

`ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΧΗΜΙΚΩΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΣΥΝΤΑΞΗ: Εμμανουήλ Γ. Δάβρης

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Καλογεράκης

ΧΑΝΙΑ 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Βελτιστοποίηση παραγωγής επιφανειακά δραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης» εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Βιομηχανικής μηχανικής και χημικών τεχνολογιών», του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο και του οποίου η καθοδήγηση υπήρξε πολύτιμη για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Μιχαήλ Λαζαρίδη και την επίκουρη καθηγήτρια κ. Δανάη Βενιέρη για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Δρ. Ελευθερία Αντωνίου για την πολύ σημαντική καθοδήγηση της, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής. Πολύ σημαντική ήταν και η βοήθεια της Δρ Μαρία Νικολοπούλου καθώς και της υποψήφιας διδάκτωρ Εμμανουέλλα Κορκακάκη κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και τις ευχαριστώ θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου για την άψογη συνύπαρξη και συνεργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η παραγωγή και η απομόνωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε καλλιέργειές με πηγή άνθρακα πετρέλαιο-μελάσα, με ή χωρίς θρεπτικά και προσθήκη θαλάσσιων μικροοργανισμών, απομονωμένων από ρυπασμένο με πετρελαιοειδή θαλασσινό νερό.

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 τον ρυθμό της βιοαποικοδόμησης

Η βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση κατάλληλων θρεπτικών υλικών (πηγές αζώτου και φωσφόρου) και μικροβιακής κοινότητας που στόχο έχουν την βιοδιέγερση και τη βιοενίσχυση αντίστοιχα, των αυτοχθόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στην διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου.

Η παραγωγή τριών διαφορετικών τύπων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, τα ραμνολιπίδια, τα σοφορολιπίδια και τα τρεχαλολιπιδίων, μελετήθηκε μέσω πειράματος διάρκειας 30 ημερών, με προσθήκη θρεπτικών αζώτου και φωσφόρου σε διάφορες ποσότητες και με πηγή άνθρακα μελάσα-πετρέλαιο.

Παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας με την προσθήκη αζώτου φωσφόρου χωρίς αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων, η οποία παραμένει σταθερή. Οι μικροοργανισμοί καθώς καταναλώνουν υδρογονάθρακες, οι οποίοι είναι διαλυτοποιημένοι με τη χρήση των λιπιδίων, καταναλίσκουν και τα προσκολλημένα λιπίδια. Άρα, ενώ η συγκέντρωση τους μέσα στη καλλιέργεια παραμένει σταθερή, στην πραγματικότητα, η παράγωγη λιπιδίων είναι αυξημένη, και ανάλογη με τον ρυθμό αύξησης της βιομάζας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: 1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1
1.1 ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ- ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ 1
1.2 ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ 4
1.3 ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ 6
1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ 7
1.4.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 8
1.4.2 ΜΗ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 8
1.4.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: 12
ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ . 12
2.1 Η ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ (BIOREMEDIATION) 12
2.2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ 14
2.2.1 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ 15
2.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟ-ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ 17
2.2.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΑΠΟΔΟΜΗΤΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΘΡΑΚΕΣ 19
2.2.4 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ 20
2.2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ & ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ 24
2.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 26
2.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ 31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: 37
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 37
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 37
3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ-ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ 38

3.2.1 ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ - ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ 38
3.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ-ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ (MATH test) 38
3.2.3 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ 40
3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ 40
3.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 42
3.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ 42
3.4.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ 43
3.4.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ 43
3.4.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ TLC 44
3.4.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ. 46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: 49
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 49
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 49
4.1.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ 49
4.1.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ 50
4.1.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ 51
4.1.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΩΝ 52
4.1.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΕΧΟΛΙΠΙΔΙΩΝ 53
4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ- ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ

Οι επιστήμες του Περιβάλλοντος είναι ένα πολυκλαδικό πεδίο. Ασχολούνται με τις επιδράσεις της ανθρώπινης δραστηριότητας στο περιβάλλον καθώς και με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Η ρύπανση του περιβάλλοντος οφείλεται τόσο σε φυσικές διεργασίες (π.χ. ηφαίστεια, πυρκαγιές, βιολογικές δραστηριότητες) όσο και σε ανθρωπογενείς παράγοντες. Όσον αφορά τις φυσικές πηγές ρύπανσης η φύση έχει αναπτύξει μηχανισμούς ανακύκλωσης, αναπαραγωγής και αυτοκαθαρισμού. Αντιθέτως, η ρύπανση που προκαλείται από ανθρωπογενείς πηγές προκαλεί μη αντιστρεπτές μεταβολές στο περιβάλλον. Ο θαλάσσιος χώρος είναι στόχος άμεσης ανάπτυξης των ανθρώπινων δραστηριοτήτων αλλά και βασικός αποδέκτης των συνεπειών τους.

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 εδάφους 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 4.2kJ/kg^{o}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 σφαιρική 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 διάσταση 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.

Πίνακας 1: Κυριότερες Αιτίες Ρύπανσης [4].

	ΑΙΤΙΕΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ	**ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΚΥΡΙΩΣ**
1	Μεταφορά επικίνδυνων φορτίων	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες Περιοχές
2	Υποθαλάσσιες πυρηνικές δοκιμές και εναπόθεση ραδιενεργών καταλοίπων	Ανοικτή θάλασσα
3	Διακίνηση πετρελαιοειδών	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες Περιοχές
4	Καθαρισμός πετρελαιοκηλίδων	Ανοικτή θάλασσα και Παράκτιες Περιοχές
5	Τουριστική και εμπορική δραστηριότητα	Παράκτιες περιοχές
6	Εκβολή δικτύων αποχέτευσης και βιομηχανικών αποβλήτων	Παράκτιες περιοχές
7	Κατάληψη σημαντικών θαλασσίων εκτάσεων για άλλες δραστηριότητες	Παράκτιες περιοχές
8	Απόρριψη στερεών απορριμμάτων-καταλοίπων από βιομηχανική και κατασκευαστική δραστηριότητα	Παράκτιες περιοχές
9	Κατασκευαστική δραστηριότητα στη θάλασσα(tunnels, γέφυρες)	Ανοικτή θάλασσα, Παράκτιες Περιοχές
10	Ιχθυοκαλλιέργειες-Υπερβολική αλιεία	Παράκτιες περιοχές
11	Θερμική μόλυνση	Ανοικτή θάλασσα, Παράκτιες περιοχές
12	Εκμετάλλευση φυσικών πόρων (π.χ. άντληση πετρελαίου)	Ανοικτή θάλασσα
13	Από την ατμόσφαιρα-από φυσικά αίτια (π.χ.σεισμοί)	Ανοικτή θάλασσα

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.

1.2 ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ

Η σύγχρονη κοινωνία συνεχίζει να στηρίζεται στη χρήση των υδρογονανθράκων πετρελαίου για τις ενεργειακές ανάγκες της. 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 [4]. Στην Εικόνα φαίνονται οι επιπτώσεις στο περιβάλλον από ατυχήματα πετρελαιοφόρου.

Παρά τις πρόσφατες τεχνολογικές προόδους, τα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες του αργού πετρελαίου και των ραφιναρισμένων προϊόντων του εμφανίζονται σε συχνή βάση. Στον Πίνακα 2 καταγράφονται το πλήθος πετρελαιοκηλίδων. Υπολογίζεται ότι μεταξύ 1,7 και 8,8 εκατομμυρίων μετρικών τόνων του πετρελαίου απελευθερώνεται στο υδάτινο περιβάλλον κάθε έτος, εκ των οποίων περισσότερο από 90% συσχετίζεται άμεσα με τις ανθρώπινες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένης της σκόπιμης διάθεσης αποβλήτων. Αντίθετα με την κοινή αντίληψη, μόνο το 12% του πετρελαίου που απελευθερώνεται στο υδρόβιο περιβάλλον είναι από τα ατυχήματα δεξαμενόπλοιων.



Εικόνα 1: Ατύχημα πετρελαιοφόρου.

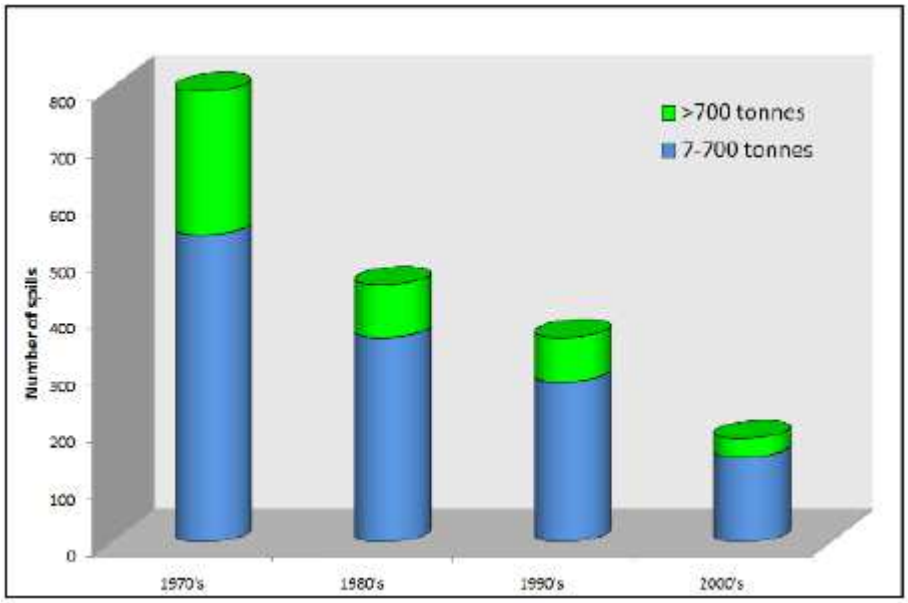
Κατ' εκτίμηση 10^9 τόνοι, το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής πετρελαίου που φορτώνεται ετησίως σε δεξαμενόπλοια, μεταφέρεται μέσω της Μεσογείου. Από αυτούς, κατ' εκτίμηση 33×10^4 τόνοι αποβάλλονται σκόπιμα σε αυτή την κλειστή θάλασσα, ενώ τα ατυχήματα αποτελούν μια πρόσθετη πηγή ρύπανσης 1×10^4 τόνων ετησίως. Οι προκύπτουσες κηλίδες πετρελαίου ξεβράζονται στην ξηρά από τους ανέμους επάνω στις πυκνά κατοικημένες μεσογειακές ακτές. Παρά την υψηλή ευαισθησία της Μεσογείου στα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες οι προσπάθειες αντιμετώπισης αυτών των διαρροών πετρελαίου σε αυτήν την ευαίσθητη περιοχή είναι λιγοστές.

Πίνακας 2: Αριθμός Περιστατικών.

ΑΙΤΙΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ			ΣΥΝΟΛΟ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ
	<7 tons	7-700tons	>700 tons	
OPERATION				
Loading/ Discharging	2763	297	17	**3077**
Bunkering	541	25	0	**566**
Other operation	1165	47	0	**1212**
ACCIDENTS				
Collision	159	246	86	**491**
Grounding	221	196	106	**523**
Structural Failure	561	77	43	**681**
Fire / Explosion	149	16	19	**184**
OTHER /UNKNOWN	2217	163	35	**2415**
ΣΥΝΟΛΟ	**7776**	**1067**	**306**	**9149**

Είναι αξιοσημείωτο ότι μερικά πολύ μεγάλα ατυχήματα με πετρελαιοκηλίδες είναι υπεύθυνα για το υψηλό ποσοστό πετρελαίου που διαρρέει στο θαλάσσιο

περιβάλλον. Παραδείγματος χάριν, κατά τη δεκαετή περίοδο 1990-1999 υπήρξαν 358 πετρελαιοκηλίδες πάνω από 7 τόνους, που συμπληρώνουν συνολικά 1140 χιλιάδες τόνους, αλλά οι 830 χιλιάδες τόνοι (73%) χύθηκαν σε μόλις 10 ατυχήματα (μόλις κάτω του 3%) αναλυτικά αναφέρονται περιστατικά στον Πίνακα 2. Οι αριθμοί για ένα συγκεκριμένο έτος μπορούν επομένως να διαστρεβλωθούν σοβαρά από ένα μεμονωμένο μεγάλο ατύχημα. Αυτό διακρίνεται σαφώς το 1979 (Atlantic Empress - 287.000 τόνοι), το 1983 (Castillo de Bellver - 252.000 τόνοι) και το 1991 (ABT Summer - 260.000 τόνοι). Στο Διάγραμμα 1 γίνεται η παρουσίαση των ποσοτήτων πετρελαίου που εισήλθαν στο θαλάσσιο χώρο.

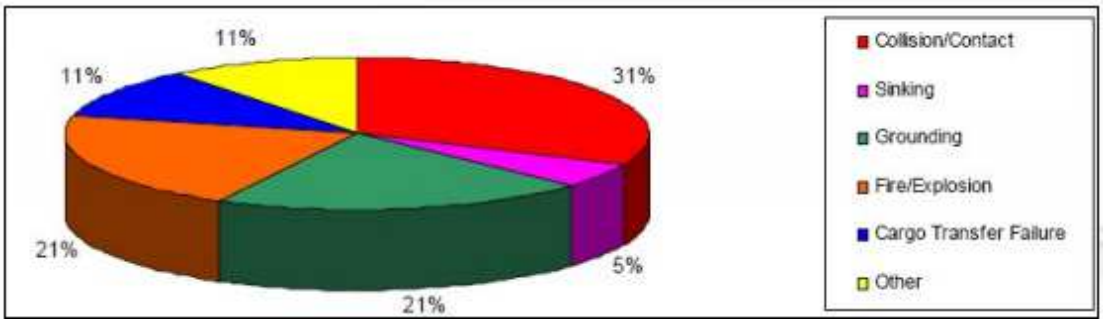


Διάγραμμα 1:Ποσότητα πετρελαίου που εισήλθε στο θαλάσσιο περιβάλλον τα τελευταία 40 χρόνια.

1.3 ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ

Οι θαλάσσιες πετρελαιοκηλίδες, ιδιαίτερα τα ατυχήματα μεγάλης κλίμακας, έχουν θέσει σε μεγάλο κίνδυνο και έχουν προκαλέσει εκτενή ζημία στα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα. Παραδείγματος χάριν, η πετρελαιοκηλίδα 37.000 τόνων αργού πετρελαίου North Slope στον Prince William Sound, τις Αλάσκας, από το *Exxon Valdez* το 1989 που οδήγησε στη θνησιμότητα χιλιάδων θαλασσοπουλιών και

θαλάσσιών θηλαστικών, σε σημαντική μείωση του πληθυσμού πολλών οργανισμών και στις μακροπρόθεσμες περιβαλλοντικές επιδράσεις Διάγραμμα 2 [5].



Διάγραμμα 2: Αιτίες πρόκλησης πετρελαιοκηλίδων από πλοία.

Αυτά τα καταστροφικά ατυχήματα, ειδικά η πετρελαιοκηλίδα του *Exxon Valdez*, έχουν αυξήσει τη δημόσια ευαισθητοποίηση για τους κινδύνους που περιλαμβάνονται κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά του πετρελαίου και των προϊόντων πετρελαίου και έχουν οδηγήσει σε πιο αυστηρούς κανονισμούς. Εντούτοις, επειδή το πετρέλαιο χρησιμοποιείται ευρέως, παρά τις προφυλάξεις, είναι σχεδόν σίγουρο ότι πετρελαιοκηλίδες και διαρροές θα συνεχίσουν να εμφανίζονται. Κατά συνέπεια, είναι ουσιαστικό να υπάρχουν τα αποτελεσματικά αντίμετρα για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ

Οι στρατηγικές για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων επηρεάζονται πολύ από ποικίλους παράγοντες, όπως ο τύπος του πετρελαίου, τα χαρακτηριστικά της πληγείσας περιοχής και περιστασιακά από τις πολιτικές εκτιμήσεις. Διάφορες προσεγγίσεις και τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αναθεωρηθεί και έχουν περιγραφεί εκτενώς σε διάφορα τεχνικά έγγραφα, όπως: *Shoreline Countermeasure Manual* [6],

Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response [7], *Understanding Oil Spills and Oil Spill Response* [8], and *Oil Spill Response in the Marine Environment* [9].

1.4.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η φυσική βιοεξυγίανση (natural attenuation) ή η φυσική αποκατάσταση είναι βασικά η επιλογή όπου δεν λαμβάνεται κάποιο μέτρο έτσι το πετρέλαιο αφήνεται να απομακρυνθεί ή να αποικοδομηθεί με φυσικά μέσα. Για μερικές πετρελαιοκηλίδες, είναι πιθανότατα πιο αποδοτικό οικονομικά και οικολογικά υγιές να αφεθεί η ρυπασμένη με πετρέλαιο περιοχή να ανακτηθεί φυσικά από το να γίνει επέμβαση σε αυτήν. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι οι πετρελαιοκηλίδες σε μακρινές ή απρόσιτες τοποθεσίες όταν τα φυσικά ποσοστά απομάκρυνσης είναι γρήγορα, ή πετρελαιοκηλίδες σε ευαίσθητες περιοχές όπου οι ενέργειες καθαρισμού (cleanup actions) μπορούν να προκαλέσουν περισσότερη ζημιά από καλό. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι όταν χρησιμοποιείται φυσική βιοεξυγίανση ως μέθοδος καθαρισμού, απαιτείται ένα πρόγραμμα παρακολούθησης για να αξιολογηθεί η απόδοση της.

1.4.2 ΜΗ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μη χημικές μέθοδοι συγκράτησης και αποκατάστασης του μαζικού ή ελεύθερου πετρελαίου είναι η πρωταρχική επιλογή αντιμετώπισης στις Ηνωμένες Πολιτείες για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Οι συνήθεις χρησιμοποιημένες μη χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν:

- **ΦΡΑΓΜΑΤΑ**: Τα φράγματα είναι συσκευές που έχουν κατασκευαστεί για να συγκρατηθεί και να ελεγχθεί η μετακίνηση του επιπλέοντος πετρελαίου και χρήση των εξαφριστών για να ανακτηθεί. Τα φράγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλωβισμό, τη συγκέντρωση και την κατεύθυνση των κηλίδων πετρελαίου. Η περιβαλλοντική επίδραση αυτής της μεθόδου είναι ελάχιστη εάν ελέγχεται η κυκλοφορία του εργατικού δυναμικού καθαρισμού. Βλέπε Εικόνα 1.

