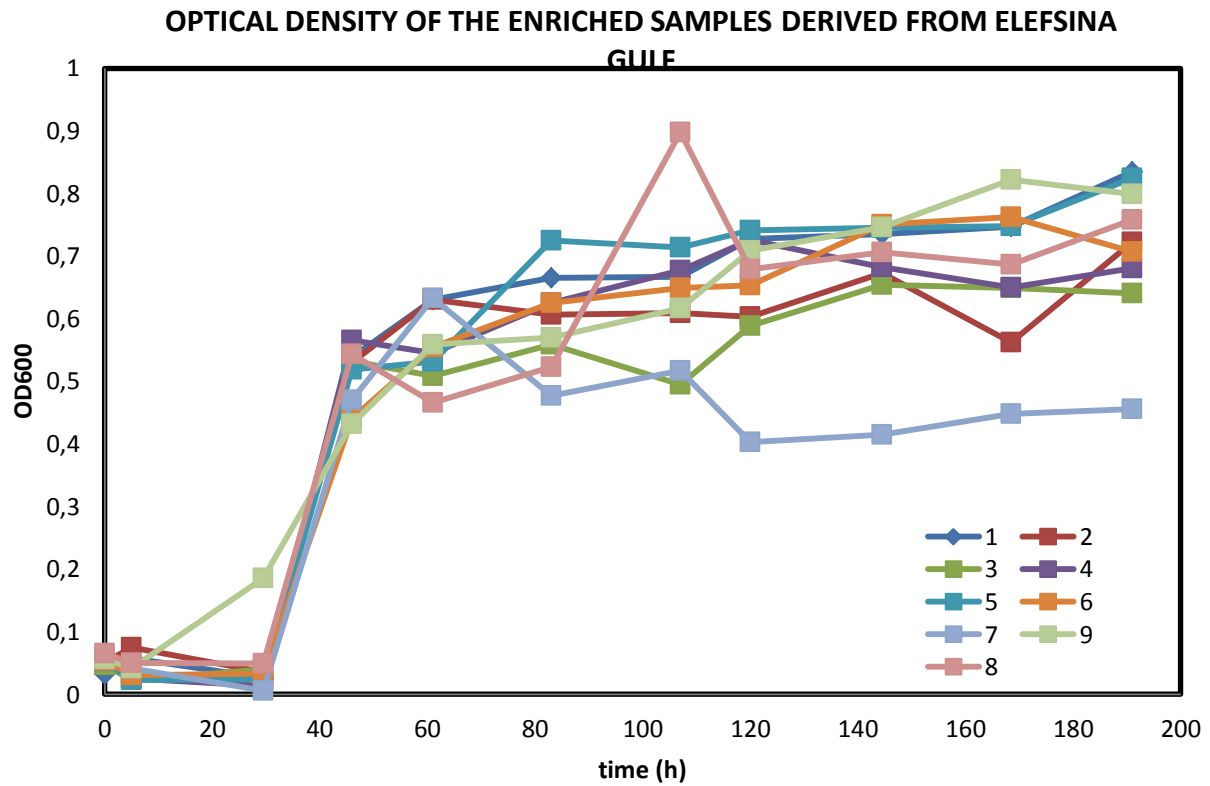
30. Diaz, E.; Ferrandez, A.; Prieto, M.A., Garcia, J.L. *Microbiol. Mol. Biol.R.* **2001**, 65, 523-569.
31. Maki, H.; Sasaki, T; Harayama, S. *Chemosphere* **2001**, 44, 1145-1151.
32. Harayama, S.; Kasai, Y; Hara, A. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, 15, 205-214.
33. Kasai, Y.; Kishira, H.; Harayama, S. *Appl. Environ. Microb.* **2002**, 68, 5625-5633.
34. Nikolopoulou, M.; Kalogerakis, N. *J. Chem. Technol. Biot.* **2009**, 84, 802-807.
35. Liu, Q.; Zhang, Y.; Zhao, D.; Zhao, C. *Adv. Mater.* **2012**, 518-523, 2073-2078.
36. Amellal, N.; Portal, J.M.; Vogel, T.; Berthelin, J. *Biodegradation* **2001**, 12, 49-57.
37. Cerniglia, C.E.; *Biodegradation* **1992**, 3, 351-368.
38. Leys, N.M.E.J.; Ryngaert, A.; Bastiaens, L.; Verstraete, W.; Top, E.M.; Springael, D. *Appl. Environ. Microb.* **2004**, 70, 1944-1955.
39. Bastiaens, L.; Springael, D.; Wattieu, P.; Harms, H.; DeWachter, R.; Verachtert, H.; Diels, L. *Appl. Environ. Microb.* **2000**, 66, 1834-1843.
40. Ruberto, L.; Vasquez, S.C.; MacCormack, W.P. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2003**, 52, 115-125.
41. Liu, S.; Suflita, J.M. *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 344-352.
42. El Fantroussi, S.; Agathos, S.N. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, 8, 268-275.
43. Romantschuk, M.; Sarand, I.; Petanen, T.; Peltola, R.; Jonnson-Vihannen, N.; Koivula, T.; Irjala, K.; Haahtela, K. *Environ. Pollut.* **2000**, 107, 179-185.
44. Nikolopoulou, M.; Kalogerakis, N. *Marine Pollut. Bull.* **2008**, 56, 1855-1861.
45. Alvarez, V.M.; Dos Santos, S.C.C.; Casella R.; Vital, R.L.; Sebastin, G.V.; Seldin. L. *J. Microbiol. Biotechn.* **2008**, 18, 1966-1974.
46. Cheng, K.Y.; Zhao, Z.Y.; Wong, J.W.C. *Environ. Technol.* **2004**, 25, 1159-1165.
47. Thomassin-Lacroix, E.; Eriksson, M.; Reimer, K.; Mohn, W. *Appl. Microbiol. Biotechn.* **2002**, 59, 551-556.
48. Pandya, M.T. *Water Sci. Techol.* **2007**, 56, 117-124.
49. Atagana, H.I. *World J. Microb. Biot.* **2004**, 20, 851-858.
50. Dibble, J.T.; Bartha R. *Soil Sci.* **1979**, 127, 365-370.
51. Leys, N.M.; Ryngaert, A.; Bastiaens, L.; Top, E.M.; Verstraete, W.; Springael, D. *Microbial Ecol.* **2005**, 49, 443-450.
52. Scow, K.M.; Hicks, K.A. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, 16, 246-253.
53. Roling, W.M.F.; Van Verseveld, H.W. *Biodegradation*, **2002**, 13, 53-64.

