

Διπλωματική Εργασία

**Αποδόμηση πετρελαιοειδών σε
αντιδραστήρα υψηλής πίεσης με
θαλάσσιους πιεζοφιλικούς
μικροοργανισμούς**



Ευγενία Οικονομοπούλου

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΚΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ),
ΚΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΣΑΔΑΚΗΣ,
ΔΡ. ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

Χανιά, Οκτώβριος 2016

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί ερευνητικό κομμάτι για την εξέταση της βιοεξυγίανσης πετρελαιοειδών σε θαλάσσιο περιβάλλον από μικροοργανισμούς. Στόχος της έρευνας αυτής ήταν η παρακολούθηση της αποδόμησης των συστατικών του πετρελαίου σε συνθήκες υψηλής πίεσης από θαλάσσιους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς. Διερευνάται, πώς το πετρελαϊκό πλούμιο που δημιουργείται σε περιπτώσεις υποθαλάσσιας διαφυγής πετρελαίου και συνεχίζει να μετακινείται στα ίδια βάθη μπορεί να αποδομηθεί σταδιακά από τους μικροοργανισμούς,. Πιο συγκεκριμένα, προσομοιώθηκαν πειραματικά σε αντιδραστήρα υψηλής πίεσης οι συνθήκες που επικρατούν σε μεγάλα θαλάσσια βάθη (>1000m). Μελετήθηκε η βιοδιάσπαση πετρελαίου από αυτόχθονες σε συνδυασμό με πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς υπό πίεση καθώς και η επίδραση θρεπτικών συστατικών, σε διάλυμα θαλασσινού νερού. Η υψηλή πίεση στον αντιδραστήρα εφαρμόστηκε με την παροχή πεπιεσμένου μίγματος αέρα και αζώτου και διατηρήθηκε στο επίπεδο των 100bar. Η ποσοτικοποίηση των υδρογονανθράκων έγινε με την τεχνική αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (GC/MS). Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων των μικροοργανισμών έγινε με τη μέθοδο χρώσης του DNA των κυττάρων με πορτοκαλί ακριδίνη (Acridine Orange). Παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά βιοαποδόμησης των υδρογονανθράκων του πετρελαίου τόσο σε συνθήκες ατμοσφαιρικής όσο και υψηλής πίεσης με χρήση της συγκεκριμένης πιεζοφιλικής μικροβιακής κοινότητας. Επίσης, ποσοτικοποιήθηκε ο ρυθμός διαλυτοποίησης του πετρελαίου στην υδατική φάση.

Ευχαριστίες

Με το πέρας της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου. Αρχικά, στον κ. Νικόλαο Καλογεράκη, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και καθηγητή μου, για την επιλογή του θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο και την ουσιαστική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια. Επίσης, την Δρ. Ελευθερία Αντωνίου για την εξαιρετική συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια στο εργαστήριο, αλλά και για την υπομονή που έδειξε όλο αυτό το διάστημα. Τον κ. Νικόλαο Πασαδάκη, καθηγητή της σχολής των Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, για την παροχή του αέριου χρωματογράφου στο εργαστήριο του και ό,τι επιπλέον βοήθεια χρειαστήκαμε και μας την προσέφερε. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για την βοήθεια που παρείχαν και την άψογη συνεργασία τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, που μέσα σε αυτά τα 5 χρόνια με στήριξαν, πνευματικά και υλικά και μου έδωσαν τα εφόδια να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και να επιτύχω τους στόχους μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Ευχαριστίες.....	2
Περιεχόμενα	3
Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό υπόβαθρο - εισαγωγή.....	5
1.1. Το πετρέλαιο.....	5
1.2. Ρύπανση από πετρελαιοειδή.....	7
1.3. Περιβαλλοντικές συνέπειες ρύπανσης από το πετρέλαιο.....	12
1.4. Η πορεία του πετρελαίου στο περιβάλλον	14
1.5. Τεχνικές απορρύπανσης	17
1.5.1. Φυσικές μέθοδοι.....	17
1.5.2. Μη Χημικές μέθοδοι	17
1.5.3. Χημικές μέθοδοι.....	18
1.6. Βιοεξυγίανση.....	19
Κεφάλαιο 2 Πειραματικό μέρος.....	23
2.1. Περιγραφή εξοπλισμού και πειραματικού σχεδιασμού.....	23
2.2. Υλικά και πειραματική διαδικασία.....	26
2.2.1. Εκχύλιση υγρού σε υγρό (Liquid to liquid Extraction)	26
2.2.2. Εκχύλιση Στερεής Φάσης - Κλασματοποίηση πετρελαίου (Solid phase extraction)	27
2.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων για την ανάλυση με GCMS	30
2.3. Αναλύσεις μικροβιολογικών δειγμάτων.....	33
2.3.1. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων υγρής φάσης.....	33
2.3.2. Εφαρμογή βαφής Acridine Orange σε δείγμα μικροοργανισμών.....	34
2.4. Προκαταρκτικά πειράματα.....	35
2.4.1. Πειράματα σε ατμοσφαιρική πίεση	37
2.4.2. Πειράματα σε υψηλή πίεση	39
2.5. Κύρια πειράματα υψηλής πίεσης.....	39
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα	42
3.1. Αποτελέσματα πειραμάτων	42
3.2. Πειράματα σε ατμοσφαιρική πίεση	43
3.2.1. Crude oil	43
3.2.2. Diesel Oil.....	44
3.3. Πειράματα σε υψηλή πίεση	47
3.3.1. Diesel Oil.....	47
3.3.2. Crude Oil	48