- **ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΣΥΛΛΕΚΤΕΣ**: Οι πετρελαιοσυλλέκτες είναι κάθε μηχανική συσκευή που έχει ειδικά κατασκευαστεί για να συλλέγει το πετρέλαιο (ή το μίγμα νερού/πετρελαίου) από την επιφάνεια της θάλασσας, χωρίς να αλλάξουν

τα φυσικά ή και τα χημικά χαρακτηριστικά του. Οι αρχές λειτουργίας των συσκευών περισυλλογής παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία. Σύμφωνα με την αρχή που χρησιμοποιείται για την περισυλλογή του πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας προσφέρει δυνατότητα διάκρισης.



Εικόνα 1: Χρήση φράγματος σε πετρελαιοκηλίδα.

- **ΣΚΑΦΗ ΠΕΡΙΣΥΛΛΟΓΗΣ (Skimmer Vessels)** :Είναι σκάφη ειδικού τύπου που έχουν προσαρμοσμένη με σχεδίαση κάποιο τύπο συσκευής περισυλλογής και χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του επιφανειακού στρώματος του ρύπου από τη θάλασσα.

- **ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΥΛΙΚΟ ΑΠΟΡΡΟΦΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**: Χρήση υδροφοβικών υλικών για την απομάκρυνση του πετρελαίου επάνω από τη μολυσμένη επιφάνεια. Αν και η διάθεση των ρυπασμένων απορριμμάτων είναι ένα ζήτημα, η περιβαλλοντική επίπτωση αυτής της μεθόδου είναι επίσης περιορισμένη εάν η κυκλοφορία των πληρωμάτων καθαρισμού και η παραγωγή αποβλήτων ελέγχεται.

- **ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ**: Συλλογή και απομάκρυνση των ρυπασμένων επιφανειών με πετρέλαιο, των ιζημάτων χρησιμοποιώντας μηχανικό εξοπλισμό. Αυτή η μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν μικρά ποσά υλικών με πετρέλαιο. Δεν πρέπει να ληφθεί υπόψη στον καθαρισμό των ευαίσθητων βιότοπων ή όπου η διάβρωση είναι ζήτημα.

- **ΠΛΥΣΗ**: Έκπλυση του πετρελαίου που εμμένει κατά μήκος των ακτών στο νερό για συλλογή. Οι στρατηγικές έκπλυσης κυμαίνονται από χαμηλής πιέσεως έκπλυση με κρύο νερό μέχρι έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Αυτή η μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται ειδικά με υψηλή πίεση ή καυτό νερό, πρέπει να αποφεύγεται σε υγρότοπους ή άλλους ευαίσθητους βιότοπους.

- **ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΚΑΘΙΣΗ ΙΖΗΜΑΤΟΣ**: Μετακίνηση του ρυπασμένου με πετρέλαιο ιζήματος από το ένα τμήμα της παραλίας σε άλλο ή με επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling) και αναμιξη του ρυπασμένου ιζήματος για να ενισχυθεί ο φυσικός καθαρισμός μέσω της διασποράς του πετρελαίου στην υδάτινη στήλη και την προώθηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πετρελαίου και των ανόργανων σωματιδίων. Η επιφανειακή κατεργασία του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διείσδυση του πετρελαίου βαθιά στα ιζήματα των ακτών. Οι πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις από την απελευθέρωση του πετρελαίου και τα ρυπασμένα ιζήματα στα παρακείμενα υδάτινα στρώματα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη.

- **ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ ΚΑΨΙΜΟ:** Το πετρέλαιο στην ακτή καίγεται συνήθως όταν βρίσκεται πάνω σε καύσιμο υπόστρωμα όπως η βλάστηση, τα κούτσουρα και άλλα συντρίμμια. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προκαλέσει σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή των φυτών και των ζώων.

1.4.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι χημικές μέθοδοι, ιδιαίτερα οι χημικές ενώσεις διασποράς (dispersants), έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως σε πολλές χώρες ως επιλογή αντιμετώπισης. Για μερικές χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, όπου οι δύσκολες παράκτιες συνθήκες μπορούν να καταστήσουν τη μηχανική αντιμετώπιση προβληματική, οι χημικές ενώσεις διασποράς είναι η αρχική επιλογή. Εντούτοις, οι χημικές μέθοδοι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω της διαφωνίας σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και της ανησυχίας περί τοξικότητας και μακροπρόθεσμων περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους [8]. Σημαντικοί υπάρχοντες χημικοί παράγοντες είναι:

- **ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**: Παράγοντες διασποράς (dispersing agents), που περιέχουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες, χρησιμοποιούνται για να αφαιρέσουν το επιπλέον πετρέλαιο από την υδάτινη επιφάνεια για να το διασκορπίσουν στην υδάτινη στήλη προτού το πετρέλαιο φθάσει και μολύνει την ακτή. Αυτό η πρακτική χρησιμοποιείται για να μειωθούν οι τοξικές επιδράσεις του πετρελαίου με τη διάλυση του σε κατώτατες συγκεντρώσεις και να επιταχυνθεί ο ρυθμός βιοδιάσπασης του με την αύξηση της αποτελεσματικής περιοχής επιφάνειάς του.

- **ΑΠΟΓΑΛΟΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ**: Χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τα πετρέλαιο σε νερό (oil-in-water) γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά.

- **ΣΤΕΡΕΟΠΟΙΗΤΕΣ**: Οι χημικές ουσίες που ενισχύουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν το πετρέλαιο, για να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση και για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των φυσικών διεργασιών αποκατάστασης.

- **SURFACE FILM CHEMICALS**: Οι film-forming agents μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποτρέψουν το πετρέλαιο από το να προσκολληθεί στα υποστρώματα των ακτών και για να ενισχύσουν την αφαίρεση του πετρελαίου που εμμένει στις επιφάνειες με διαδικασίες έκπλυσης με πίεση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΚΗΛΙΔΩΝ

2.1 Η ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ (BIOREMEDIATION)

Αν και οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η φυσική απομάκρυνση (physical removal), είναι ο πρώτος τρόπος αντιμετώπισης, σπάνια επιτυγχάνουν τον πλήρη καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων. Σύμφωνα με το Office of Technology Assessment [10], οι τρέχουσες μηχανικές μέθοδοι ανακτούν χαρακτηριστικά λιγότερο από 10-15 τοις εκατό του πετρελαίου μετά από μία μεγάλης έκτασης πετρελαιοκηλίδα.

Η βιοεξυγίανση έχει προκύψει ως μια από τις πιο ελπιδοφόρες δευτεροβάθμιες επιλογές επεξεργασίας (secondary treatment options) για την απομάκρυνση πετρελαίου μετά από την επιτυχή εφαρμογή της στο ατύχημα του *Exxon Valdez* του 1989 [11]. Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως "η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης" [12].

Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι εύκολα βιοδιασπάσιμο στη φύση [13], [14]. Η επιτυχία της βιοεξυγίανσης των πετρελαιοκηλίδων εξαρτάται από τη δυνατότητά να καθιερωθούν και να διατηρηθούν οι συνθήκες που ευνοούν τους ρυθμούς ενισχυμένης βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο ρυπασμένο περιβάλλον. Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων:

I. ***Βιοενίσχυση (bioaugmentation)***, στην οποία γνωστά βακτήρια που αποικοδομούν το πετρέλαιο προστίθενται για να συμπληρώσουν τον υπάρχοντα μικροβιακό πληθυσμό

II. ***Βιοδιέγερση (biostimulation)***, στην οποία η αύξηση των γηγενών μικροβιακών αποδομητών πετρελαίου υποκινείται με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών ανθρακάς (C) άζωτο (N) και φώσφορος (P) ή άλλων περιοριστικών υποστρωμάτων, ή/και από τις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. έκπλυση από τα κύματα (surf-washing), προσθήκη οξυγόνου από την ανάπτυξη των φυτών).

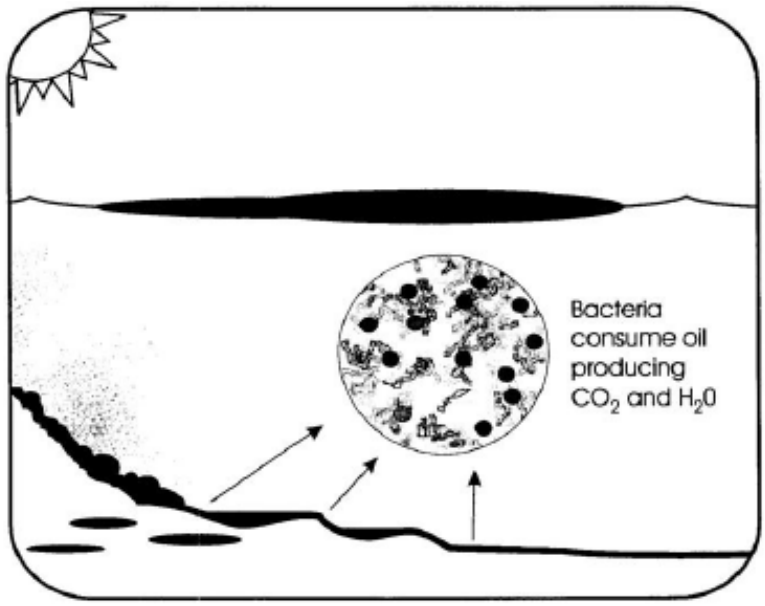
Τόσο οι εργαστηριακές μελέτες όσο και οι μελέτες πεδίου έχουν δείξει ότι η βιοεξυγίανση, και η βιοδιέγερση ειδικότερα, μπορεί να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στις ρυπασμένες ακτές [15]. Οι πρόσφατες μελέτες στο πεδίο επίσης έχουν καταδείξει ότι η βιοδιέγερση είναι αποτελεσματικότερη προσέγγιση επειδή η προσθήκη μικροοργανισμών που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες δεν θα ενισχύσει την διάσπαση πετρελαίου περισσότερο από την απλή προσθήκη θρεπτικών [16],[17].

Αυτήν την περίοδο, μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην εφαρμογή της βιοεξυγίανσης πετρελαίου είναι η έλλειψη οδηγιών σχετικά με το πότε και πώς να χρησιμοποιηθεί αυτή η τεχνολογία. Αν και έχει πραγματοποιηθεί εκτενής έρευνα για τη βιοεξυγίανση πετρελαίου κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι περισσότερες υπάρχουσες μελέτες έχουν επικεντρωθεί είτε στην αξιολόγηση της δυνατότητας πραγματοποίησης της βιοεξυγίανσης για την αντιμετώπιση της ρύπανσης πετρελαίου, είτε στη δοκιμή προϊόντων και μεθόδων.

Έχει πραγματοποιηθεί περιορισμένος αριθμός δοκιμών πιλοτικής κλίμακας και δοκιμών πεδίου, που μπορούν να παρέχουν πιο πειστικές επιδείξεις αυτής της τεχνολογίας. Πολλές δοκιμές πεδίου δεν έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα, δεν έχουν ελεγχθεί καλά ή δεν έχουν αναλυθεί σωστά, οδηγώντας σε σκεπτικισμό και σύγχυση την κοινότητα χρηστών. Υπάρχει άμεση ανάγκη για ένα λεπτομερές και εφαρμόσιμο σύνολο οδηγιών για την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας από τους αποκριτές των πετρελαιοκηλίδων που να απαντά στις ερωτήσεις όπως πότε να χρησιμοποιηθεί η βιοεξυγίανση, ποιοι παραγόντες βιοεξυγίανσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν, πώς να τους εφαρμόσουν και πώς να ελέγξουν και να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα.

2.2 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.



Εικόνα 2: Διεργασία της αποδόμησης.

Στη θάλασσα, για την καταπολέμηση πετρελαιοκηλίδων, η χρησιμότητα της μεθόδου εξακολουθεί να μην είναι καθορισμένη. Η διεργασία της αποδόμησης φαίνεται στην Εικόνα 2. 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 [18].

2.2.1 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 [19],[20],[21]. Διακρίνεται σε:

- Αρχική (primary): Κάθε βιολογικά 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 [21].

Οι αντιδράσεις που συμμετέχουν στη βιοαποδόμηση μπορούν να χαρακτηριστούν ως αντιδράσεις οξειδωτικές, αναγωγικές, υδρολυτικές, ή συζευτικές [21]. Η βιοαποδόμηση των περισσοτέρων 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.

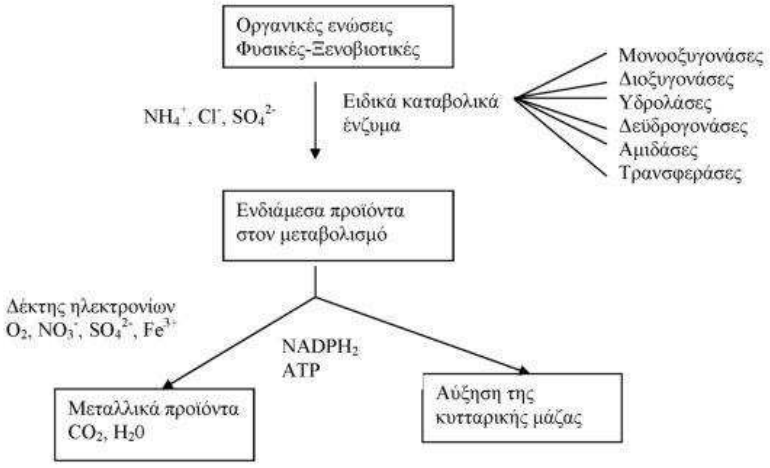
Η μικροβιακή αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον. Το είδος των ουσιών ποικίλει από υδρογονάνθρακες, πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs), πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) [22].

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 [23].

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



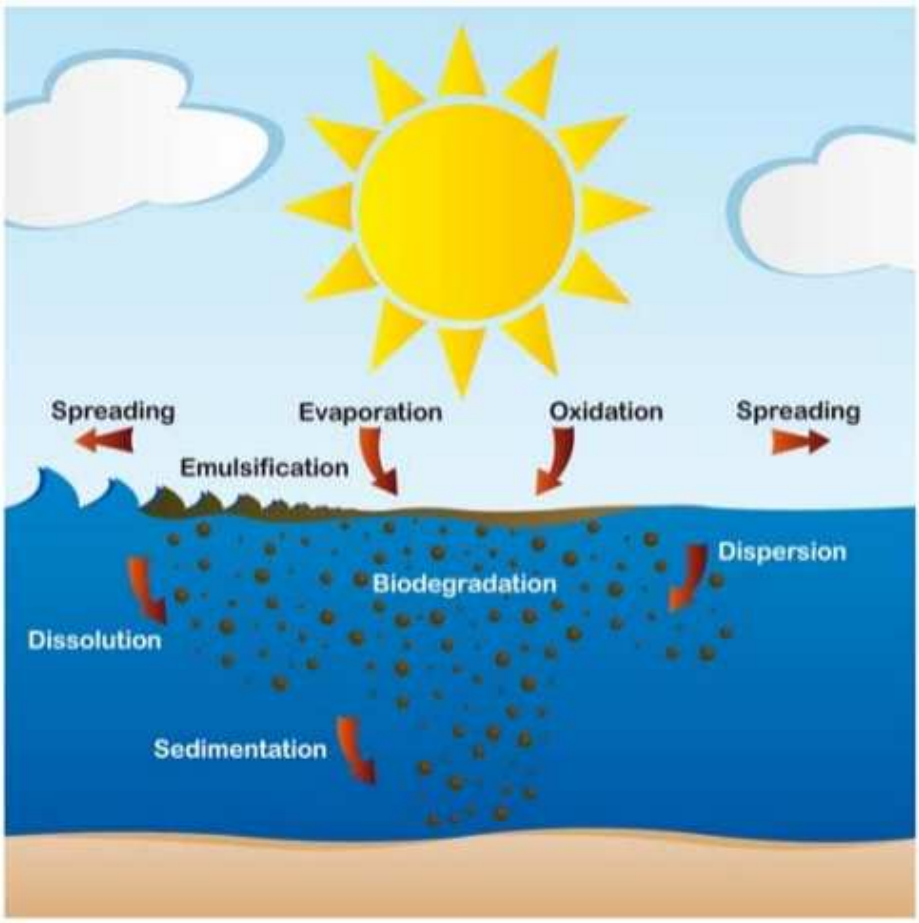
Σχήμα 1: Αρχή της αποδόμησης.

Ακόμα, σημαντικό ρόλο κατά την αποδόμηση διάφορων ρυπογόνων ενώσεων παίζει ο συμμεταβολισμός (coo metabolism), 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 [24].

Βιομετατροπή (bioconversion) 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) [25].

Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μικροοργασνισμών, 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.



Εικόνα 3: Φυσικοχημικές μεταβολές πετρελαιοειδών.

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 Εικόνα 3. Κατά την διάρκεια των τελευταίων χρόνων έχουν αναγνωριστεί είδη θαλάσσιων βακτηρίων, ειδικευόμενα στη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων [26],[27].

2.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟ-ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Η αποδόμηση μίας ένωσης εξαρτάται τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες [28]. 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 δραστικότητα [29], [30].

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 CO_2 και αφετέρου να μπορούν να εκφράσουν τα κατάλληλα ένζυμα [31], [32]. Ο μικροβιακός πληθυσμός επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον ρυπαντή.

Η αποδόμηση λαμβάνει χώρα σε ευνοϊκές συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αερισμού [33]. 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 μικροργανισμών (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 [34], [35], [36]. Ένας ακόμα πολύ σημαντικός παράγοντας της διεργασίας της βιοαποδόμησης αποτελεί ο αερισμός της, καθώς το οξυγόνο αποτελεί τον δεκτή ηλεκτρονίων στην αερόβια αποδόμηση.

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 [37].

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

2.2.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΑΠΟΔΟΜΗΤΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΘΡΑΚΕΣ

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποικοδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου και τις σχετικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένοι στο θαλάσσιο και όχι μόνο περιβάλλον. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα [38].

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια θεωρούνται οι κυρίαρχοι βιοαποδομητές υδρογονανθράκων με εύρος κατανομής που καλύπτει ακόμη και τα ακραία κρύα ανταρκτικά και αρκτικά περιβάλλοντα [39]. Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλώνουν υδρογονάνθρακες συσχετίζεται επίσης με την ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Εκείνα τα περιβάλλοντα με μια πρόσφατη ή χρόνια μόλυνση πετρελαίου θα έχουν υψηλότερο ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων σε σχέση με τις αρρύπαντες περιοχές. Στα "καθαρά (pristine)" οικοσυστήματα, οι μικροοργανισμοί που καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορεί να αποτελούν λιγότερο από 0,1% της μικροβιακής κοινότητας και στα ρυπασμένα με πετρέλαιο περιβάλλοντα, μπορεί να αποτελούν μέχρι και το 100% των βιώσιμων μικροοργανισμών [14].