54. Yu, C.P.; Chu, K.H. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9611-9619.
55. Mills, M.A.; Bonner, J.C.; McDonald, T.J.; Page, C.A.; Autenrieth, R.L. *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, *46*, 887-899.
56. Balba, M.T.; Al-Awadhi, N.; Al-Daher, R. *J. Microbiol. Meth.* **1998**, *32*, 155-164.
57. Liebeg, E.W.; Cutright, T.J. *Int. Biodeter. Biodegr.* **1999**, *44*, 55-64.
58. Desai, J.D.; Banat, I.M. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **1997**, *61*, 47-64
59. Banat, I.M. *Water St.* **2000**, *8*, 177-185.
60. Mulligan, C.N. *Environ. Pollut.* **2005**, *133*, 183-198.
61. Koch, A.K.; Kappeli, O.; Fiechter, A.; Reiser, J., *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4212-4219.
62. Volkerling, F.; Breure, A.M.; Rulkens, W.H. *Biodegradation*, **1997**, *8*, 401-417.
63. Moran, A.C.; Olivera, N.; Commendatore, M.; Esteves, J.L.; Sineriz, F. *Biodegradation* **2000**, *11*, 65-71.
64. Kretschmer, A.; Bock, H.; Wagner, F. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 864-870.
65. Lang, S.; Wullbrandt, D. *Appl. Microbiol. Biotechn.* **1999**, *52*, 22-32.
66. Rosenberg, M. *Fems Microb. Lett.* **2006**, *262*, 129-134.
67. Thaniyavarn, J.; Roongsawang, N.; Kameyama, T.; Haruki, M.; Imanaka, T.; Morikawa, M.; Kanaya, S. *Biosc. Biotech. Bioch.* **2003**, *67*, 1239-1244.
68. Allen, D.K.; Tao, B.Y. *J. Surfactactants Deterg.* **1999**, *2*, 383-390.
69. Liu, Z.; Laha, S.; Luthy, R.G. *Water Sci. Techn.* **1991**, *23*, 476-486.
70. Noordman, W.H.; Janssen, D.B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4502-4508.
71. Herman, D.C.; Zhang, Y.; Miller, R.M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3622-3627.
72. Doong, R.A.; Lei, W.G. *J. Hazard. Mater.* **2003**, *96*, 15-27.
73. Bramwell, D.A.P.; Laha, S. *Biodegradation* **2000**, *11*, 263-277.
74. Mata-Sandoval, J.C.; Karns, J.; Torrents, A. *J. Chromatogr.* **1990**, *864*, 211-220.
75. Zhang, L.; Somasundaran, P.; Singh, S.K.; Felse, A.P.; Gross, R. *Colloid. Surface* **2004**, *240*, 75-82.
76. Fusetani, N. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 17-26.
77. Kelecom, A. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2002**, *74*, 151-170.
78. Olivera, N.L.; Commendatore, M.G.; Delgado, O.; Esteves, J.L. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **2003**, *30*, 542-548.
79. Floodgate, G.D. *Mar. Pollut. Bull.* **1978**, *3*, 41-43.