3.4. Ενδεικτικά αποτελέσματα εφαρμογής της βαφής <i>Acridine orange</i> στα κύτταρα των μικροοργανισμών και των επωάσεων των δειγμάτων σε τρυβλία	52
Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα και συζήτηση.....	54
4.1. Τελικά συμπεράσματα.....	54
4.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	55
Κεφάλαιο 5 Βιβλιογραφία	56
Κεφάλαιο 6 Παράρτημα	58
6.1. Χρωματογραφήματα.....	58
6.1.1. Crude Oil F1	58
6.1.2. Crude Oil F2.....	58
6.1.3. Crude Oil σε ατμοσφαιρική πίεση.....	59
6.1.4. Diesel Oil σε ατμοσφαιρική πίεση (ημέρα 14).....	59
6.1.5. Diesel Free.....	60
6.1.6. Diesel oil σε υψηλή πίεση (ημέρα 19).....	60
6.1.7. Crude oil σε υψηλή πίεση με αυτόχθονες και πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς (ημέρα 21) .	61
6.1.8. Crude oil σε υψηλή πίεση με πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και θρεπτικά (ημέρα 21).....	61
.....	61

Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό υπόβαθρο - εισαγωγή

1.1. Το πετρέλαιο

Το **πετρέλαιο** (από τα ελληνικά *πέτρα* και *έλαιο*, λατινικά *petroleum*), είναι ένα παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα, που αποτελεί και τη σπουδαιότερη σήμερα φυσική πηγή ενέργειας. Η ονομασία αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό Ορυκτολόγο Agricola, το 1556. Η πρώτη μνεία χρησιμοποίησης του γίνεται στη Βίβλο, όπου αναφέρεται ότι ο Νώε πραγματοποίησε επάλειψη της Κιβωτού, πριν από τον κατακλυσμό με κάποιο υλικό ασφατικής σύστασης. Από τους αρχαίους Έλληνες, που ήξεραν καλά τις πολλές χρήσεις του, μέχρι τους Σουμέριους, τους Ασσύριους και τους Βαβυλώνιους, ως τους Άραβες και τους Πέρσες, καθώς και στο 'υγρό πυρ' των Βυζαντινών. Η χρήση του πετρελαίου ήταν διαδεδομένη στο καλαφάτισμα των πλοίων, στην κατασκευή δρόμων, στην κατασκευή αδιάβροχης ψάθας και καλαθιών και ως συγκολλητικό στα μωσαϊκά. Επίσης το χρησιμοποιούσαν στην ιατρική σαν καθαρτικό, σαν υγρό εντριβών και σαν απολυμαντικό. Στην νεότερη ιστορία, η πρώτη γεώτρηση ειδικά για την αναζήτηση πετρελαίου έγινε από τον Έντγουιν Ντρέικ στην δυτική Πενσυλβάνια τον Αύγουστο του 1859 και σε βάθος 21 μέτρων. Την ίδια περίπου περίοδο πετρελαϊκά πεδία ανακαλύφθηκαν στην Ευρώπη και την Απω Ανατολή. Με την αρχή του 20ου αιώνα και την Βιομηχανική Επανάσταση να εξελίσσεται, η πετρελαϊκή βιομηχανία έγινε η πρώτη πηγή ενέργειας στον κόσμο^[1].