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με τη μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο αργό πετρέλαιο. Στη φύση, η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση (consortia). Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν

υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει προοδευτικές ή διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου. Έτσι παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση [40].

Εν περιλήψει, η επιδεκτικότητα των υδρογονανθράκων πετρελαίου σε μικροβιακή αποδόμηση ακολουθεί γενικά την εξής σειρά: n-αλκάνια > διακλαδίσμένα αλκάνια > μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις > κυκλικά αλκάνια. Ωστόσο, αυτή η ακολουθία δεν συμβαίνει πάντα. Η συνθετική ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών πετρελαίων επηρεάζει πολύ το ρυθμό βιοδιάσπασης των συστατικών τους. Ο ρυθμός αποικοδόμησης για τα ίδια συστατικά πετρελαίου μπορεί να ποικίλει σημαντικά για διαφορετικά πετρέλαια. Ο συμμεταβολισμός διαδραματίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου. Πολλοί σύνθετοι διακλαδισμένοι, κυκλικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, που διαφορετικά δεν θα βιοδιασπώνταν ξεχωριστά, μπορούν να οξειδωθούν μέσω του συμμεταβολισμού σε ένα μίγμα πετρελαίου λόγω της πληθώρας άλλων υποστρωμάτων που μπορούν να μεταβολιστούν εύκολα μέσα στο πετρέλαιο. Η βιολογική τύχη των συστατικών πετρελαίου σε ένα μίγμα πετρελαίου απαιτεί ακόμα περαιτέρω έρευνα. Ιδιαίτερα, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια ώστε να καθιερωθεί μια βάση δεδομένων σχετικά με τη βιοδιασπασιμότητα των διαφορετικών τύπων πετρελαίων και πετρελαιοειδών.

2.2.4 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

Όταν εμφανίζονται πετρελαιοκηλίδες στο περιβάλλον, ο ρυθμός βιοδιάσπασης του πετρελαίου επηρεάζεται επίσης πολύ από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση πετρελαίου είναι οι διεργασίες γήρανσης, η θερμοκρασία, η

διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, η διαθεσιμότητα και η συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH.

ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Οι διεργασίες γήρανσης έχουν βαθιές επιδράσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η εξάτμιση των πτητικών συστατικών του πετρελαίου μπορεί να ωφελήσει τους μικροοργανισμούς με την απομάκρυνση των τοξικότερων μικρού μοριακού βάρους συστατικών όπως το βενζόλιο και των μικρότερων *n*-αλκανίων. Εντούτοις, αυτή η διαδικασία οδηγεί επίσης σε ένα μικρότερο βιοδιασπάσιμο ποσοστό πετρελαίου, δεδομένου ότι αυτά τα συστατικά γενικά βιοδιασπώνται εύκολα [14], [40].

Η περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου είναι σημαντική επειδή η αύξηση των βιοαποδομητών πετρελαίου εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος. Ο σχηματισμός των νερό σε πετρέλαιο γαλακτωμάτων μειώνει την περιοχή επιφάνειας, επομένως μειώνεται η βιοδιάσπαση. Οι πίσσες, που είναι μεγάλα σύνολα γηρασμένου και μη αποικοδομήσιμου πετρελαίου, περιορίζουν επίσης την πρόσβαση των μικροοργανισμών λόγω της περιορισμένης περιοχής επιφάνειάς τους [41].

Η διασπορά των υδρογονανθράκων στην υδάτινη στήλη υπό μορφή πετρέλαιο σε νερό γαλακτωμάτων αυξάνει την περιοχή επιφάνειας του πετρελαίου και έτσι τη διαθεσιμότητά του για μικροβιακή επίθεση. Ο σχηματισμός των γαλακτωμάτων πετρελαίου σε νερό μέσω της μικροβιακής παραγωγής και της απελευθέρωσης των επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) έχει βρεθεί επίσης ότι είναι μια σημαντική διεργασία στη λήψη των υδρογονανθράκων από τα βακτήρια και τους μύκητες. Αντίθετα, η εφαρμογή των χημικών διασποράς (dispersants) έχει παραγάγει μικτά αποτελέσματα και δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να ενισχυθεί η βιοδιάσπαση του πετρελαίου. Η φωτοοξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων διαλυτών ενώσεων, οι οποίες είναι συχνά πιο βιοδιασπάσιμες. Εντούτοις, η επίδραση των διεργασιών φωτοοξείδωσης στη βιοδιάσπαση ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή [42].

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Η ατμοσφαιρική θερμοκρασία ενός περιβάλλοντος επηρεάζει τόσο τις ιδιότητες του πετρελαίου όσο και τη δραστηριότητα του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, το ιξώδες του πετρελαίου αυξάνεται,

ενώ η πτητικότητα των τοξικών μικρού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων μειώνεται, καθυστερώντας την αρχή της βιοδιάσπασης [14].

Μερικοί υδρογονάνθρακες είναι πιο διαλυτοί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (π.χ., τα αλκάνια μικρής αλυσίδας), και μερικές μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις είναι πιο διαλυτές σε υψηλότερες θερμοκρασίες [42]. Αν και η βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων μπορεί να εμφανιστεί πέρα από ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, ο ρυθμός βιοδιάσπασης μειώνεται γενικά μειώνοντας τη θερμοκρασία. Υψηλότεροι ρυθμοί αποικοδόμησης εμφανίζονται γενικά στη περιοχή από 15 έως 20 ^{o}C στο θαλάσσιο περιβάλλον [43], [44].

Η επίδραση της θερμοκρασίας περιπλέκεται επίσης από άλλους παράγοντες όπως η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού. Στα περιβάλλοντα όπου ένας ψυχρόφιλος πληθυσμός έχει καθιερωθεί, η αποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί σε σημαντικούς ρυθμούς υπό κρύες συνθήκες.

ΟΞΥΓΟΝΟ

Οι αερόβιες συνθήκες θεωρούνται γενικά απαραίτητες για την εκτενή αποδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου στο περιβάλλον δεδομένου ότι τα σημαντικότερα μονοπάτια αποδόμησης και για τα κορεσμένα και για τα αρωματικά περιλαμβάνουν τις οξυγενάσες [14]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση του οξυγόνου οδηγεί σε αισθητά μειωμένες δραστηριότητες βιοδιάσπασης στα θαλάσσια ιζήματα και στα εδάφη [14], [44]. Οι περιοριστικές συνθήκες οξυγόνου κανονικά δεν υπάρχουν στα ανώτερα επίπεδα της υδάτινης στήλης στα θαλάσσια περιβάλλοντα και στο επιφανειακό στρώμα των περισσότερων ακτών. Το οξυγόνο μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας στα υποεπιφανειακά ιζήματα, στις ανοξικές ζώνες των υδάτινων στηλών και στις περισσότερες λεπτόκοκκες θαλάσσιες ακτές. Οι παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι η δράση του κύματος και η ροή του νερού, η φυσική κατάσταση του πετρελαίου και το ποσό των διαθέσιμων υποστρωμάτων (substrates).

Η αναερόβια αποικοδόμηση του πετρελαίου σύμφωνα με κάποιες μελέτες εμφανίζεται μόνο σε αμελητέους ρυθμούς , οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η περιβαλλοντική σημασία της αναερόβιας αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων μπορεί να απορριφθεί. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αναερόβιος μεταβολισμός των υδρογονανθράκων μπορεί να είναι μια σημαντική διεργασία υπό ορισμένες συνθήκες [45]. Μελέτες επίσης έχουν καταδείξει ότι σε μερικά θαλάσσια

ιζήματα, τα PAHs και τα αλκάνια μπορούν να αποικοδομηθούν κάτω από συνθήκες αναγωγής θειϊκών σε παρόμοιους ρυθμούς με αυτούς υπό αερόβιες συνθήκες [41]. Η σημασία της αναερόβιας βιοδιάσπασης του πετρελαίου στο περιβάλλον απαιτεί ακόμα περαιτέρω μελέτη.

ΘΡΕΠΤΙΚΑ

Θεωρητικά, χρησιμοποιούνται περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε υλικό κυττάρων [46]. Όταν μια μεγάλη πετρελαιοκηλίδα εμφανίζεται στα θαλάσσια περιβάλλοντα η παροχή άνθρακα αυξάνεται εντυπωσιακά και η διαθεσιμότητα σε άζωτο και σε φωσφόρο γίνεται γενικά ο περιοριστικός παράγοντας για την αποικοδόμηση του πετρελαίου [13], [41]. Στα θαλάσσια περιβάλλοντα, ο θρεπτικός περιορισμός (nutrient limitation) συσχετίζεται γενικά με τα χαμηλά επίπεδα υποβάθρου σε άζωτο και φωσφόρο στο θαλασσινό νερό [43]. Μια άλλη πιθανή περιοριστική θρεπτική ουσία (potential limiting nutrient) είναι ο σίδηρος, ο οποίος βρέθηκε να περιορίζει την αποικοδόμηση πετρελαίου στο καθαρό παράκτιο νερό [42].

ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων πετρελαίου είναι το pH και η αλατότητα. Το pH του νερού της θάλασσας είναι γενικά σταθερό και ελαφρώς αλκαλικό [44]. Τα περισσότερα ετερότροφα βακτηρία και μύκητες ευνοούν το ουδέτερο pH, με τους μύκητες να είναι πιο ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η αποικοδόμηση του πετρελαίου αυξάνεται όταν αυξάνεται το pH και ότι η βέλτιστη αποικοδόμηση παρουσιάζεται υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες [47], [42].

Οι αλλαγές στην αλατότητα μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου μέσω της αλλαγής του μικροβιακού πληθυσμού. Τα περισσότερα θαλάσσια είδη έχουν ένα βέλτιστο εύρος αλατότητας από 2.5 ως 3.5% και αυξάνονται λίγο ή καθόλου σε αλατότητα χαμηλότερη από 1.5 με 2% [38]. Σε μια μελέτη αλμυρών λιμνών εξάτμισης, απεδείχθη ότι ο ρυθμός μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μειώθηκε με την αύξηση στην αλατότητα σε εύρος από 3.3 έως 28.4%. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να γίνει κατανοητή η επίδραση της αλατότητας στη βιοδιάσπαση του πετρελαίου.

2.2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ & ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ

Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης έχουν διάφορες ιδιότητες που, ανάλογα με την κατάσταση και τον τύπο της περιοχής μπορούν να υποστηρίξουν τη χρήση τους στην αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων.

Πρώτον, η βιοεξυγίανση επιφέρει συνήθως την ελάχιστη φυσική διάσπαση μιας περιοχής. Αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική σε παραλίες όπου άλλες διαθέσιμες τεχνολογίες καθαρισμού (π.χ., high- and low-pressure spraying, steam cleaning, manual scrubbing, and raking of congealed oil) μπορεί να προκαλέσουν πρόσθετη ζημία στο βιόκοσμο της παραλίας. Δεύτερον, οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης φαίνεται ότι έχουν κανένα. ή μόνο μικρά και βραχυπρόθεσμα δυσμενή αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται σωστά. Αν και η έρευνα για τις πιθανές αρνητικές επιδράσεις συνεχίζεται, υπάρχουν μέχρι τώρα λίγα στοιχεία που να προτείνουν ότι τα πιθανά προβλήματα θα ήταν σημαντικά. Τρίτον, η βιοεξυγίανση μπορεί να είναι χρήσιμη στο να απομακρυνθούν μερικά από τα τοξικά συστατικά του πετρελαίου (π.χ., οι μικρού μοριακού βάρους αρωματικοί υδρογονάνθρακες) από μια πετρελαιοκηλίδα γρηγορότερα από ότι να απομακρυνθούν μόνο από εξάτμιση. Τέταρτο, η βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων επιτυγχάνεται on-site και προσφέρει μια απλούστερη και πιο λεπτομερή λύση στις ρυπασμένες περιοχές.

Αντίθετα, ο ψεκασμός με καυτό νερό μιας ρυπασμένης παραλίας με πετρέλαιο, παραδείγματος χάριν, ξεπλένει κάποιο πετρέλαιο από την επιφάνεια πίσω στο νερό και αυτό το πετρέλαιο πρέπει έπειτα να ανακτηθεί από τους εξαφριστές (skimmers). Το ανακτημένο μίγμα πετρελαίου και ύδατος πρέπει να διαχωριστεί και το πετρέλαιο να εναποτεθεί ή να ανακυκλωθεί. Επίσης, απαιτείται μεγάλος μηχανικός εξοπλισμός και λογιστική ικανότητα (logistical capability) για την αντιμετώπιση μιας μεγάλης πετρελαιοκηλίδας.

Επειδή ο εξοπλισμός και οι διοικητικές μέριμνες της βιοεξυγίανσης είναι συνήθως απλούστερες και απαιτούν λιγότερη χειρωνακτική εργασία, οι δαπάνες μπορεί να είναι χαμηλότερες απ' ό,τι για άλλες τεχνικές. Συγχρόνως, το συνολικό κόστος του καθαρισμού είναι η σημαντικότερη ανησυχία, και όπου η βιοεξυγίανση

χρησιμοποιείται ως προσθήκη ή δευτεροβάθμια τεχνολογία, το συνολικό κόστος όσο και τα συνολικά οφέλη θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερα. Το κόστος παρακολούθησης της βιοεξυγίανσης πρέπει επίσης να συνυπολογιστεί.

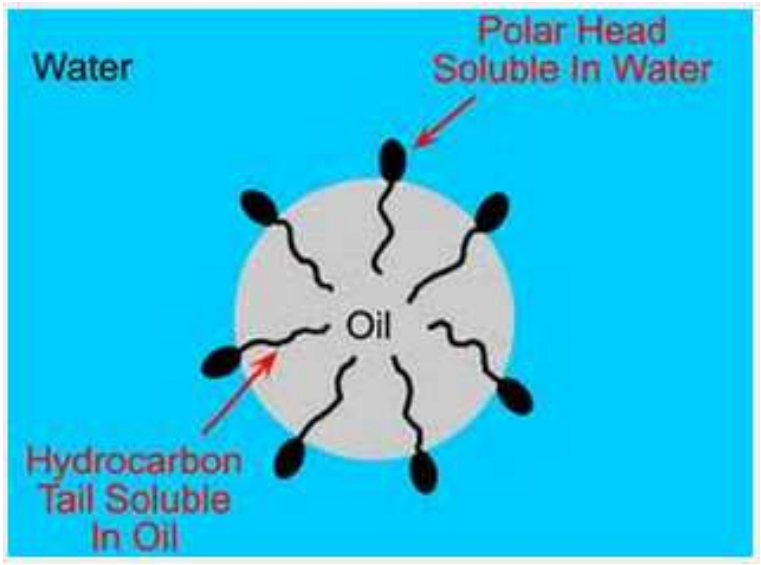
Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης έχουν διάφορα γενικά μειονεκτήματα. Αν και η βιοεξυγίανση μπορεί να λειτουργήσει γρήγορα-ενδεχομένως πολύ πιο γρήγορα-από τη φυσική βιοδιάσπαση, δεν μπορεί να παραγάγει σημαντικά μικρής διάρκειας αποτελέσματα. Εάν οι ακτές απειλούνται από μια μεγάλη διαρροή πετρελαίου μεσοπέλαγα, για παράδειγμα, τότε η βιοεξυγίανση δεν είναι πιθανώς το κατάλληλο αρχικό αμυντικό μέτρο. Σε αυτήν την περίσταση, θα ήταν συνήθως πιο αρμόζον να ανακτηθεί το πετρέλαιο από το νερό όσο το δυνατόν γρηγορότερα ή, διαφορετικά, να διασκορπιστεί ή να καεί προτού να παρασυρθεί επάνω στην παραλία. Η βιοεξυγίανση παίρνει πάρα πολύ χρόνο να δουλέψει ως αρχικό μέτρο αντιμετώπισης για μια τέτοια απειλή. Επιπλέον, η προσέγγιση της βιοεξυγίανσης πρέπει να προσαρμοστεί συγκεκριμένα σε κάθε ρυπασμένη περιοχή.

Οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης δεν είναι και είναι απίθανο σύντομα να γίνουν, άμεσης εφαρμογής τεχνολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ίση αποτελεσματικότητα σε κάθε τοποθεσία συμβάντος. Αν και άλλες τεχνολογίες αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων υπόκεινται σε αυτόν τον ίδιο περιορισμό, η προηγμένη γνώση που απαιτείται για τις τεχνολογίες βιοεξυγίανσης είναι μεγαλύτερη. Η προηγμένη γνώση, παραδείγματος χάριν, της αποδοτικότητας των γηγενών βακτηρίων σε μια περιοχή στην αποικοδόμηση του πετρελαίου, η διαθεσιμότητα των περιοριστικών θρεπτικών ουσιών και η ευαισθησία του συγκεκριμένου αργού πετρελαίου στη μικροβιακή επίθεση απαιτούνται, έτσι ο προληπτικός προγραμματισμός θα είναι σημαντικός.

Τέλος, το κοινό δεν είναι ακόμα εξοικειωμένο με τις τεχνολογίες βιοεξυγίανσης. Αν και η δημόσια στάση απέναντι στις "φυσικές" λύσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα είναι γενικά ευνοϊκή, η έλλειψη γνώσης για τους μικροοργανισμούς και του φυσικού ρόλου τους στο περιβάλλον θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην αποδοχή της χρήσης τους. Πριν οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης χρησιμοποιηθούν ευρέως, θα πρέπει η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους να καταδειχθούν πειστικά και να κοινοποιηθούν στο κοινό [48].

2.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών έχει προταθεί για την αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με τη βιοδιαθεσιμότητα των ρυπογόνων ενώσεων για τη βιοεξυγίανση της θάλασσας. Οι επιφανειακά δραστικές ουσίες (surfactants) είναι οργανικά, αμφίφιλα μόρια και αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Βλέπε Εικόνα 5. 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 [49], [50], [51], [52].



Εικόνα 4: Απεικόνιση επιφανειοδραστικών ουσιών.

Η τεράστια αγοραστική ζήτηση για επιφανειοδραστικές ενώσεις ικανοποιείται αυτήν την περίοδο από τις πολυάριθμες συνθετικές, κυρίως πετρελαϊκού χαρακτήρα χημικές επιφανειοδραστικές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως τοξικές στο περιβάλλον και μη-βιοδιασπώμενες. Μπορούν να βιοσυσσωρεύτουν και η παραγωγή τους, οι διεργασίες και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα.