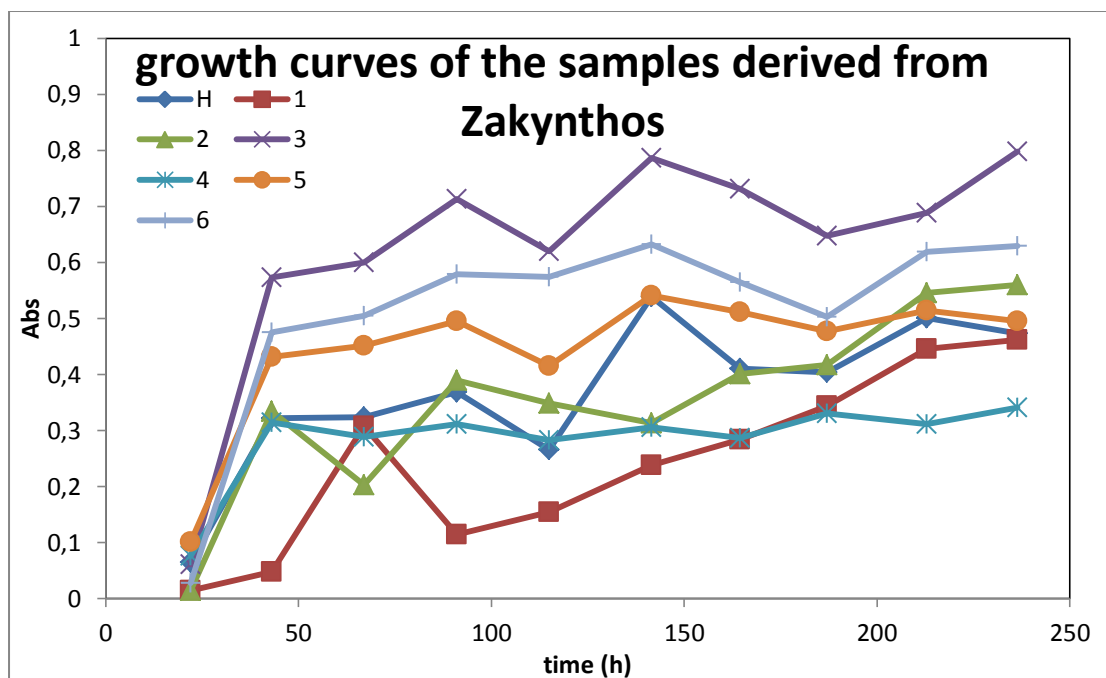
80. Abraham, W.R.; Meyer, H.; Yakimov, M. *BBA-Lipid. Lipid. Met.* **1998**, 1393, 56-62.
81. Perfumo, A.; Rancich, I.; Banat, I.M. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, 672, 135-145.
82. Maneerat, S.; and Dikit, P. *J. Sci. Techn.* **2007**, 29, 769-779.
83. http://www.engineeringtoolbox.com/oxygen-solubility-water-d_841.html. Last access 20 June.
84. Widdel, F. Theory and Measurement of Bacterial Growth, B.Sc. Thesis, Bremen, 2007.
85. Rosenberg, M.; Greenstein, R.B.N.; Barki, M.; Goldberg, S. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 408, 241-248.
86. Moore, D.; Dowhan, D. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions, Huston, 2006.
87. Higuchi, R.; Krummel, B.; Saiki, R.K. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 15, 7351-7367.
88. Jiménez, N.; Vinas, M.; Sabate, J.; Diez, S ; Bayona, J.M.; Solanas, A.M.; Albaiges, J. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 2578-2585.
89. Jiménez, N.; Vinas, M.; Bayona, J.M.; Albaiges, J.; Solanas, A.M. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 8, 2578–2585.
90. Z. Deyl, K. Macek, J. Janak. Liquid column chromatography: A survey of modern techniques and applications – Journal of Chromatography library, Vol. 3.
91. Touchstone, J.C. *J Chromatogr B*, **1995**, 169-195
92. Biscontin, G.; Pellizon Birelli, M.; Zendri, E. *J.Cult. Her.* **2002**, 3, 31-37.
93. <http://www.ethnos.gr/article.asp?catid=22768&subid=2&pubid=17191>. Last access 15 June 2012.
94. <http://gnomeskepistimi.wordpress.com/2009/04/10/%CF%84%CE%B1-%CF%80%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%B5%CE%BB%CE%B1%CE%B9%CE%B1-%CF%84%CE%B7%CF%83-%CE%B6%CE%B1%CE%BA%CF%85%CE%BD%CE%B8%CE%BF%CF%85%CE%BF%CF%83%CE%BF%CF%86%CE%B9%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%80%CE%BF>. Last access 18 June 2012.
95. Geueke, B.; Kohler, P.E. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 2010
96. Schneiker, S.; Dos Santos, V.A.P.M.; Bartels, D.; Bekel, T.; Brecht, M.; Buhrmester, J.; Chernikova, T.N.; Denaro, R. ;Ferrer, M.; Gertler, C.; Goesmann, A.; Golyshina, O.V.; Kaminski, F.; Khachane, A.N.; Lang, S.; Linke, B.; McHardy, A.C.; Meyer,

- F.; Nechitaylo, T.; Pühler, A.; Regenhardt, D.; Rupp, O.; Sabirova, J.S.; Selbitschka, W.; Yakimov, M.M.; Timmis, K.N.; Vorhölter, F.J.; Weidner, S.; Kaiser, O.; Golyshin, P.N. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 997-1004.
97. Colwell, R.R.; Walker, J.D.; Cooney, J.J. *Crit. Rev. Microbiol.* **1977**, 5, 423-445.
 98. Atlas, R.M. *Microbiol. Rev.* **1981**, 45, 180-209.
 99. Bossert, I.; Kachel, W.M.; Bartha, R. *Appl. Env. Microbiol.* **1984**, 47, 763-767.
 100. Atlas, R.M.; Bartha, R. *Env. Sci. Technol.* **1987**, 7, 538-541.
 101. Sarkhoh, N.A.; Ghannoum, M.A.; Stretton, R.J.; Radwan, S.S. *Environ. Pollut.* **1990**, 65, 1-18.
 102. Bartha, R. *Microbial Ecol.* **1986**, 12, 155-172.
 103. Cerniglia, C.E. *Adv. Appl. Microbiol.* **1984**, 30, 31-71.
 104. Das, P.; Mukherjee, S.; Sen, R. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, 104, 1675-1684.
 105. Weissenfels, W.D.; Beyer, M.; Klein, J. *Appl. Microbiol. Biotech.* **1990**, 32, 479-484.
 106. Balba, M.T.; Bewley, R.J.F. *Org. Contaminants Env.* **1991**, 237-274.
 107. Kumara, P.H.S.; Nagasawa, N.; Yagi, T.; Tamada, M. *J. Appl. Polymer Sci.* **2008**, 109, 3321-3328.
 108. Zhang, Y.; Miller, R.M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 2101-2106.
 109. Sim, L.; Ward, O.P.; Li, Z.-Y. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **1997**, 19, 232-238.
 110. Pereira, D.S.T.; Sylva, A.L.S.; Lopez, A.M.Q. *ACTA Sci. Tech.* **2010**, 32, 33-36.
 111. Najafi, A.R.; Rahimpour, M.R.; Jahanmiri, A.H.; Roostaazad, R.; Arabian, D.; Ghobadi, Z. *Chem. Eng. J.* **2010**, 163, 188-194.
 112. , Takahashi, M.; Morita, T.; Wada, K.; Hirose, N.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. *J. Oleo Sci.* **2011**, 60, 267-273.
 113. Asmer, A.J.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 65, 1460-1465.
 114. Tuleva, B.K.; Ivanov, G.R.; Christova, N.E. *J. Biosci.* **2002**, 57, 356-370.
 115. Pornsunthorntawe, O.; Wongpanit, P.; Chavadej, S.; Abe, M.; Rujiravanit, R. *Bioresource Technol.* **2008**, 99, 1589-1595.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Σχήμα 1: Οπτική πυκνότητα των δειγμάτων της Ελευσίνας.