Καθώς οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί γίνονται πιο αυστηροί και η συνειδητοποίηση για την ανάγκη να προστατευθεί το οικοσύστημα αυξάνεται, το ενδιαφέρον για επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) ως

πιθανές εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών επιφανειοδραστικών ενώσεων συνεχώς αυξάνεται.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης είναι αμφίφυλες ενώσεις (amphiphilic compounds) μικροβιακής προέλευσης με ιδιαίτερη δυνατότητα σε εμπορικές εφαρμογές μέσα στις διάφορες βιομηχανίες. Παράγονται από πολλά βακτηριακά γένη που μπορούν να αποικοδομήσουν ή να μετασχηματίσουν τα συστατικά των πετρελαιοειδών. Είναι μη τοξικές, μη-επικίνδυνες, βιοδιασπάσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις, που μπορούν να παραχθούν επικερδώς υπό ex-situ συνθήκες, η in-situ παραγωγή τους μπορεί να υποκινηθεί στη περιοχή της ρύπανσης και μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι ο σχηματισμός μικυλλίων, 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 [52]

Ανάλογα με τη φύση του υδρόφοβου τμήματος, οι επιφανειακές δραστικές ουσίες μπορούν να χωριστούν σε ανιονικές, κατιονικές, διϊονικές 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 πολυπεπτίδιο (ουδέτερη) [27]. Οι επιφανειακά δραστικές ουσίες είναι κυρίως προϊόντα του πετρελαίου, παράγονται σε μεγάλη κλίμακα και έχουν πολλές εφαρμογές [49], [50].

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 [53], [54], [55]. Για τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων έχουν αναφερθεί τρεις βασικοί μηχανισμοί:

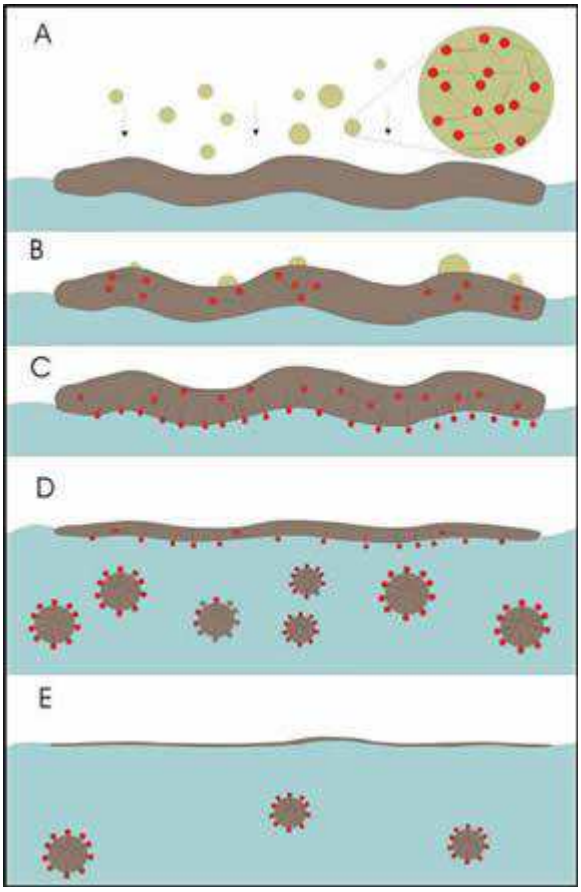
- Πρόσληψη των διαλυμένων υδρογονανθράκων στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να λειτουργεί σε υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας.
- Πρόσληψη υδρογονανθράκων που δεν βρίσκονται στην υδατική φάση από κύτταρα που έρχονται σε επαφή με πολύ μεγαλύτερες από αυτά σταγόνες υδρογονανθράκων. Ο μηχανισμός 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:

A. Μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υδατικής και μη-υδατικής φάσης
B. Αύξηση της διαλυτότητας των υδρογονανθράκων. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως διαλυτοποίηση (solubilization) και προκαλείται από την παρουσία μικυλλίων. 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.
C. 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 Εικόνα 6.

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, 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.



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης των επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Αυτό οφείλεται στην προσρόφηση των επιφανειοδραστικών ουσιών, στο ότι οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά υπόστρωματα 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 μικκύλια.

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

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 [34], [56]. Σήμερα, τα ραμνολιπίδια θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικές βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις. Έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάκτηση πετρελαίου (EOR), στην κινητοποίηση 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 [49], [56].

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 προτελευταίου άνθρακα του ακόρεστου C18 οξέος. Τα σοφορολιπίδια και τα παράγωγα τους χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καθαρισμού, καλλυντικών, φαρμάκων.

Στα γλυκολιπίδια ανήκουν επίσης τα τρεχαλολιπιδία. Η τρεχαλόζη είναι ένας σπάνιος δισακχαρίτης που αποτελείται από δυο μόρια γλυκόζης τα οποία ενώνονται με α(1-1) γλυκοσιδικό δεσμό και συνήθως βρίσκεται στην ένυδρη κατάσταση τρεχαλόζη, η αλλιώς 1-α-D-γλυκοπυρανοσυλο-αD-γλυκοπυρανοσίδιο με μοριακό βάρος 378,33 και σημείο τήξεως 97°C ανήκει στην κατηγορία των μη αναγωγικών σακχάρων αφού δεν περιέχει ημιακετυλικό υδροξύλιο.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης από τον *aeruginosa pseudomonas* SB30 εξετάστηκαν για την δυνατότητά τους να απομακρύνουν το πετρέλαιο από το ρυπασμένο αμμοχάλικο της Αλάσκας (Exxon Valdez) στο εργαστήριο [57]. Ένα διάλυμα 1% αυτών των ενώσεων βρέθηκε ότι απομακρύνει 3 φορές περισσότερο πετρέλαιο σε θερμοκρασίες > 40 ^{o}C και 1 λεπτό ελάχιστο χρόνο επαφής σε σχέση με το νερό. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να απομακρύνούν περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως το πετρέλαιο, από τα φυσικά υποστρώματα.

Το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο της Αλάσκας, Fairbanks, πραγματοποίησε μια δοκιμή πεδίου τον Ιούλιο του 1993 στο Sleepy κόλπο στο νησί LaTouche στο Prince William Sound για να εξετάσει την αποτελεσματικότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης στην αφαίρεση του γηρασμένου αργού πετρελαίου από το υποεπιφανειακό υλικό της παραλίας. Ανέφεραν την πλήρη αφαίρεση των υδρογονανθράκων της περιοχή ντίζελ του πετρελαίου (στο όριο 0,5 mg kg1) ενώ οι ημιπτητικοί υδρογονάνθρακες μειώθηκαν στο επίπεδο 70%, με απομάκρυνση 30%. Όλες αυτές οι μελέτες είναι εργαστηριακές και η επιτυχής βιοεξυγίανση των εκτεθειμένων περιοχών ανοιχτής

θαλάσσης που χρησιμοποιούν επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης παραμένει μια πρόκληση.

Τα πειράματα με *το aeruginosa* isolate s8, που απομονώθηκε από το ρυπασμένο με πετρέλαιο θαλασσινό νερό, έδειξαν την ικανότητά του να αποικοδομεί εξαδεκάνιο, επταδεκάνιο, οκταδεκάνιο και δεκαεννιανιο στο νερό της θάλασσας μέχρι 47, 58, 73 και 60%, αντίστοιχα, μετά από μια περίοδο επώασης 28 ημερών.

Οι Rhanmolipid επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης από *το aeruginosa pseudomonas* χαρακτηρίστηκαν για τη δυνατότητά τους να απομακρύνουν τους υδρογονάνθρακες από το αμμώδες έδαφος και από το λασπώδες έδαφος.

Μια αξιολόγηση της δυνατότητας των υδατικών διαλυμάτων επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης (αεσκίνη (aescin), λεκιθίνη, rhamnolipid, σαπωνίνη και τανίνη) για τις πιθανές εφαρμογές τους στο πλύσιμο του ρυπασμένου εδάφους με αργό πετρέλαιο πραγματοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης ήταν σε θέση να αφαιρέσουν σημαντικό ποσό αργού πετρελαίου από το ρυπασμένο έδαφος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για παράδειγμα το rhamnolipid και το SDS απομάκρυναν μέχρι 80% πετρέλαιο και η λεκιθίνη περίπου 42% [58].

Η ικανότητα των επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης να γαλακτωματοποιούν τα μίγματα υδρογοναναθράκων-ύδατος ενισχύει την αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων στο περιβάλλον. Η παρουσία των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων στο νερό της θάλασσας καταστά τη βιοδιάσπαση μια από τις αποδοτικότερες μεθόδους για την απομάκρυνση ρυπαντών .

2.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός θρεπτικών ουσιών που να επιτυγχάνει την βιοποικοδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων στα περιβάλλοντα ανοιχτής θαλάσσης. Ωστόσο όπως περιγράφηκε και παραπάνω η εκλογή των κατάλληλων θρεπτικών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε:

1. να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης των θρεπτικών λόγω της δράσης των κυμμάτων,
2. να είναι δυνατή η δράση τους στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος
3. να είναι εύκολα βιοδιασπώμενα και μη τοξικά
4. το κόστος εφαρμογής τους μικρό.

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην βιοδιέγερση του πετρελαίου στα ανοιχτά εν αντιθέσει με τις ακτές είναι να διατηρηθεί η βέλτιστη συγκέντρωση θρεπτικών σε επαφή με τη φάση του πετρελαίου. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να σχεδιαστεί ένα κατάλληλο σύστημα απελευθέρωσης θρεπτικών ούτως ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα έκπλυσης. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχουν γίνει έρευνες πάνω σε νέα ολεοφιλικά και βραδείας απελευθέρωσης θρεπτικά υλικά.

Η προσθήκη θρεπτικών έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της βιοδιάσπασης πετρελαίου σε διάφορες θαλάσσιες ακτές. Θεωρητικά, περίπου 150 mg αζώτου και 30 mg φωσφόρου καταναλώνονται για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε κυτταρικό υλικό [51]. Επομένως, μια συνήθης χρησιμοποιημένη στρατηγική είναι να προστεθούν οι θρεπτικές ουσίες σε συγκεντρώσεις που πλησιάζουν τη στοιχειομετρική αναλογία C:N:P των 100:5:1.

Πίνακας 3: Διάφορες πηγές αζώτου και φώσφορου στην αποικοδόμηση του πετρελαίου.

Nitrogen source	Phosphorus source	Oil biodegraded, %
KNO_3	Na_2HPO_4	70
KNO_3	Octylphosphate	72
KNO_3	Isooctylphosphate	70
CRNF	Na_2HPO_4	70
CRNF	Octylphosphate	72
Dodecylurea	Na_2HPO_4	37
Dodecylurea	Octylphosphate	35
Trimethylenetetraurea	Na_2HPO_4	15
Trimethylenetetraurea	Octylphosphate	15
Hexamethylphosphoramide	Hexamethylphosphoramide	15
None added	None added	5

Πρόσφατα, συζητήθηκε η πιθανή εφαρμογή της (resource-ratio theory) θεωρία που βασίζεται στην αναλογία των θρεπτικών για την βιοδιάσπαση των υδρογονανθράκων [59]. Αυτή η θεωρία προτείνει το μεταχειρισμό της αναλογία N:P για τον εμπλουτισμό διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών και ότι η βέλτιστη N:P αναλογία μπορεί να είναι διαφορετική για την αποικοδόμηση διαφορετικών ενώσεων

(όπως οι υδρογονάνθρακες που αναμιγνύονται μέσα με άλλες βιογενείς ενώσεις στο χώμα). Εντούτοις, η πρακτική χρήση αυτών των θεωριών παραμένει μια πρόκληση. Ιδιαίτερα, στις θαλάσσιες ακτές, που η διατήρηση μιας ορισμένης αναλογίας θρεπτικών είναι αδύνατη λόγω της έκπλυσης (washout) των θρεπτικών ουσιών ως αποτέλεσμα της δράσης των παλιρροιών και των κυμάτων.

Μια πρακτικότερη προσέγγιση είναι να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις της περιοριστικής θρεπτικής ουσίας ή των θρεπτικών ουσιών μέσα στο νερό των πόρων σε ένα βέλτιστο εύρος [16]. Οι πιο κοινώς χρησιμοποιημένες θρεπτικές ουσίες είναι οι υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες (water-soluble nutrients), οι στερεές βραδείας απελευθέρωσης (slow-release) θρεπτικές ουσίες και τα ολεοφιλικά λιπάσματα άλλες πηγές παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Κάθε είδος θρεπτικής ουσίας έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς του. Τα γενικά χαρακτηριστικά αυτών των θρεπτικών ουσιών και των σημαντικών παραγόντων που επηρεάζουν την παραμονή τους στον πεδίο, όπως είναι τα κύματα και οι παλίρροιες και η φυσική διείσδυση, θα συζητηθούν σε αυτό το τμήμα και θα συνοψιστούν στον Πίνακα 4.

ΚΟΚΚΩΔΗ ΒΡΑΔΕΙΑΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΑ (SLOW-RELEASE)

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να σχεδιαστεί ένα συστήματα διανομής θρεπτικών που να υπερνικά τα προβλήματα έκπλυσης (washout problems) χαρακτηριστικά των παλιρροιακών περιβαλλόντων. Η χρήση των λιπασμάτων βραδείας απελευθέρωσης είναι μια από τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για να παρέχουν συνεχώς θρεπτικές ουσιες τις ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές.

Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης είναι συνήθως σε στερεή μορφή, αποτελούνται από ανόργανες θρεπτικές ουσίες που επικαλύπτονται με υδροφοβικά υλικά όπως η παραφίνη ή τα φυτικά έλαια. Αυτή η προσέγγιση μπορεί επίσης να κοστίσει λιγότερο από ότι να προστίθενται υδατοδιαλυτές θρεπτικές ουσίες λόγω των λιγότερο συχνών εφαρμογών. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης είναι πολλά υποσχόμενα με βάση τις μελέτες βιοεξυγίανσης και τις εφαρμογές τους.

ΟΛΕΟΦΙΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ

Μια άλλη προσέγγιση για να υπερνικηθεί το πρόβλημα των υδατοδιαλυτών θρεπτικών ουσιών (water-soluble nutrients) που ξεπλένονται γρήγορα ήταν να χρησιμοποιηθούν ολεοφιλικές οργανικές θρεπτικές ουσίες [60]. Η λογική για την στρατηγική αυτή είναι ότι η βιοδιάσπαση του πετρελαίου εμφανίζεται κυρίως στη

διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος, δεδομένου ότι τα ολεοφιλικά λιπάσματα είναι σε θέση να εμμείνουν στο πετρέλαιο και να παρέχουν τις θρεπτικές ουσίες στη διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος, μπορεί να υφίστανται ενισχυμένη βιοδιάσπαση χωρίς την ανάγκη να αυξηθούν οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στο νερό των πόρων.

Η αποτελεσματικότητα αυτών των διάφορων τύπων θρεπτικών ουσιών θα εξαρτηθεί από τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Τα λιπάσματα βραδείας απελευθέρωσης μπορούν να αποτελέσουν ιδανικές πηγές θρεπτικών εάν οι ρυθμοί απελευθέρωσης των θρεπτικών μπορούν να ελεγχθούν καλά. Τα υδατοδιαλυτά λιπάσματα (ater-soluble fertilizers) είναι οικονομικότερα και αποδοτικότερα σε λεπτόκοκκες χαμηλής ενέργειας ακτές όπου η μεταφορά ύδατος είναι περιορισμένη.

Τα ολεοφιλικά λιπάσματα είναι καταλληλότερα για χρήση σε χονδρόκοκκες υψηλής ενέργειας παραλίες. Εντούτοις, για την επιτυχή εφαρμογή των προϊόντων βιοεξυγίανσης απαιτούνται πάντα κατάλληλες δοκιμές για την αξιολόγηση τους βασισμένες στις συγκεκριμένες συνθήκες κάθε ρυπασμένης περιοχής.

Μια σημαντική ερώτηση είναι εάν η προσθήκη πηγών οργανικού άνθρακα όπως είναι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις και οι μελάσες θα αυξήσει την ανάπτυξη των μικροβιακών αποδομητών του πετρελαίου και θα ενισχύσει έτσι την βιοαποικοδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.

Βρέθηκε ότι η προσθήκη μελάσας (0.01% v/w,. 0.2 mL) που προέρχεται από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου σε 20mg πετρελαίου αύξησε αξιοπρόσεκτα την αναπνοή (respiration) και συνδέεται με την σημαντική αποικοδόμηση των n-αλκανίων. Στις μελάσες, ο άνθρακας είναι διαθέσιμος υπό μορφή σακχάρου. Για τις μελάσες το ποσοστό μείωσης των n-αλκανίων ήταν υψηλότερο από ότι με το ανόργανο λίπασμα, καταδεικνύοντας ότι η προσθήκη πηγών οργανικού άνθρακα μπορεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να ενισχυθεί τη βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοκηλίδων σε σύγκριση με τα ανόργανα λιπάσματα που δεν έχουν πηγή άνθρακα. Όπως αποδείχτηκε από αυτή την εργασία, τα βακτήρια που διατέθηκαν από εναλλακτικές πηγές άνθρακα και άλλα θρεπτικά, όπως οι βιταμίνες που είναι παρούσες μέσα στις μελάσες, έδειξαν ενισχυμένη αναπνοή (respiration) σε σύγκριση με αυτά που διατέθηκαν με πετρελαϊκούς άνθρακες και ανόργανα λιπάσματα μόνο.