Σχήμα 2: Οπτική πυκνότητα των δειγμάτων της Ζακύνθου.

Πίνακας 1: Οπτική απορρόφηση στα 230, 260, 280 και οι αντίστοιχοι λόγοι τους του απομονωμένου γενετικού υλικού από τα δείγματα που εμπλουτίστηκαν από τον κόλπο της Ελευσίνας (Hydrocarbon degraders).

Sample	A280	A260	A230	A260/A280	A260/A230	DNA concentration (ng/μl)
E1	0,0212	0,0387	0,0141	1,83	2,74	1354,5
E2	0,0367	0,0659	0,0268	1,80	2,46	2306,5
E3	0,0335	0,0613	0,0233	1,83	2,63	2145,5
E4	0,0473	0,0903	0,0376	1,91	2,40	3160,5
E5	0,0428	0,0803	0,0345	1,88	2,33	2810,5
E6	0,0137	0,0254	0,0077	1,85	3,30	889
E8	0,0857	0,1545	0,0708	1,80	2,18	5407,5
E9	0,0217	0,0383	0,0194	1,76	1,97	1340,5

Πίνακας 2: Οπτική απορρόφηση του απομονωμένου γενετικού υλικού στα 230, 260, 280 και οι αντίστοιχοι λόγοι τους από τα δείγματα που έχουν την ιδιότητα να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και που απομονώθηκαν από τις κοινότητες που εμπλουτίστηκαν από τον κόλπο της Ελευσίνας (Biosurfactant producers).

Sample	A280	A260	A230	A260/A280	A260/A230	DNA concentration (ng/μl)
EB1	0,3261	0,6302	0,2774	1,93	2,27	22057
EB2	0,3135	0,5984	0,2539	1,91	2,36	20944
EB3	0,1593	0,3009	0,1265	1,89	2,38	10531,5
EB4	0,1734	0,319	0,1695	1,84	1,88	11165
EB5	0,0252	0,0475	0,0254	1,88	1,87	1662,5
EB6	0,2519	0,4683	0,1889	1,86	2,48	16390,5
EB7	0,1436	0,2722	0,1215	1,90	2,24	9527
EB8	0,224	0,4319	0,1858	1,93	2,32	15116,5
EB9	0,1434	0,2774	0,1148	1,93	2,42	9709

Πίνακας 3: Οπτική απορρόφηση του απομονωμένου γενετικού υλικού στα 230, 260, 280 και οι αντίστοιχοι λόγοι τους από τα δείγματα που απομονώθηκαν από τις κοινότητες που εμπλουτίστηκαν από την Ζάκυνθο (Hydrocarbon degraders).

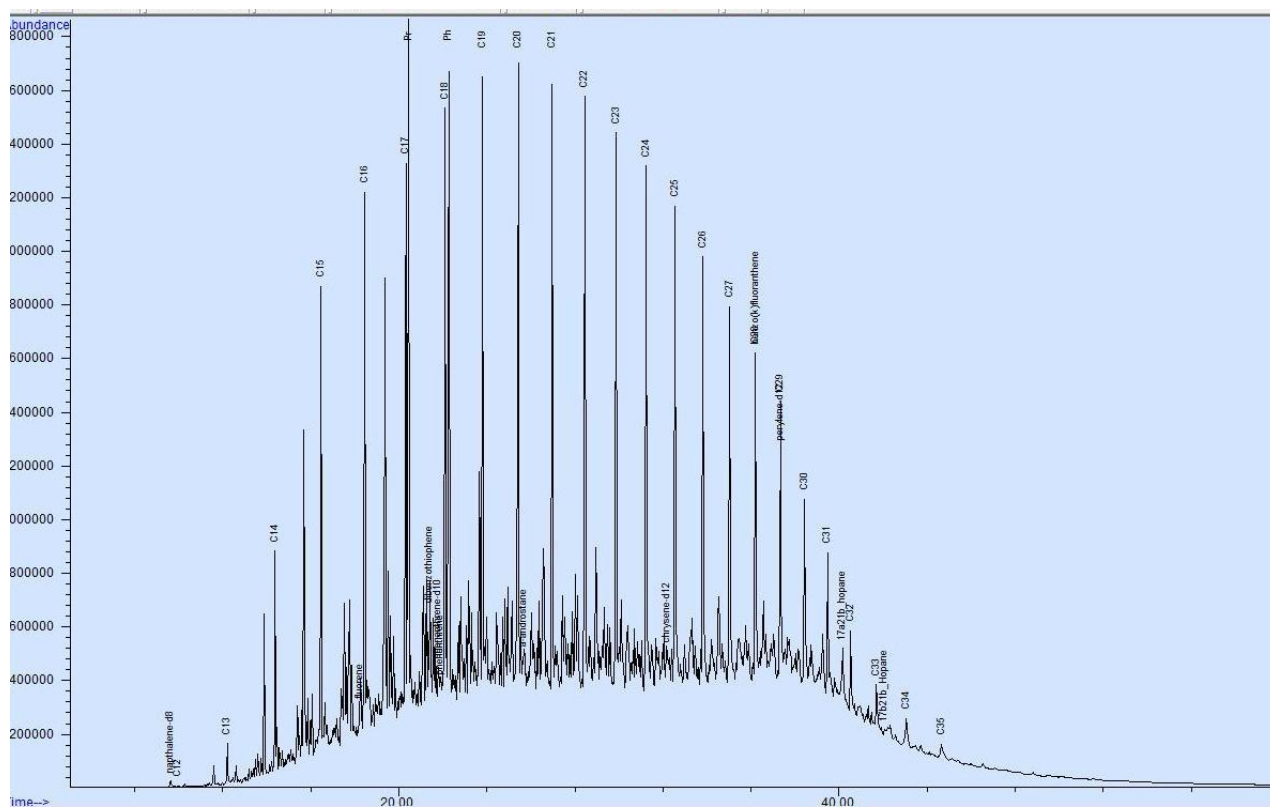
Sample	A280	A260	A230	A260/A280	A260/A230	DNA concentration	
							(ng/μl)
ZH	0,0181	0,0331	0,0233	1,83	1,42	115,85	1158,5
Z1	0,562	0,292	0,1326	0,52	2,20	1022,00	10220
Z2	0,1081	0,2103	0,0992	1,95	2,12	736,05	7360,5
Z3	0,0769	0,1472	0,0667	1,91	2,21	515,20	5152
Z4	0,1033	0,2007	0,0877	1,94	2,29	702,45	7024,5
Z5	0,1449	0,2638	0,1263	1,82	2,09	923,30	9233
Z6	0,3623	0,6659	0,2967	1,84	2,24	2330,65	23306,5

Πίνακας 4: Οπτική απορρόφηση του απομονωμένου γενετικού υλικού στα 230, 260, 280 και οι αντίστοιχοι λόγοι τους από τα δείγματα που έχουν την ιδιότητα να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και που απομονώθηκαν από τις κοινότητες που εμπλουτίστηκαν από την Ζάκυνθο (Biosurfactant producers).