Πίνακας 4: **Σημαντικότερα είδη θρεπτικών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιοαποικοδόμηση πετρελαίου**

Είδος θρεπτικών	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογές στο πεδίο
Υδατοδιαλυτά (π.χ. KNO_3, $NaNO_3$, NH_3NO_3, K_2HPO_4, $MgNH_4PO_4$)	• Άμεσα διαθέσιμα • Εύκολα στο χειρισμό για να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις στόχοι των θρεπτικών • Δεν επιδρούν με την οργανική ύλη	• Ξεπλένονται γρήγορα από τα κύμματα Απαιτείται χειρωνακτική εργασία και φυσικές παρεισφρητικές εφαρμογές • Πιθανή τοξική επίδραση	Alaska (Pritchard *et al.*, 1992) Delaware (Venosa *et al.*, 1996)
Βραδείας Απελευθέρωσης(π.χ. Customblen, IBDU, Max-Bac)	• Παροχή συνεχούς πηγής θρεπτικών • Φθηνότερη εφαρμογή συγκριτικά με άλλου είδους θρεπτικά	• Η μη διατήρηση βέλτιστων ρυθμών απελευθέρωσης θρεπτικών	Alaska (Pritchard *et al.*, 1992) Nova Scotia (Lee *et al.*, 1993)
Ολεοφιλικά (π.χ. Inipol EAP22, F1, MM80)	• Ικανότητα προσκόλλησης στο πετρέλαιο και παροχής θρεπτικών στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος	• Ακριβά • Μεταβλητής αποτελεσματικότητας • Ο οργανικός άνθρακας που περιέχουν ενδέχεται να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ανοξικές συνθήκες (συναγωνισ μός διάσπασης πετρελαίου)	Alaska (Pritchard *et al.*, 1992) Nova Scotia (Lee *et al.*, 1987, 1989,1995a &b)

Η χρήση της μελάσας που είναι ένα παραπροϊόν της ζάχαρης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης πετρελαιοκηλίδων και να εφαρμοστεί όπου η θάλασσα είναι ήρεμη [61].

Για να αντιμετωπιστεί λοιπόν το πρόβλημα της γρήγορής έκπλυσης των θρεπτικών θα πρέπει τα επιλεγμένα θρεπτικά υλικά να είναι κατά προτίμηση μη υδατοδιαλυτά άρα να εμπίπτουν στην κατηγορία των βραδείας απελευθερώσεως ή ολεοφιλικών θρεπτικών. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε προηγούμενα η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο λαμβάνει χώρα στην διεπιφάνεια πετρελαίου-ύδατος επομένως θέλαμε τα συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά να είναι ικανά να προσαρτηθούν στην επιφάνεια του κυττάρου ούτως ώστε να ενισχύσουν την προσκόλληση του στο πετρέλαιο και έπειτα να εκκριθούν στο μέσο για να ενισχύσουν την «ψευδοδιαλυτοποίηση» του πετρελαίου.

Τέλος τα θρεπτικά αυτά υλικά θα ήταν προτιμότερο να προέρχονταν από άλλες διαδικασίες επεξεργασίας προϊόντων, δηλαδή με λίγα λόγια να αποτελούν απόβλητα άλλων διεργασιών ώστε να η εφαρμογή τους να είναι φθηνή και να αποτελεί ένα είδος εξοικονόμησης ενέργειας μέσω της επαναχρησιμοποίησης τους. Έτσι λοιπόν τα προς επιλογή θρεπτικά υλικά πρέπει α)να είναι λιπόφιλα, β) να έχουν ιδιότητες επιφανειοδραστικών ενώσεων βιολογικής προέλευσης, γ) να προέρχονται από διεργασίες επεξεργασίας προϊόντων και δ)να είναι απαραιτήτως φιλικά προς το περιβάλλον, δηλαδή βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η παραγωγή και η απομόνωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα πετρέλαιο-μελάσα, με ή χωρίς θρεπτικά και προσθήκη θαλάσσιων μικροοργανισμών, απομονωμένων από ρυπασμένο με πετρελαιοειδή θαλασσινό νερό.

3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Για την παρασκευή των υγρών καλλιεργειών χρησιμοποιείται θαλασσινό νερό και η μικροβιακή κοινότητα EB8. Οι καλλιέργειες επωάζονται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει άνθρακα άζωτο και φώσφορο. Ως πηγή άνθρακα προστέθηκε πετρέλαιο και μελάσα ενώ το άζωτο και ο φώσφορος προέρχονται από την ένωση KNO_3 και KH_2PO_4 αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ των καλλιεργειών είναι η αναλογία αζώτου-φωσφόρου.

Χρησιμοποιούνται πέντε φλάσκες για κάθε διαφορετικό τύπο καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επωάζονται όλες την ίδια ημέρα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες στο εργαστήριο. Η δημιουργία όλων των καλλιεργειών γίνεται κάτω από αποστειρωμένο απαγωγέα. Μέτα την ετοιμασία μεταφέρεται σε επωαστήριο το οποίο είχε σταθερή θερμοκρασία ίση με 20°C. Η ανακίνηση των καλλιεργειών είναι σταθερή στα 150 rpm για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Σε κάθε καλλιέργεια γίνεται δειγματοληψία εννέα φορές κατά τη διάρκεια περιόδου 30 ημερών. Από κάθε δείγμα που συλλέγεται εξετάζεται η παρουσία-παραγωγή των τριών λιπιδίων: ραμνολιπίδια, σοφορολιπίδια και τρεχαλολιπίδια. Ολόκληρη η φιάλη θυσιάζεται για την ανάλυση. Η διαδικασία απομόνωσης των λιπιδίων γίνεται με τη μέθοδο της εκχύλισης και η ταυτοποίηση τους με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ-ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ

3.2.1 ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ - ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ

Το πείραμα διεξήχθη χρησιμοποιώντας καθαρό φυσικό θαλασσινό νερό. Καθαρό φυσικό θαλασσινό νερό σημαίνει ότι η πηγή του νερού της θάλασσας οπού γίνεται η συλλογή δεν πρέπει να έχει μολυνθεί βαριά με βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Η συλλογή του θαλασσινού νερού γίνεται από την περιοχή του Αγ. Ονούφρη Χανιών σε σημείο που δεν ήταν ρυπασμένο το νερό με φιάλες 1L. Αμέσως μετά το θαλασσινό νερό αποστειρώνεται και πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε επτά ημέρες στις καλλιέργειες από τη συλλογή του έτσι δεν προστίθεται κανένας μικροβιακό πληθυσμός.

Το πετρέλαιο για τις καλλιέργειες προέρχεται από το Καζακστάν και παραχωρήθηκε από τα ΕΛ.ΠΕ. Για την μελέτη της παραγωγής των επιφανειοδραστικών ουσιών που εξετάζονται, χρησιμοποιήθηκε η μικροβιακή κοινότητα ΕΒ8, η οποία παρουσίασε τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα λεπτομέρειες αναφέρονται παρακάτω.

3.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ-ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ (MATH test)

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την εκτίμηση της υδροφοβικότητας (hydrophobicity) είναι το MATH test (Microbial Adherence To Hydrocarbons) [62]. Αποτελεί μία αρκετά απλή, εύκολη και γρήγορη διαδικασία, αν και διαθέτει αρκετά μειονεκτήματα. Το τεστ αυτό αποτελεί απλά μία εκτίμηση της υδροφοβικότητας των κυττάρων και των παραγώγων τους, και όχι ακριβή τιμή. Η διαδικασία που λαμβάνει χώρα για το MATH τεστ είναι η ακόλουθη:

I. Φυγοκέντρηση της ποσότητας της μικροβιακής καλλιέργειας.
II. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
III. Ξέπλυμα του σχηματιζόμενου στερεού με PBS buffer.

IV. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (επιθυμητή τιμή απορρόφησης μεταξύ 0,6 - 0,4) ($OD_{600,i}$).

V. Προσθήκη 150 μl ελαιώδους μέσου (στην περίπτωση μας ν-δεκαεξάνιο).

VI. Ανάδευση.

VII. Μετά των διαχωρισμό των δύο φάσεων, μέτρηση της οπτικής απορρόφησης της κάτω-υδατικής φάσης ($OD_{600,f}$).

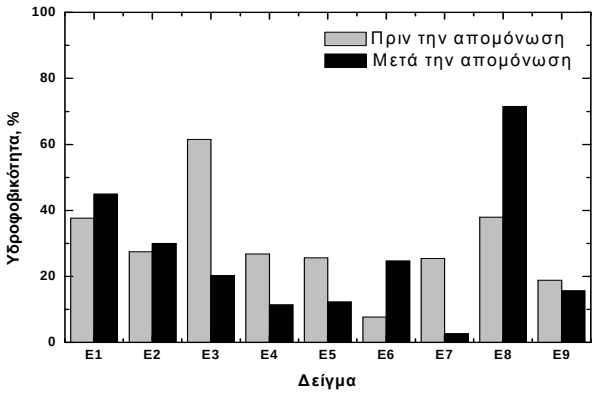
Η υδροφοβικότητα εκφράζεται ως εξής:

$$\boldsymbol{Hydrophobicity}\ \% = \left[\left(\boldsymbol{OD_{600,i} - OD_{600,f}}\right)\Big/\boldsymbol{OD_{600,i}}\right].\mathbf{100}\%$$

Ο PBS buffer (1L) που χρησιμοποιείται κατά το MATH test παρασκευάζεται ως εξής:

- 16.9 g K_2HPO_4
- 7.3 gKH_2PO_4

Για την απομόνωση μικροβιακής κοινότητας που παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, δείγμα από την ελαιώδη φάση του τεστ απλώνεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και απομονώνεται με τη μέθοδο του στερεού υποστρώματος.



Διάγραμμα 3: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας των μικροβιακών δειγμάτων από τον κόλπο της Ελευσίνας πριν και μετά την απομόνωση.

Σε δειγματοληψία που έλαβε χώρα στον κόλπο συλλέχθηκαν εννέα δείγματα ρυπασμένου θαλασσινού νερού από διαφορετικά σημεία. Τα δείγματα του νερού χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των μικροβιακών πληθυσμών Ε1-Ε9.Στο ακόλουθο σχήμα παρατίθενται οι εννέα εκτιμώμενες υδροφοβικότητες, για τα δείγματα που απομονώθηκαν από την Ελευσίνα.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η εκτιμώμενη υδροφοβικότητα των μικροβιακών πληθυσμών στην περίπτωση της Ε8 είναι αρκετά ψιλότερη σε σχέση με αυτή που παρουσιάζουν οι άλλες μικροβιακές κοινότητες. Επομένως, επιλέγεται η απομονωμένη μικροβιακή κοινότητα ΕΒ8, που είχε την μεγαλύτερη υδροφοβικότητα [63].

3.2.3 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΆΛΕΣ
- ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ
- ΦΛΑΣΚΕΣ ERLENMEYER
- ΠΙΠΕΤΕΣ PASTEYR (1,5,10,25ml)
- ΖΥΓΑΡΙΑ ΑΚΡΙΒΕΊΑΣ
- ROTOR EVAPORATE
- ΞΗΡΑΝΤΗΡΑΣ
- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΤΗΡΑΣ
- ΦΙΛΤΡΟ Whatman πορώδους 11μm
- ΦΙΑΛΙΔΙΑ (VIALS)
- ΧΑΡΤΙ ΖΥΓΙΣΗΣ
- ΜΕΛΑΣΑ
- ΟΞΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ
- ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΟΞΥ
- ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟ
- ΧΛΩΡΟΦΛΟΡΜΙΟ
- ΜΕΘΑΝΙΟ
- ΑΕΡΙΟ ΑΖΩΤΟ

3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Παρασκευάζονται καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα σταθερή ποσότητα πετρελαίου/μελάσα και επωάζονται για 30 ημέρες. Στις καλλιέργειες με το θαλασσινό

νερό και πετρέλαιο επωάστηκε η μικροβιακή κοινότητα EB8. Η προσθήκη των θρεπτικών γίνεται ως εξής:

- 2 g N/100 g πετρελαίου 0.01 g N/0.5 g πετρελαίου 0.01 g N/100 mL διαλύματος.
- 0.2 g P/ 100 g πετρελαίου 0.001 g P/0.5 g πετρελαίου 0.001 g P/100 mL διαλύματος.

Δηλαδή αναλογία 100:10:1 C:N:P και αντίστοιχες ποσότητες για αναλογία 100:5:1 Με βάση τα παραπάνω δημιουργούνται οι εξής τρεις κατηγορίες:

I. MC. Αρχικά κατασκευάζονται πέντε καλλιέργειες στις οποίες κάθε μια φλάσκα περιέχει 158ml θαλασσινό νερό, 1% v/v μικροβιακής κοινότητας EB8, δηλαδή 1.6ml. Επιπλέον, προσθέτεται 0.5%w/v άνθρακα, δηλαδή 0.8gr. Τα 0.8gr περιέχουν 0.4gr πετρέλαιο και 0.4gr μελάσα.

II. MC(NP)/2. Χρησιμοποιούνται πέντε φλάσκες οι οποίες περιέχουν 154ml θαλασσινό νερό, ίδια ποσότητα μικροβιακής κοινότητας EB8 1% και 0.4gr πετρελαίου -0.4gr μελάσα, όπως και παραπάνω. Επιπλέον, προστίθενται 0,25% άζωτο-φώσφορος, ώστε η αναλογία C:N:P να είναι 100:5:1 που προέρχονται από τις ενώσεις KNO_3 και KH_2PO_4.

III. MCNP. Η τελευταία υγρή καλλιέργεια χρειάζεται 154 ml θαλασσινό νερό, ίδια ποσότητα μικροβιακή κοινότητα EB8 1% και ίδια ποσότητα άνθρακα, 0.5%w/v. Τέλος, προστίθεται 0,5% άζωτο-φώσφορο ώστε να ισχύει η αναλογία C:N:P 100:10:1. Το άζωτο προέρχεται από την ένωση KNO_3 ενώ ο φώσφορος από το KH_2PO_4.

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ:

- Με M συμβολίζεται η μελάσα.
- Με C συμβολίζονται το πετρέλαιο.
- Με NP συμβολίζεται το άζωτο και ο φώσφορος.

Τα ακόλουθα βήματα υιοθετούνται για την πειραματική οργάνωση:

Βήμα 1ον	Οι βοριοπυριτικές Erlenmeyer κωνικές φιάλες (250-mL) καθαρίζονται λεπτομερώς και αποστειρώνονται για 15 λεπτά στους 120 ^{o}C και σε 15 psi.
Βήμα 2ον	Οι φιάλες ονομάζονται με τον κατάλληλο κωδικό: προϊόν ή έλεγχος (μάρτυρας), ημέρα δειγματοληψίας και χαρακτηριστικό αριθμό που δείχνει την επανάληψη.
Βήμα 3ον	160 mL θαλασσινού νερού προστίθεται σε κάθε φιάλη.
Βήμα 4ον	Οι πιπέτες Pasteur πρέπει επίσης να αποστειρωθούν.
Βήμα 5ον	Το πετρέλαιο τοποθετείται σε φιαλίδιο και αποστειρώνεται. Το κατάλληλο ποσό πετρελαίου (0.5g) προστίθεται σταγόνα-σταγόνα.
Βήμα 6ον	Η προσθήκη του πετρελαίου γίνεται με προσοχή για να μη χυθεί στα τοιχώματα της φιάλης. Προφυλάξεις λαμβάνονται κατά το χειρισμό και το γέμισμα των φιαλών για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μόλυνσης από εξωγενή μικρόβια. Νέα πιπέτα χρησιμοποιείται για κάθε σειρά φιαλών.
Βήμα 7ον	Οι φιάλες μεταφέρονται κατακόρυφα και τοποθετούνται στον επωαστήρα αναδεύονται στα 150 rpm στους 20 °C

3.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για την μέτρηση της βιομάζας αρχικά απομονώνονται 25ml από κάθε καλλιέργεια σε ειδικά φάλκον των 50ml. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στο SIGMAI 4-16K centrifuge για 15 λεπτά στις 13000 στροφές. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το φύλλο βιομάζας, που παραμένει μέσα στο φάλκον, ξηραίνεται στους 400°C για 24 ώρες, σε φούρνο τύπου memmert για την απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθεί ζύγιση σε ζυγαριά ακριβείας (SCALTEC).

3.4.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Για να υπολογιστεί το πειραματικό σφάλμα στη παρούσα εργασία παρασκευάζεται καλλιέργεια MCNP/2 εφαρμόζοντας την μεθοδολογία απομόνωσης των σοφορολιπιδίων (αναφέρεται παρακάτω). Η διαδικασία εκτελείται έξι φορές και με τη μέθοδο αυτή γίνεται προσέγγιση στο ποσοστό του σφάλματος. Το ποσοστό σφάλματος προσδιορίζεται με βάση τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση.

3.4.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Ως εκχύλιση ορίζεται η παραλαβή μιας ουσίας από μίγμα ουσιών με τη χρήση ενός διαλύτη. Κυρίως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Η εκχύλιση είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μίκρο- και στη μακρό-ανάλυση ουσιών.

Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης

Μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες για την εκτέλεση των πειραμάτων είναι η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης. Υγρή-υγρή εκχύλιση ονομάζεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός υγρού μίγματος όταν αναμιχθεί σε έναν διαλύτη στο οποίο ένα η και περισσότερα συστατικά του μίγματος είναι εκλεκτικά διαλυτό. Ανάμειξη δυο υγρών φάσεων με ανάδευση αποτελεί μια βασική λειτουργία σε όλη τη διεργασία της εκχύλισης.

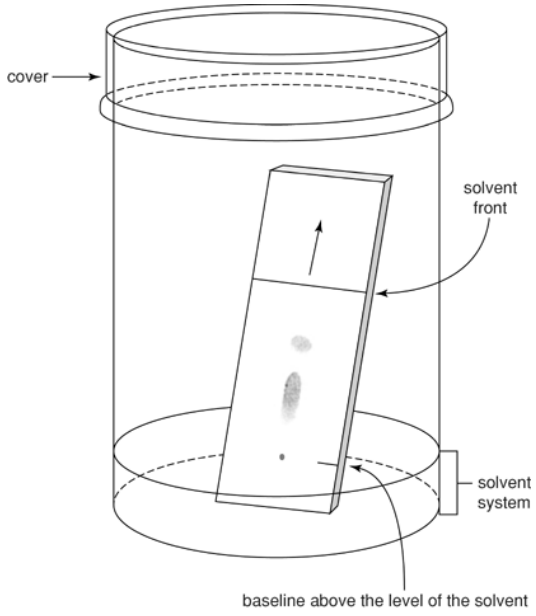
Στην λειτουργία της εκχύλισης είναι απαραίτητα τρία στάδια της επαφής του διαχωρισμού και της ανάκτησης διαλύτη. Αυτά μπορούν να εκτελεστούν είτε με συνεχείς είτε με ασυνεχείς λειτουργίες. Στην ασυνεχή λειτουργία που πραγματοποιείται στα πλαίσια αυτής της μελέτης ο διαλύτης και το διάλυμα αναμιγνύονται και μετά αφήνοντα να διαχωριστούν σε δυο φάσεις ένα εκχύλισμα που περιέχει την επιθυμητή διαλύτη ουσία στον διαλύτη που προστίθεται και ένα άλλο εκχύλισμα υπόλειμμα που είναι το πιο φτωχό διάλυμα και περιέχει λίγο διαλύτη. Τέλος σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στις διαφορές στη διαλυτότητα.