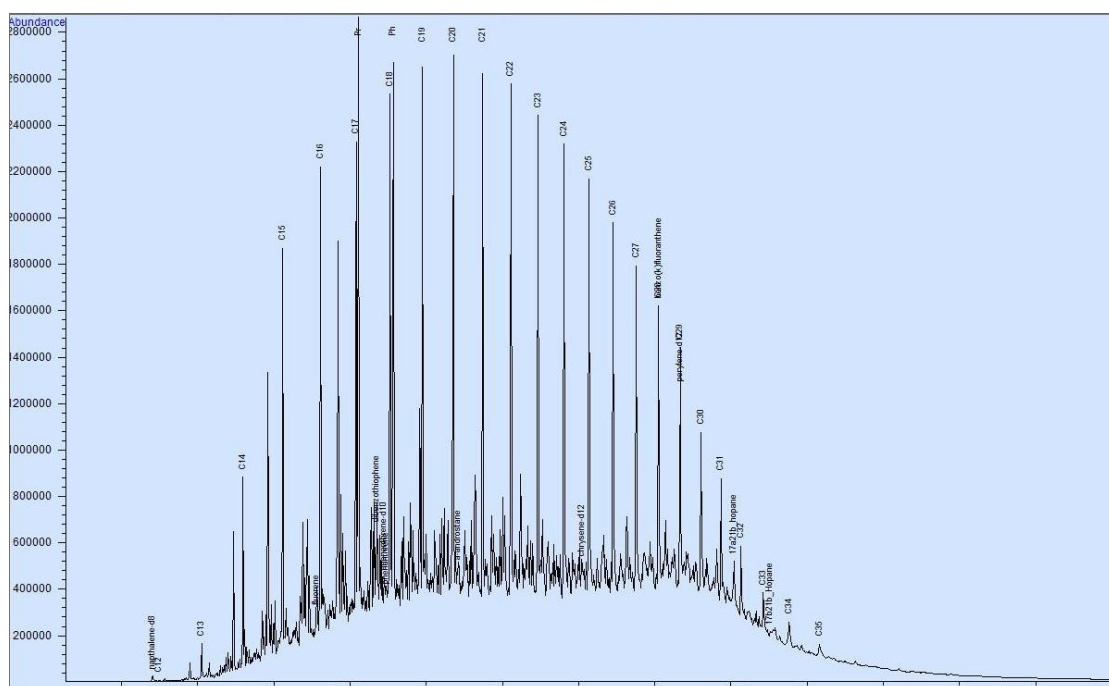
Sample	A280	A260	A230	A260/A280	A260/A230	DNA concentration	
							(ng/μl)
ZBH	0,0411	0,0778	0,0411	1,89	1,89	272,30	2723
ZB1	0,3483	0,6079	0,3519	1,75	1,73	2127,65	21276,5
ZB2	0,0347	0,0669	0,0329	1,93	2,03	234,15	2341,5
ZB3	0,2018	0,3703	0,1781	1,83	2,08	1296,05	12960,5
ZB4	0,0303	0,0539	0,0312	1,78	1,73	188,65	1886,5
ZB5	0,1535	0,2836	0,1314	1,85	2,16	992,60	9926
ZB6	0,279	0,3902	0,2051	1,40	1,90	1365,70	13657

Πίνακας 5: Μάζες των εκχυλισμάτων κατά τα πειράματα βιοαποικοδόμησης

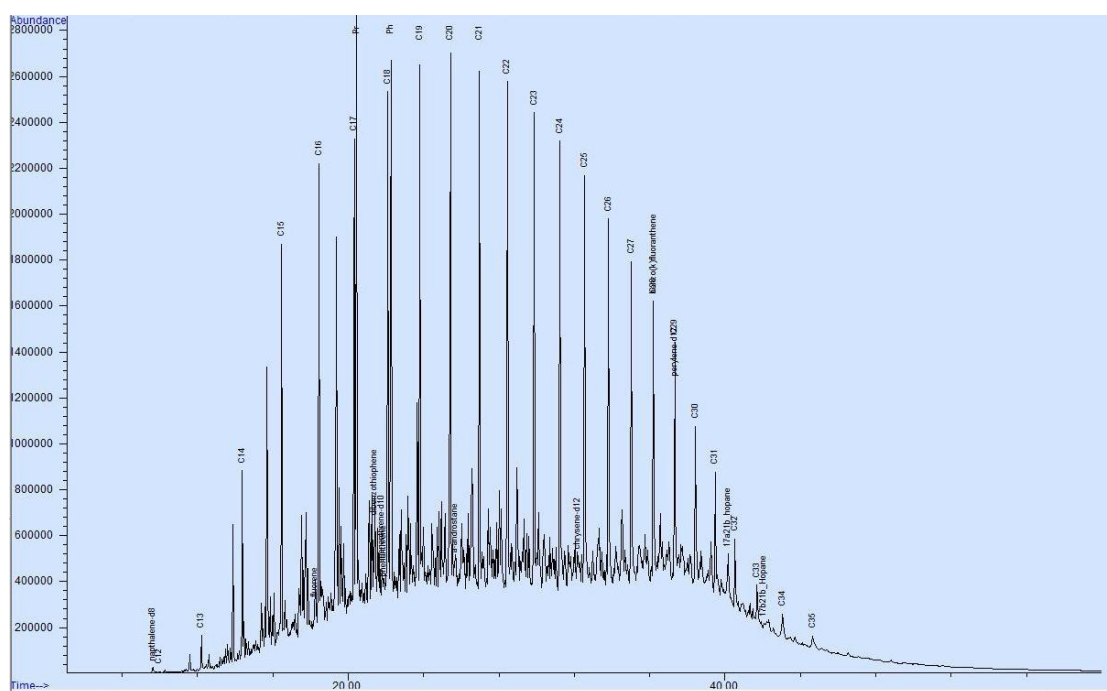
	BCC	B1C	B1CF	BCM	B1M	B1MF
Ημέρα	Μάζα εκχυλίσματος, g					
0	0,01337	0,00636	0,03716	0,03209	0,01486	0,00926
3	0,00446	0,00855	0,00847	0,01699	0,00842	0,01651
6	-	0,01802	0,02034	-	0,02707	0,00717
10	0,02618	0,04555	0,0067	-	0,02289	0,01132