3.4.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ 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 υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη 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 10min 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 10-20min, 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.

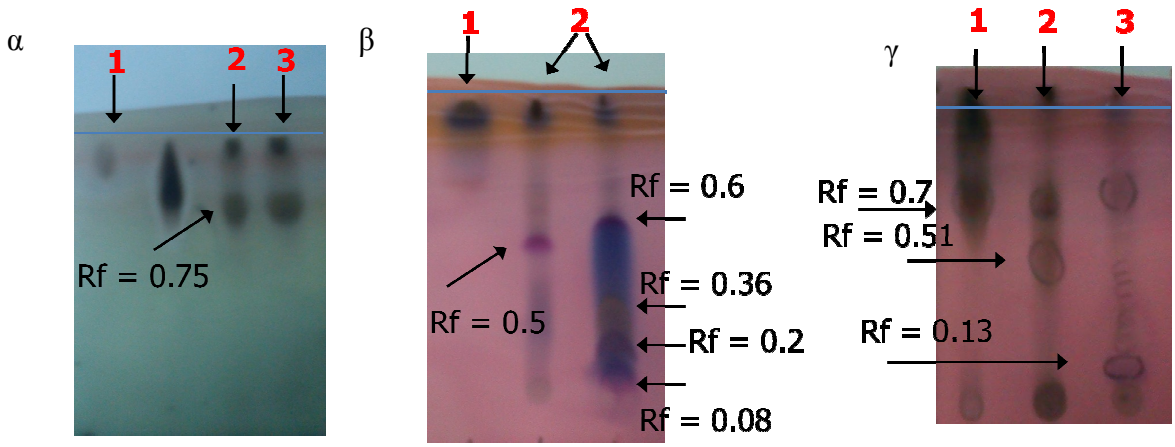
Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. 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 παρατηρείταο (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ) [64].



Εικόνα 6: Πειραματική διάταξη της χρωματογραφικής λεπτής στοιβάδας

Η επιβεβαίωση της ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο εκχύλισμα, γίνεται την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας για τα ραμνολιπίδια, τα σοφορολιπίδια και τα τρεχαλολιπίδια.

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



Σχήμα 2: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τα α) ραμνολιπίδια, β) σοφορολιπίδια, και γ) τρεχαλολιπίδια.

Στην περίπτωση των ραμνολιπιδίων, στην τιμή Rf=0,75 αντιστοιχεί σε γνωστό ραμνολιπίδιο, που συναντάται στην βιβλιογραφία [65].

Για τα ραμνολιπίδια η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας εκτελείται 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, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο anthrone (63 ml H_2SO_4, 25 ml H_2O, 0,125 g anthrone). Για τα σοφορολιπίδια η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιεί σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:15:2, v:v:v), ενώ η εμφάνιση των συγκεκριμένων ενώσεων (μοβ κηλίδα) πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο p-Anisalehyde (H_2O 100 ml, H_2SO_4 2 ml και p-Anisaldehyde 1 ml). Για τα τρεχαλολιπίδια η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιεί σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:15:2, v:v:v), ενώ η εμφάνιση των συγκεκριμένων ενώσεων (πράσινη κηλίδα) πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο p-Anisalehyde (H_2O 100 ml, H_2SO_4 2 ml και p-Anisaldehyde 1 ml) [66],[67],[68].

3.4.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.

3.4.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

- Ραμνολιπίδια

Αρχικά από κάθε φλάσκα λαμβάνονται 25 ml θρεπτικού μέσου. Γίνεται ανάδευση με το χέρι ώστε να είναι ομογενές το δείγμα και κάτω από τον απαγωγέα γίνεται μεταφορά σε ειδική φιάλη για να φυγοκεντρηθεί. Για την απομόνωση των ραμνολιπιδίων γίνεται απομάκρυνση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο υγρό ρυθμίζεται το pH στο 3 με υδροχλωρικό οξύ (HCl). Έπειτα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη που ακολουθείται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate).

Η εκχύλιση γίνεται τρεις φορές με ίσου όγκου αιθυλεστέρα όσο και το αρχικό δείγμα μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύτη. Σε κάθε επανάληψη μεταφέρεται η κάτω στιβάδα για περαιτέρω εκχύλιση ενώ η άνω στιβάδα σε σφαιρικές φιάλες για παραπάνω επεξεργασία. Στο εκχύλισμα που συλλέγεται από τις άνω στοιβάδες προστίθεται Na_2SO_4 (0.5gr/100ml) για την δέσμευση ενδεχόμενης υγρασίας, ενώ

ακολουθεί φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman, πορώδους 11 μm. Ο διαλύτης του εκχυλίσματος εξατμίζεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator, BUCHI).

Στην συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε vials με τη βοήθεια αιθυλεστέρα και ξηραίνεται σε θερμαινόμενη πλάκα κάτω από ρεύμα αζώτου. Το εκχύλισμα ραμνολιπιδίων που συλλέγεται ζυγίζεται και φυλάσσεται.

3.4.5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

- Σοφορολιπίδια

Η εκχύλιση σοφορολιπιδίων διεξάγεται με παρόμοιο τρόπο όπως τα ραμνολιπίδια αλλά χωρίς την απομάκρυνση των κυττάρων της βιομάζας. Για την απομόνωση των σοφορολιπιδίων γίνεται χρήση ολόκληρου του υδατικού διαλύματος (25ml). Η εκχύλιση γίνεται τρεις φορές με ίσου όγκου οξικού αιθυλεστέρα όσο και το αρχικό δείγμα μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύτη.

Η ανάμιξη τους γίνεται με έντονη ανάδευση και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε δυο φάσεις. Σε κάθε επανάληψη μεταφέρεται η κάτω στιβάδα για περαιτέρω εκχύλιση ενώ η άνω στιβάδα σε σφαιρικές φιάλες για παραπάνω επεξεργασία. Στα εκχυλίσματα που συλλέγονται προστίθετο αλάτι, όπως και στα ραμνολιπίδια, για την συγκράτηση της υγρασίας, φιλτράρισμα και τέλος εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Στην συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε vials με τη βοήθεια αιθυλεστέρα και ξηραίνεται σε θερμαινόμενη πλάκα κάτω από ρεύμα αζώτου. Το εκχύλισμα σοφορολιπιδίων που συλλέγεται ζυγίζεται και φυλάσσεται.

3.4.5.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΕΧΑΛΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

- Τρεχαλολιπίδια

Η εκχύλιση της εκάστοτε καλλιέργειας για την απομόνωση των τρεχαλολιπιδίων γίνεται με χρήση ολόκληρου του υδατικού διαλύματος. Το δείγμα εκχυλίζεται τρεις φορές με ίσους όγκους χλωροφορμίου: μεθανόλης (2:1, ν/ν). Η ανάμιξη τους γίνεται με έντονη ανάδευση και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε δυο

φάσεις. Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται συλλογή του κάτω στρώματος και η άνω στιβάδα εκχυλίζεται ακόμα δυο φορές μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύτη

Στο καθαρό εκχύλισμα προστίθετο αλάτι, όπως και στα ραμνολιπίδια, για την συγκράτηση της υγρασίας, στη συνέχεια φιλτράρισμα και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στην συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε vials με τη βοήθεια χλωροφορμίου: μεθανόλης(2:1, ν/ν) και ξηραίνεται σε θερμαινόμενη πλάκα κάτω από ρεύμα αζώτου. Το εκχύλισμα σοφορολιπιδίων ζυγίζεται και φυλάσσεται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

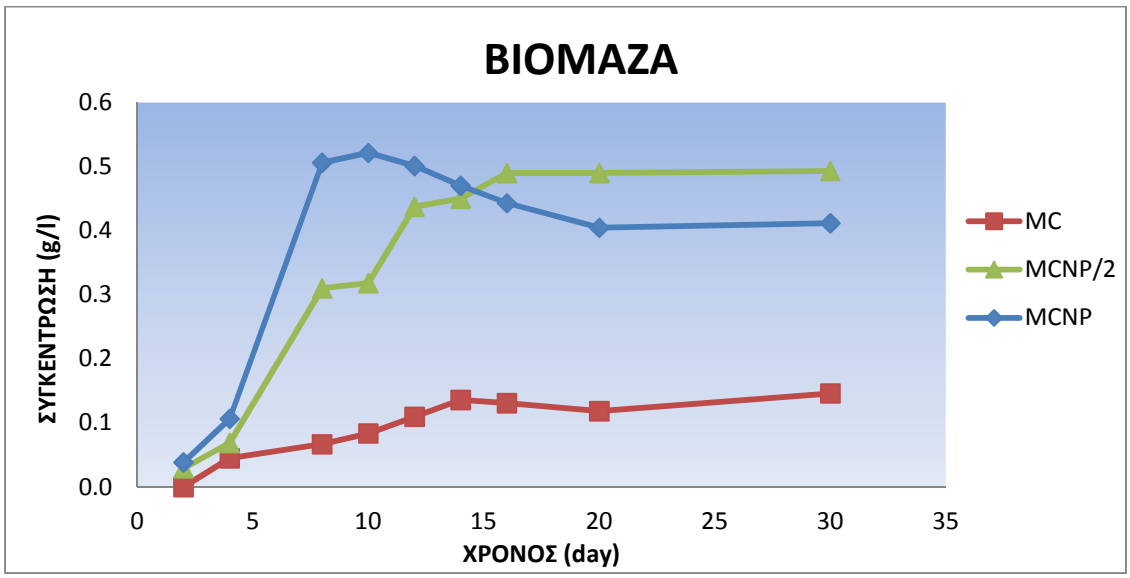
Οι υγρές καλλιέργειες παρασκευάζονται κάτω από τις συνθήκες και περιέχοντας τα θρεπτικά, που περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Συνθήκες καλλιεργειών

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ	ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ N-P	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ
20°C	Αργό πετρέλαιο Μελάσα (0.5% w/v)	-	0-30 ΜΕΡΕΣ
		N-P	
		(N-P)/2	

4.1.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Στον Πίνακα 6 – Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιομάζας για τις πειραματικές συνθήκες:



Διάγραμμα 4: Παραγωγή βιομάζας συναρτήσει του χρόνου.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας μέχρι την δέκατη τέταρτη μέρα του πειράματος και στη συνέχεια παραμένει σταθερή.

Πίνακας 6:Μετρήσεις βιομάζας

BIOMAZA (g/l)			
ΜΕΡΕΣ	**MC**	**MCNP/2**	**MCNP**
2	0.00	0.0292	0.0384
4	0.0448	0.0688	0.1064
8	0.0668	0.31	0.506
10	0.0836	0.318	0.5212
12	0.1096	0.4376	0.5008
14	0.136	0.45	0.47
16	0.1308	0.49	0.4428
20	0.1184	0.49	0.4044
30	0.1416	0.4932	0.4116

4.1.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Ένα πείραμα έξι επαναλήψεων γίνεται προκειμένου να υπολογιστεί το πειραματικό σφάλμα κατά την παραγωγή λιπιδίων.

Πίνακας 7: Μετρήσεις σοφορολιπιδίων για επαναληψιμότητα.

	ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΔΙΑ-MCNP/2-8η ΜΕΡΑ					
ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	1	2	3	4	5	6
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/l)	0.2044	0.7008	0.5912	0.3984	0.6668	0.4568

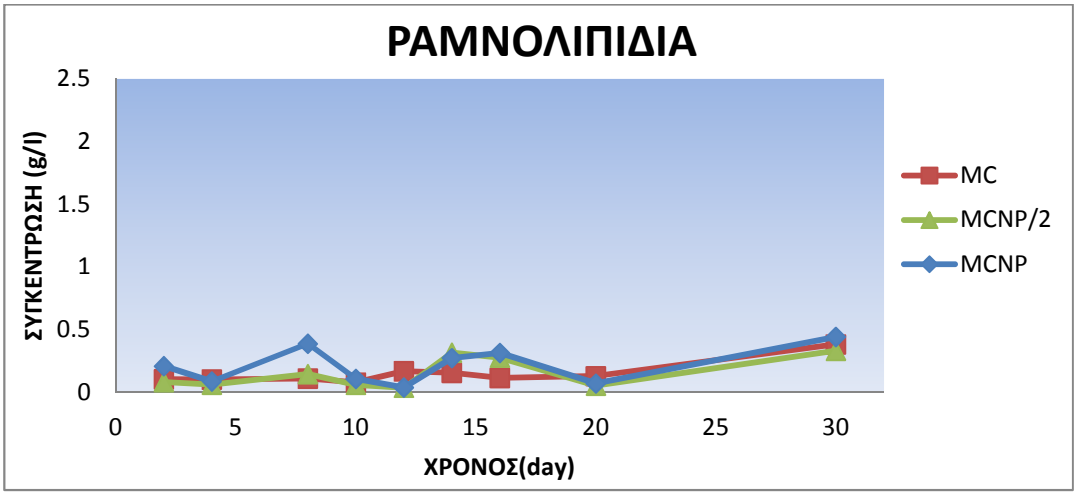


Διάγραμμα 5: Έξι επαναλήψεις παραγωγής σοφορολιπιδίων κατά την έκτη μέρα.

Ο μέσος όρος $\bar{X}$=0.5 , η τυπική απόκλιση σ=0,19 και το τυπικό σφάλμα $\sigma_\chi = \frac{\sigma}{\sqrt{\nu}} = 0.077$, όπου ν=πλήθος επαναλήψεων, των μετρήσεων, υπολογίζονται. Το ποσοστιαίο σφάλμα υπολογίζεται με βάση την εξίσωση $\frac{\sigma_{\bar{X}}}{\bar{X}}$=15%. Για να περιληφθεί το 95% του σφάλματος χρησιμοποιείται ο τύπος $E = z * \frac{\sigma}{\sqrt{\nu}}$ όπου z=1.96. Άρα το σφάλμα ανέρχεται στο 30%. Το ποσοστό αυτό θα χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

4.1.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Στον Πίνακα 8 – Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ραμνολιπιδίων για τις πειραματικές συνθήκες:



Διάγραμμα 6: Παραγωγή ραμνολιπίδια συναρτήσει του χρόνου.

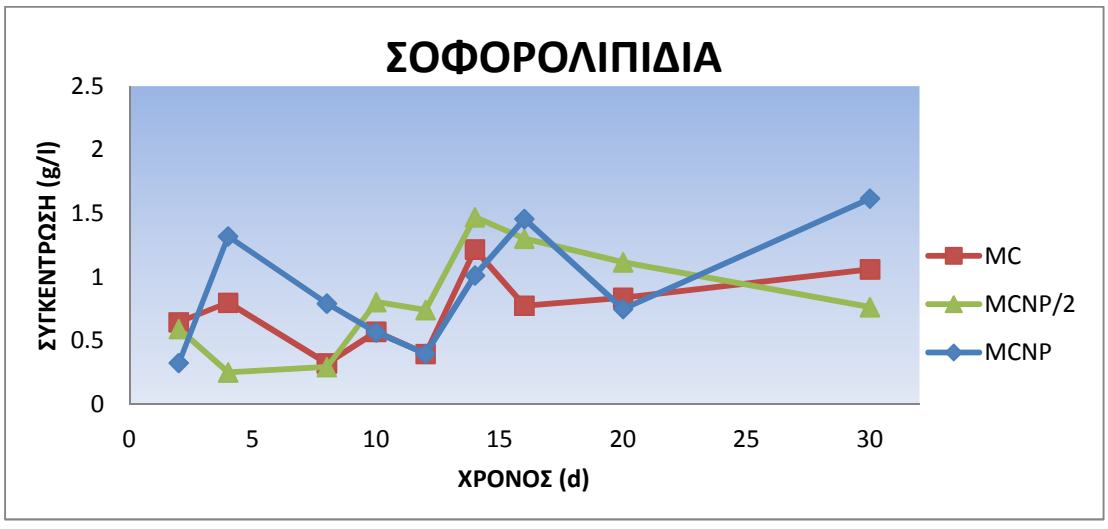
Σε όλες τις μετρήσεις των ραμνολιπιδίων παρουσιάζεται χαμηλή και σταθερή συγκέντρωση.

Πίνακας 8: Μετρήσεις ραμνολιπιδίων.

ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΑ (g/l)			
ΜΕΡΕΣ	**MC**	**MCNP/2**	**MCNP**
2	0.1048	0.0828	0.2092
4	0.1036	0.0624	0.0884
8	0.1104	0.1464	0.388
10	0.0792	0.0604	0.108
12	0.1688	0.0376	0.0392
14	0.1572	0.3172	0.2748
16	0.116	0.2776	0.3152
20	0.13	0.054	0.0712
30	0.3826	0.332	0.4428

4.1.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Στον Πίνακα 9-Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των σοφορολιπιδίων για τις πειραματικές συνθήκες:



Διάγραμμα 7: Παραγωγή σοφορολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου.

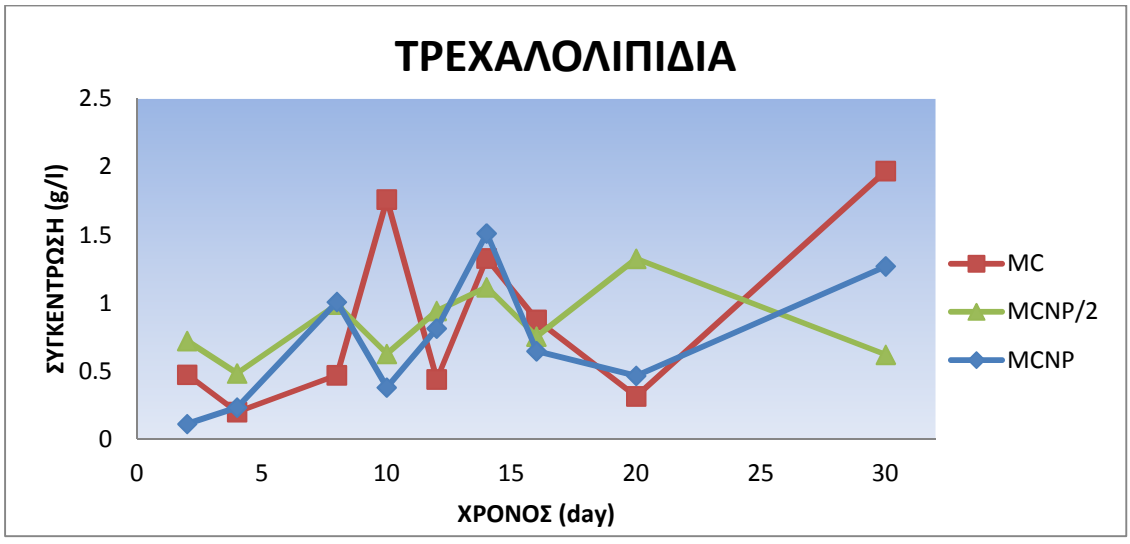
Η συγκέντρωση των σοφορολιπιδίων παραμένει χαμηλή και σταθερή με το χρόνο.