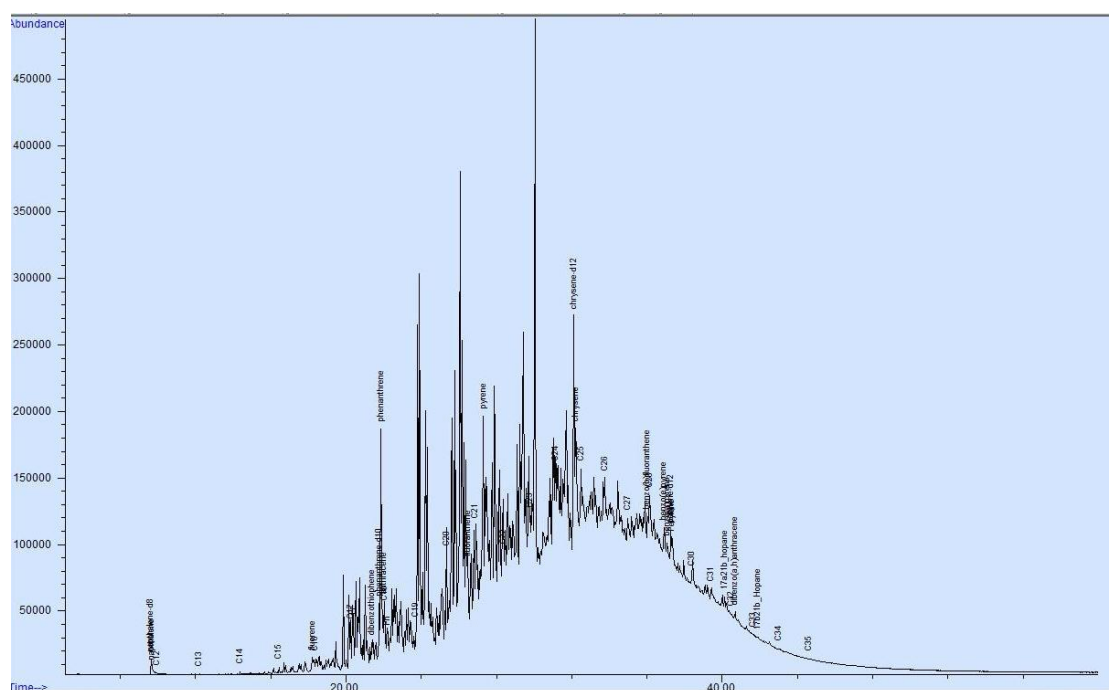
Σχήμα 3:Χρωματογράφημα πειράματος με αργό πετρέλαιο-Κλάσμα Ι, αλκάνια



Σχήμα 4: Χρωματογράφημα πειράματος με αργό πετρέλαιο-Κλάσμα II, αρωματικά



Σχήμα 5: Χρωματογράφημα πειράματος με μαζούτ-Κλάσμα I, αλκάνια



Σχήμα 6: Χρωματογράφημα πειράματος με μαζούτ-Κλάσμα II, αρωματικά