Πίνακας 9: Μετρήσεις σοφορολιπιδίων.

ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΑ (g/l)			
ΜΕΡΕΣ	**MC**	**MCNP/2**	**MCNP**
2	0.6456	0.5924	0.3256
4	0.7988	0.2516	1.3208
8	0.322	0.2932	0.792
10	0.5708	0.804	0.5664
12	0.3964	0.7424	0.3968
14	1.218	1.4716	1.0128
16	0.7756	1.3024	1.468
20	0.8376	1.1164	0.75
30	1.0614	0.7648	1.618

4.1.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΕΧΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Στον Πίνακα 10 -Διάγραμμα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τρεχαλολιπιδίων για τις πειραματικές συνθήκες:



Διάγραμμα 8: Παραγωγή τρεχαλολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου.

Η συγκέντρωση των τρεχαλολιπιδίων παραμένει σταθερή στη διάρκεια των ημερών ανεξαρτήτως θρεπτικών.

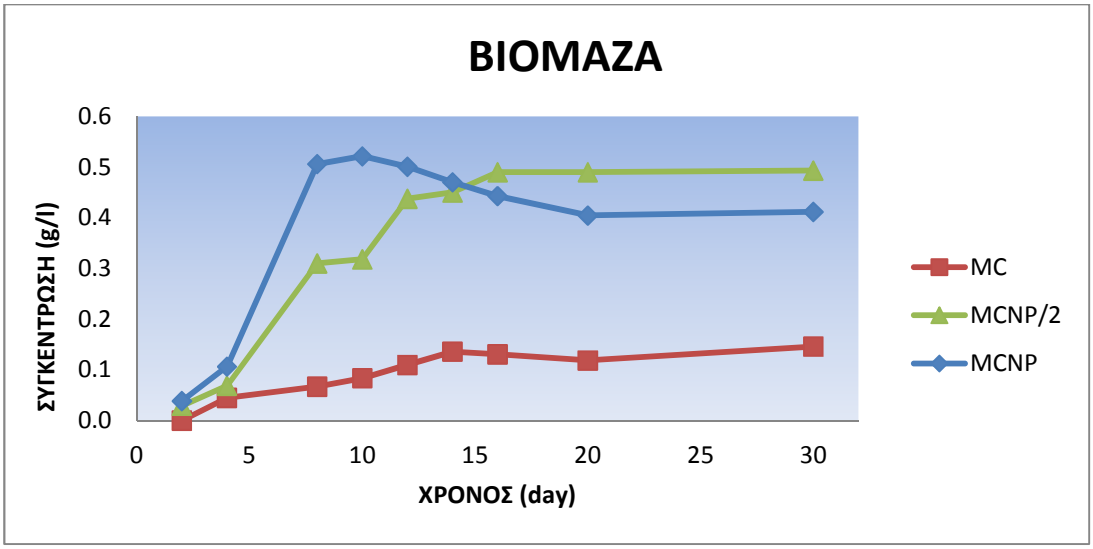
Πίνακας 10: Μετρήσεις τρεχαλολιπιδίων.

ΤΡΕΧΑΛΟΛΙΠΙΔΙΑ g/l			
ΜΕΡΕΣ	**MC**	**MCNP/2**	**MCNP**
2	0.4748	0.722	0.1128
4	0.2012	0.4844	0.2336
8	0.4704	0.9904	1.0084
10	1.7616	0.6276	0.3804
12	0.44	0.9432	0.8144
14	1.3284	1.1168	1.5116
16	0.8772	0.756	0.6468
20	0.316	1.3264	0.4664
30	1.9696	0.6218	1.2704

4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΒΙΟΜΑΖΑ

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις στις διαφορές περιπτώσεις θρεπτικών παρατηρείται αύξηση της βιομάζας της τάξης του 60% κατά την προσθήκη αζώτου-φωσφόρου.



Διάγραμμα 4: Παραγωγή βιομάζας συναρτήσει του χρόνου.

Οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων παρατηρείται ότι παραμένουν σταθερές. Το συμπέρασμα αυτό φαίνεται και από το ποσοστιαίο πειραματικό σφάλμα που υπολογίζεται, καθώς και από το R^2 της γραμμικής παλινδρόμησης που είναι μικρό. Σε όλα τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται το ποσοστιαίο σφάλμα, η γραμμή τάσης και η μέση τιμή της συγκέντρωσης των λιπιδίων.

ΡΑΜΝΟΛΙΠΙΔΙΑ

Η συγκέντρωση των ραμνολιπιδίων σε όλες τις περιπτώσεις των Διαγραμμάτων 9 παραμένει χαμηλή της τάξης (0.1-0.2 g/l) και σταθερή ανεξάρτητα της χρήσης θρεπτικών και του χρόνου. Η αύξηση της βιομάζας δεν φαίνεται να επηρεάζει την συγκέντρωση των ραμνολιπιδίων.

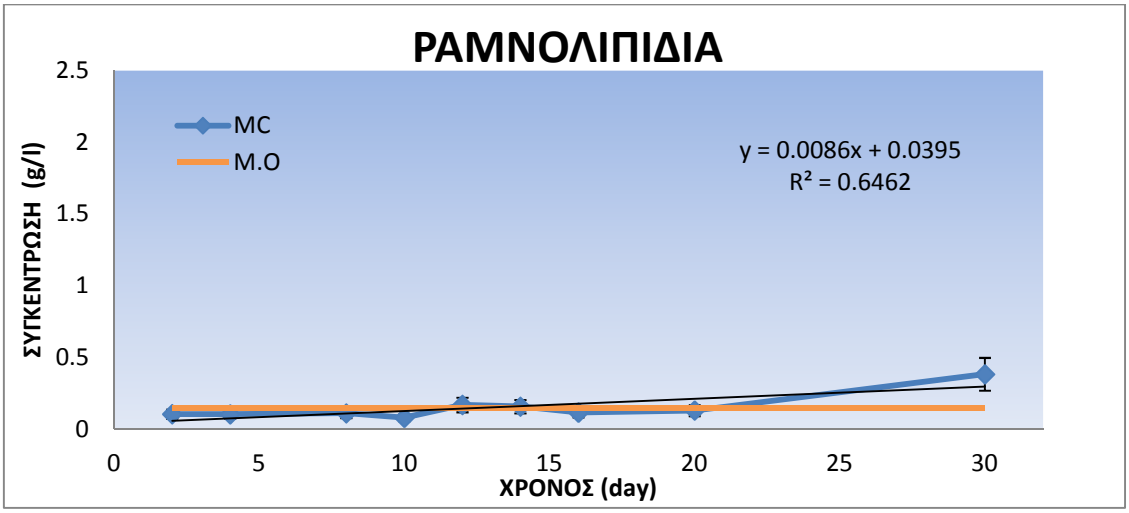
ΣΟΦΟΡΟΛΙΠΙΔΙΑ

Η συγκέντρωση των σοφορολιπιδίων παρατηρώντας το διάγραμμα 10 είναι της τάξης (0.6-0.8 g/l) δηλαδή πενταπλασιάστηκε περίπου η παράγωγη σε σχέση με τα ραμνολιπίδια. Οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερές και δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τη χρήση των θρεπτικών ούτε από το χρόνο.

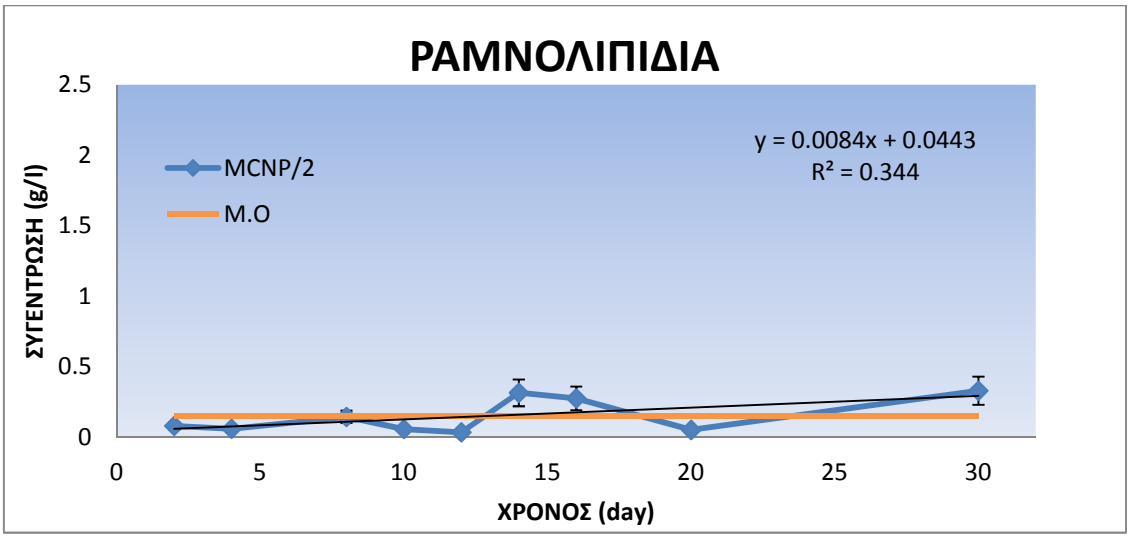
ΤΡΕΧΑΛΟΛΙΠΙΔΙΑ

Στα τρεχαλολιπίδια η συγκέντρωση (βλέπε Διάγραμμα 11) είναι της τάξης του (0.65-0.9 g/l) ίδια περίπου με τα σοφορολιπίδια και πέντε φορές πάνω από τα ραμνολιπίδια. Οι ποσότητες των συγκεντρώσεων παραμένουν και εδώ σταθερές ανεξαρτήτως της χρήσης θρεπτικών ή του χρόνου.

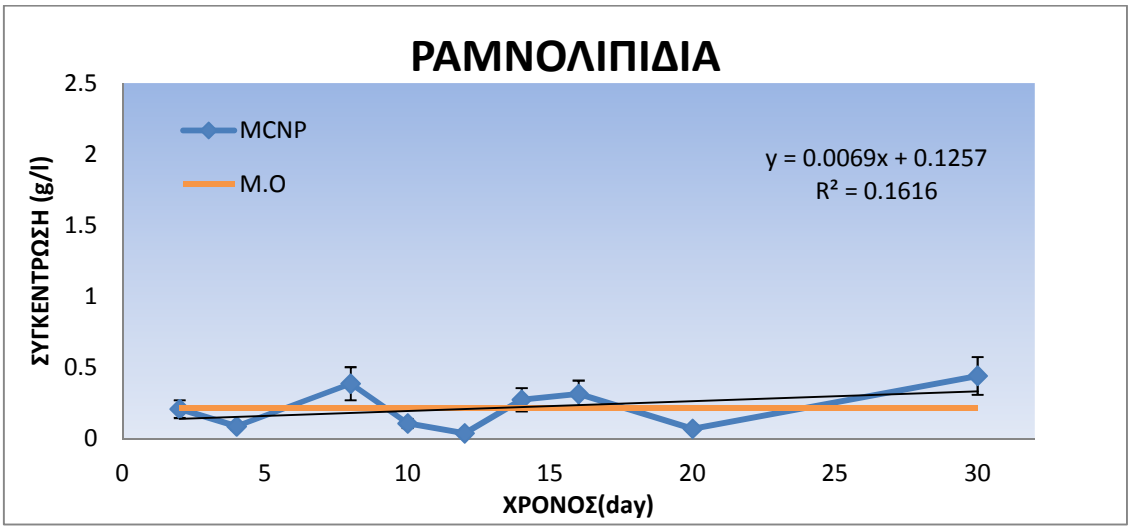
α



β

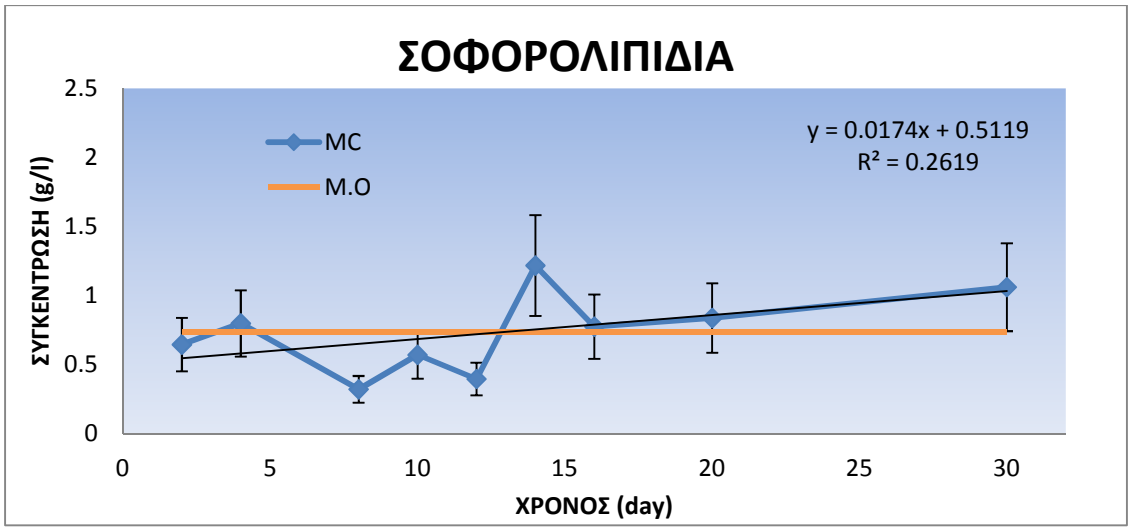


γ

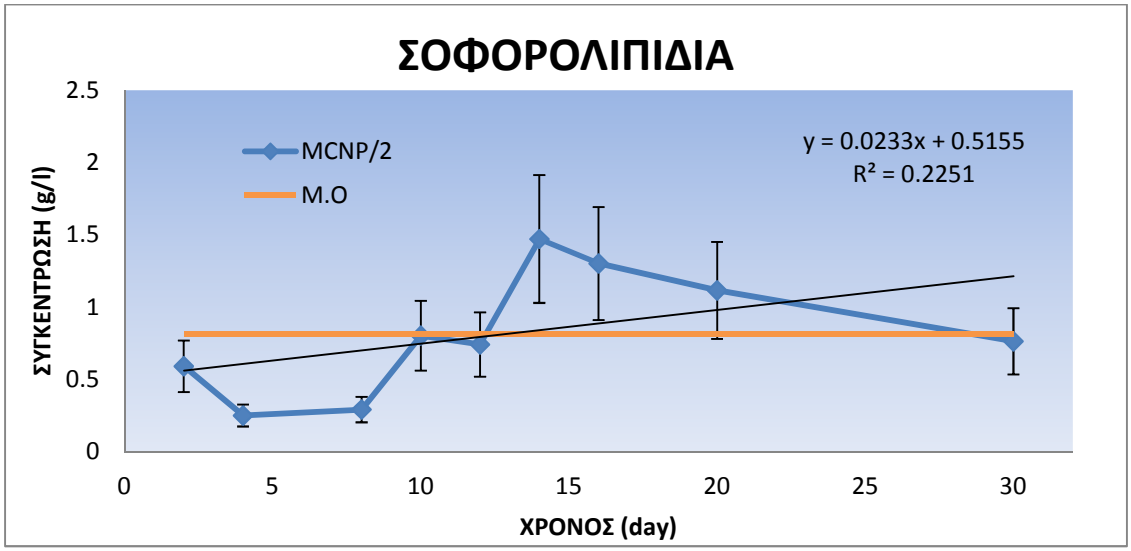


Διάγραμμα 9: Παραγωγή ραμνολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου. α)MC, β)MCNP/2, γ)MCNP. (M.O μέσος όρος)

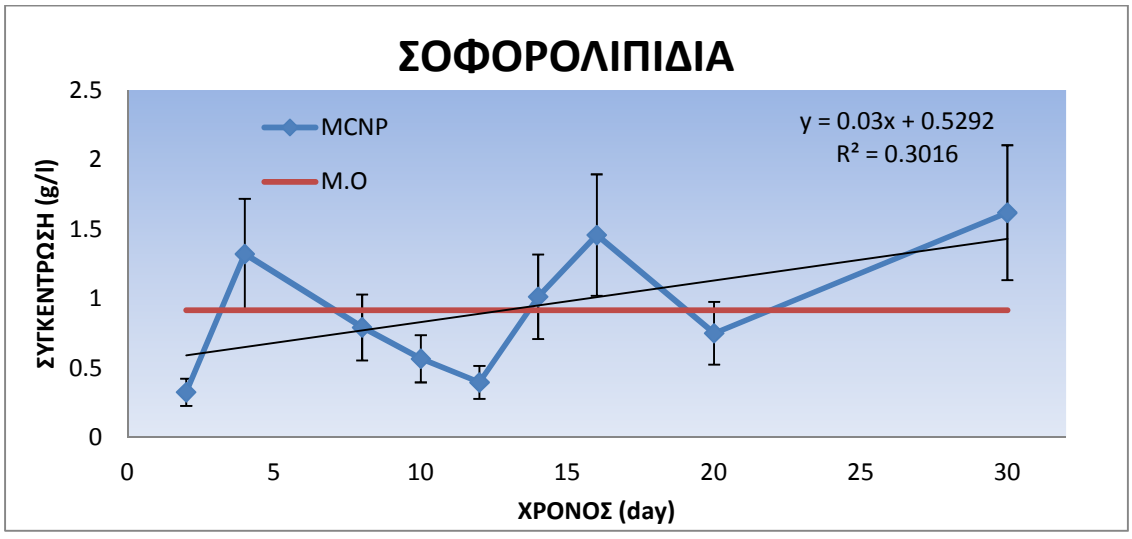
α



β

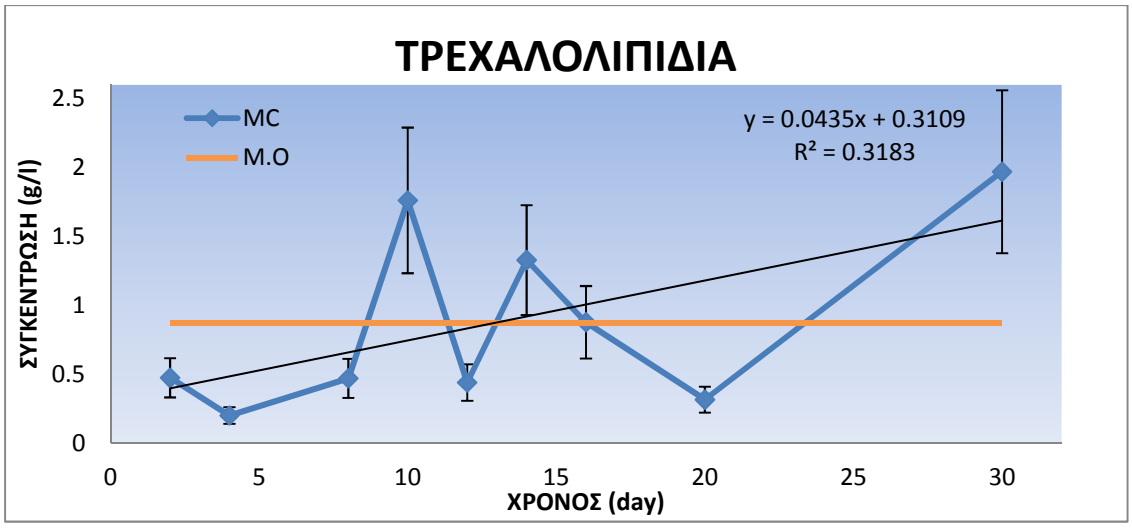


γ

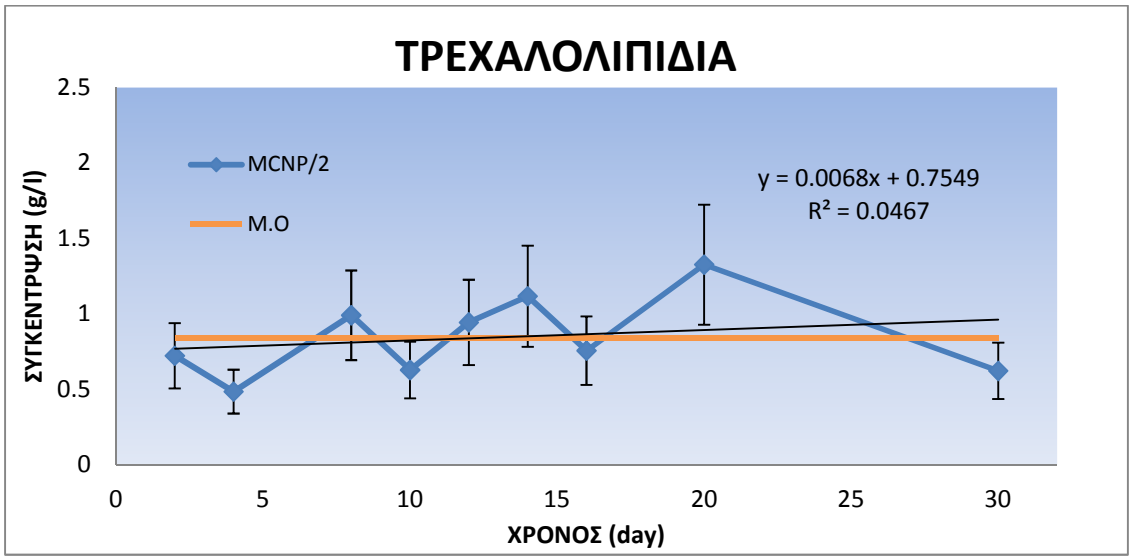


Διάγραμμα 9: Παραγωγή σοφορολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου. α)MC, β)MCNP/2, γ)MCNP.(M.O μέσος όρος)

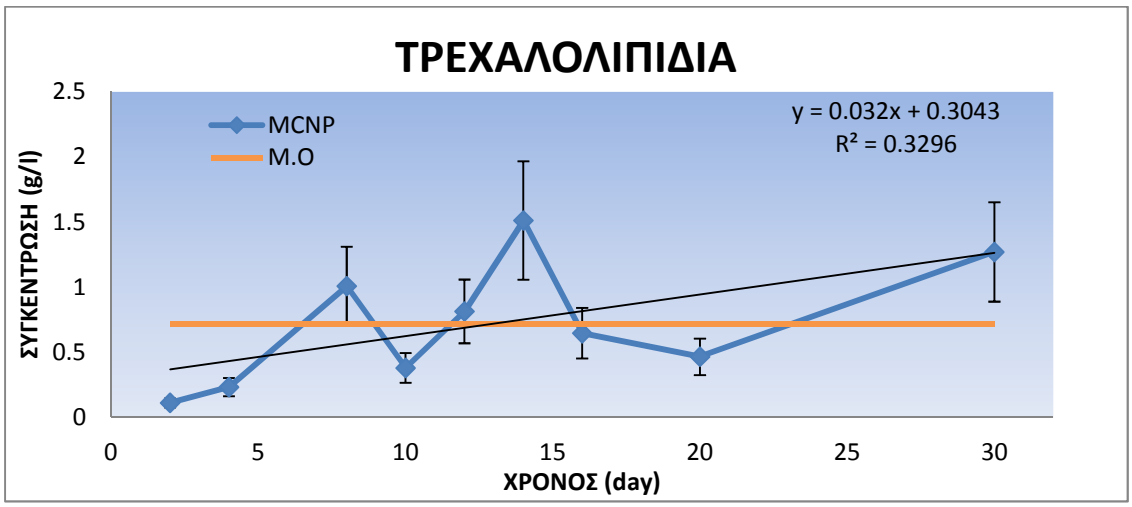
α



β



γ



Διάγραμμα 10: Παραγωγή τρεχαλολιπιδίων συναρτήσει του χρόνου. α)MC, β)MCNP/2, γ)MCNP.(M.O μέσος όρος)

Επεξεργάζοντας τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η βιομάζα με την προσθήκη αζώτου φωσφόρου τριπλασιάζεται χωρίς να αυξάνεται αντίστοιχά η συγκέντρωση των λιπιδίων η οποία φαίνεται να παραμένει σταθερή. Πράγμα το οποίο δεν ισχύει διότι τα λιπίδια κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης καταναλώνονται και αναπληρώνονται με τον ίδιο ρυθμό. Οι μικροοργανισμοί καθώς καταναλώνουν υδρογονάνθρακες, οι οποίοι είναι διαλυτοποιημένοι με τη χρήση των λιπιδίων, καταναλίσκουν και τα προσκολλημένα λιπίδια. Άρα, ενώ η συγκέντρωση τους μέσα στη καλλιέργεια παραμένει σταθερή, στην πραγματικότητα, η παράγωγη λιπιδίων είναι αυξημένη, και ανάλογη με τον ρυθμό αύξησης της βιομάζας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη μελέτη της παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα πετρέλαιο-μελάσα, με ή χωρίς θρεπτικά και προσθήκη θαλάσσιων μικροοργανισμών, απομονωμένων από ρυπασμένο με πετρελαιοειδή θαλασσινό νερό, καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

1. Σχετικά με την παραγωγή βιομάζας παρατηρείται:

I. Η βιομάζα στη καλλιέργεια χωρίς την χρήση αζώτου – φωσφόρου παρουσιάζει μικρή αύξηση στις 30 ημέρες. (τελική συγκέντρωση 0.1 g/l)
II. Η βιομάζα στις καλλιέργειες με την παρουσία θρεπτικών περίπου τετραπλασιάζεται σε σχέση με αυτές χωρίς θρεπτικά της τάξης (0.4-0.5 g/l).

2. Σχετικά με την παραγωγή βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών παρατηρείται:

I. Η συγκέντρωση των ραμνολιπιδίων παραμένει χαμηλή της τάξης (0.1-0.2 g/l) με ή χωρίς τη χρήση θρεπτικών και ανεξάρτητη με το χρόνο.
II. Η συγκέντρωση των σοφορολιπιδίων παραμένει χαμηλή και σταθερή συναρτήσει του χρόνου της τάξης (0.6-0.8 g/l) και ανεξάρτητη από τη χρήση θρεπτικών. Η συγκέντρωση των σοφορολιπιδίων πενταπλασιάζεται σε σχέση με τα ραμνολιπιδία.
III. Η συγκέντρωση των τρεχαλολιπιδίων παραμένει χαμηλή της τάξης (0.65-0.9 g/l) και σταθερή συναρτήσει του χρόνου και ανεξάρτητη από τη χρήση θρεπτικών. Η συγκέντρωση των τρεχαλολιπιδίων τετραπλασιάστηκε σε σχέση με τα ραμνολιπιδία και ήταν αντίστοιχη με τα σοφορολιπίδια.
IV. Η συγκέντρωση των λιπιδίων μέσα στη καλλιέργεια παραμένει σταθερή αλλά η παράγωγη των λιπιδίων είναι αυξημένη και ανάλογη με τον ρυθμό αύξησης της βιομάζας, διότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνοντας υδρογονάνθρακες, οι οποίοι είναι διαλυτοποιημένοι με τη χρήση των λιπιδίων, καταναλίσκουν και τα προσκολλημένα λιπίδια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μπινιάρης, Σ (2004). *Το περιβάλλον- Ρύπανση και προστασία.* Αθήνα.
2. Ghose, A.K.; Crippen, G.M. J (1987). Chem. Znf: Comput. Sci**.** 27**,** 21-35.
3. http://www.aqualex.org/elearning/marine_environment/greek/chap2/chap2-2.html. Last accessed 12 May 2012.
4. National Academy of Sciences (1985). *Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects, National Academy Press, Washington DC.*
5. Γράψας, (2008) Βιομηχανική ανάπτυξη και Περιβάλλον, Σημειώσεις, Πειραιάς.
6. NOAA (1992). *Shoreline Countermeasure Manual, National Oceanic & Atmospheric Administration, Seattle, Washington.*
7. NOAA and API (1994*). Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response, National Oceanic & Atmospheric Administration and American Petroleum Institute.*
8. U.S. EPA (1999a). Understanding oil spills and oil spill response, EPA 540-K-99-007, *Office of Emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency.*
9. Doerffer, J.W. (1992). *Oil Spill Response in the Marine Environment, Pergamon Press, Oxford, U.K.*
10. Office of Technology Assessment (1990). *Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies, OTA-BP-O-63, Washington, DC.*
11. Prince, R. C., Clark, J.R., Lindstrom, J.E., Butler, E.L., Brown, E.J., Winter, G., Grossman, M.J., Parrish, P.R., Bare, R.E., Braddock, J.F., Steinhauer, W.G., Douglas, G.S., Kennedy, J.M., Barter, P.J., Bragg, J.R., Harner, E.J., and Atlas, R. M. (1994). *Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: monitoring safety and efficacy. In: R.E. Hinchee et al.(Eds.), Hydrocarbon Bioremediation. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp107-124.*
12. Office of Technology Assessment (1991). *Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies, OTA-BP-O-70, Washington, DC.*
13. Atlas, R. M. (1984). *Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York.*
14. Atlas, R.M. (1981). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. Microbiol. Rev. 45, 180-209.*
15. Swannell, R.P.J., Lee, K., and Mcdonagh, M. (1996). *Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiological Reviews, 60(2), 342-365.*

16. Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L, King, D.W., and Holder, E.(1996*). Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. Environmental Science and Technology, 30, 1764-1775.*

17. Atlas, R. M., and Cerniglia, C. E. (1995*). Bioremediation of Petroleum Pollutants. Bioscience, 45, 332-338.*

18. Katsivela, E.; Moore, E.R.B.; Kalogerakis, N (2003**)**. Water Air Soil Poll. 3, 103–115.

19. h ttp://news.discovery.com/tech/tech-used-clean-up-oil-spill.html. Last access 2 june 2013

20. http://www.itopf.com/spill-response/clean-up-and-response/dispersants/. Last access 2 june 2013

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

22. Diaz, L.F.; Munoz, R; Burdel, S.; Villaverde, S (2008*). Biodegradation 19, 197-208.*

23. http://www.google.gr/imgres?hl=el&client=firefox-a&hs=CTr&sa=X&rls=org.mozilla:en-US:official&biw=1366&bih=580&tbm=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 25 June 2013.

24. Diaz, E.; Ferrandez, A.; Prieto, M.A., Garcia, J.L (2001). Microbiol. Mol. Biol.R., 65, 523-569.

25. Maki, H.; Sasaki, T; Harayama, S (2001). *Chemosphere* 44, 1145-1151.

26. Kasai, Y.; Kishira, H.; Harayama, S (2002). *Appl. Environ. Microb.* 68, 5625-5633.

27. Nikolopoulou, M.; Kalogerakis, N (2009). *J. Chem. Technol. Biot.* 84, 802-807.

28. Liu, Q.; Zhang, Y.; Zhao, D.; Zhao, C (2012). *Adv. Mater.* 518-523, 2073-2078.

29. Amellal, N.; Portal, J.M.; Vogel, T.; Berthelin, J (2001). Biodegradation 12, 49-57.

30. Cerniglia, C.E (1992). *Biodegradation* 3, 351-368.

31. Nikolopoulou, M.; Kalogerakis, N (2008). *Marine Pollut. Bull.* 56, 1855-1861.

32. Alvarez, V.M.; Dos Santos, S.C.C.; Casella R.; Vital, R.L.; Sebastin, G.V.; Seldin. L (2008). *J. Microbiol. Biotechn.* 18, 1966-1974.

33. Pandya, M.T (2007). Water Sci. Techol. 56, 117-124.

34. Atagana, H.I (2004). World J. Microb. Biot. 20, 851-858.

35. Dibble, J.T.; Bartha R (1979),. *Soil Sci.* 127, 365-370.

36. Leys, N.M.; Ryngaert, A.; Bastiaens, L.; Top, E.M.; Verstraete, W.; Springael, D (2005). Microbial Ecol. 49, 443-450.

37. Scow, K.M.; Hicks, K.A (2005). *Curr. Opin. Biotech., 16, 246-253.*

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

39. Jordan, R.E. and Payne, J.R. (1980). Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, MI.

40. Karrick, N.L. (1977*). Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. In Malins (Ed) Effects of Petroleum on Arctic and Subartic Environments and Organisms Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum. Academic Press, Inc., New York, 225-299.*

41. Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990). *Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. Microbial Reviews, 53(3), 305-315.*

42. Foght, J.M. and Westlake, D.W.S. (1987). *Biodegradation of hydrocarbons in freshwater. In: Vandermeulen and Hrudey (Ed), Oil in Freshwater: Chemistry.*

43. Floodgate, G (1984). *The fate of petroleum in marine ecosystems. In Atlas (Ed), Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Company, New York, 355-398.*

44. Bossert, I. And Bartha, R. (1984). *The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas (Ed), Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Company, New York, 435-476. Biology, Countermeasure Technology. Pergamon Press, New York, 217-230.*

45. Head, I.M. and Swannell, R.P.J. (1999). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Current Opinion in Biotechnology, 10, 234-239.*

46. Rosenberg, E. and Ron, E.Z (1996). *Bioremediation of petroleum contamination, In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), Bioremediation: principles and Applications, Cambridge University Press, UK, 100-124.*

47. Dibble, J.T., and Bartha, R. (1979). *Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol., 37, 729-739.*

48. Bento, F.M.; Englert, G.E.; Gaylarde, C.C.; Muller, I.L (2004). Mater. Corros. 55, 577-585.

49. Mulligan, C.N (2005). *Environ. Pollut.***,** *133, 183-198.*

50. Koch, A.K.; Kappeli, O.; Fiechter, A.; Reiser, J (1991), *J. Bacteriol.* 173, 4212-4219.

51. Volkering, F.; Breure, A.M.; Rulkens, W.H (1997). *Biodegradation*, 8, 401-417.

52. Moran, A.C.; Olivera, N.; Commendatore, M.; Esteves, J.L.; Sineriz, F (2000). *Biodegradation*, 11, 65-71.

53. Rosenberg,M (2006). *Fems Microb. Lett.* 262, 129-134.

54. Thaniyavarn, J.; Roongsawang, N.; Kameyama, T.; Haruki, M.; Imanaka, T.; Morikawa, M.; Kanaya, S(2003). *Biosc. Biotech. Bioch.*, 67, 1239-1244.

55. Allen, D.K.; Tao, B.Y *J.* (1999). *Surfactactants Deterg.*, 2, 383-390.

56. Kelecom, A (2002). *An. Acad. Bras. Cienc.*, 74, 151-170.

57. Harvey S, Elashvilli I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty AM (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology* 8: 228-230

58. Shafeeq M, Kokub D, Khalid ZM, Khan AM, Malik KA (1989). *Degradation of different hydrocarbon and production of biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa isolated from coastal waters. J Appl Microbiol Biotechnol 5: 505-510*

59. Van Dyke MI, Couture P, Brauer M, Lee H, Trevors JT (1993a). P. *aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants. Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can J Microbiol 39: 1071-1080*

60. Atlas, R.M. and Bartha, R. (1973). *Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. Environmental Science and Technology, 7, 538-541.*

61. M. N. AL-Hadhrami, H. M. Lappin-Scott and P. J. Fisher (1996). *"Effects of the Addition of Organic Carbon Sources on Bacterial Respiration and n-Alkane Biodegradation of Omani Crude Oil". Marine Pollution Bulletin, Vol. 32, No. 4, 351-357.*

62. Jiménez, N.; Vinas, M.; Sabate, J.; Diez, S ; Bayona, J.M.; Solanas, A.M.; Albaiges, J (2006). *Environ. Sci. Technol.* 40, 2578-2585.

63. Κορκακάκη, Ε. Καλογεράκης, Ν (2012) master thesis. *Απομόνωση μικροβιακών κοινοτήτων που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή και παραγούν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. 35-36.*

64. 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%B

9%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 2013.

65. Pereira, D.S.T.; Sylva, A.L.S; Lopez, A.M.Q (2010). *ACTA Sci. Tech.* 32, 33-36.
66. Najafi, A.R.; Rahimpour, M.R.; Jahanmiri, A.H.; Roostaazad, R.; Arabian, D.; Ghobadi, Z. *Chem. Eng. J*(2010). 163, 188-194.
67. Takahashi, M.; Morita, T.; Wada, K.; Hirose, N.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. J (2011). *Oleo Sci.* 60, 267-273
68. Asmer, A.J.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V. *J* (1998),. *Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1460-1465.