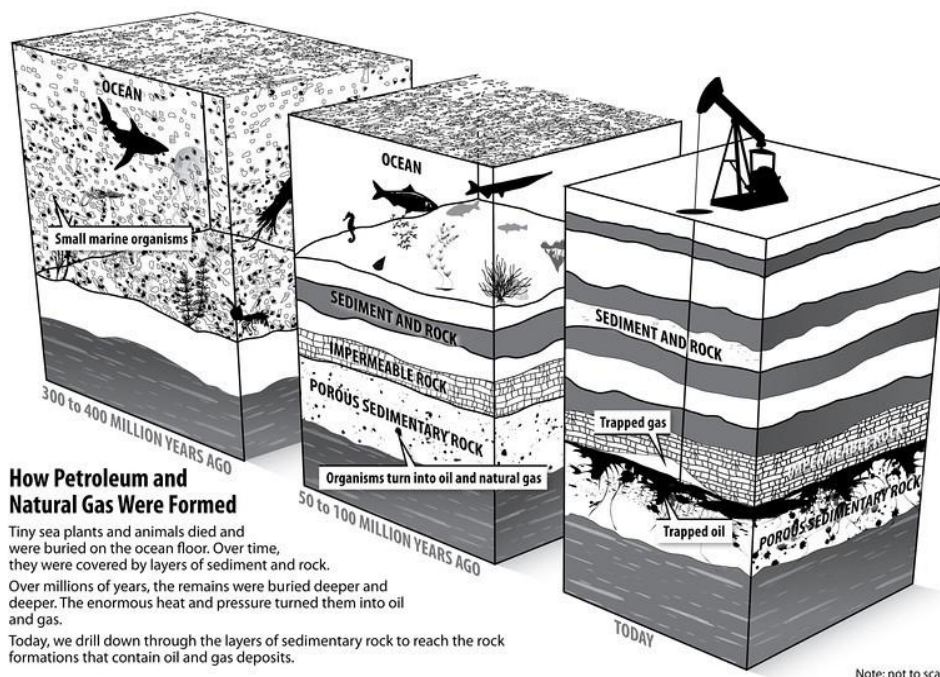
Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο είναι υγρό πέτρωμα, μείγμα υδρογονανθράκων, δηλαδή ουσιών που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο, κατά ένα μεγάλο μέρος της σειράς των αλκανίων, που όμως περιέχει και αρκετούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, καθώς και άλλες οργανικές ενώσεις και το οποίο βρίσκεται μέσα σε πορώδη πετρώματα στα ανώτερα στρώματα μερικών περιοχών τού φλοιού της Γης. Σε μικρές συγκεντρώσεις περιλαμβάνονται μη υδρογονανθρακικές θειούχες ενώσεις και αζωτούχες ενώσεις, που είναι γενικά ανεπιθύμητες κατά την επεξεργασία, ως διαβρωτικές για τον εξοπλισμό, δηλητηριώδεις για τους καταλύτες και συμβάλλουσες στην ατμοσφαιρική ρύπανση από τον σχηματισμό διοξειδίου και τριοξειδίου του θείου και οξειδίων του αζώτου αντίστοιχα, όταν καίγονται.

Για την ερμηνεία της δημιουργίας του πετρελαίου υπάρχουν πολλές και αλληλοσυγκρουόμενες θεωρίες. Παλαιότερα παραδέχονταν οι χημικοί και γεωλόγοι ερευνητές του αντικειμένου ότι το πετρέλαιο σχηματίστηκε από ανόργανες πρώτες ύλες, θεωρία, η οποία σήμερα έχει τελείως

εγκαταλειφθεί. Η δεύτερη θεωρία, που είναι και γενικότερα παραδεκτή, ανάγει την δημιουργία του πετρελαίου σε φυτικές και ζωικές πρώτες ύλες.

Ο γεωλόγος Ποτονιέ ξεκίνησε να δέχεται πως το πετρέλαιο είναι προϊόν αποσύνθεσης ζωικών και φυτικών οργανισμών που εγκλωβίστηκαν μέσα στα πετρώματα σε μεγάλο βάθος στη Γη. Οπαδοί αυτού δέχονται επίσης πως οι εν λόγω οργανισμοί ήταν κυρίως θαλάσσιοι, ανάλογοι με εκείνους που αποτελούν το πλαγκτόν. Τα λείψανα αυτών των οργανισμών παρασύρθηκαν από θαλάσσια ρεύματα και ανέμους και συγκεντρώθηκαν κατά μεγάλες ποσότητες στους πυθμένες θαλασσιών λεκανών. Οι λεκάνες αυτές στη συνέχεια από διάφορες αναστατώσεις της επιφάνειας της Γης αποκλείστηκαν και καταχώθηκαν. Έτσι, εκ του εγκλωβισμένου αυτού οργανικού υλικού προέκυψε με την διαδικασία της αποσύνθεσης, υπό την επίδραση υψηλών πιέσεων και θερμοκρασιών σε αναερόβιες συνθήκες, το πετρέλαιο.

Η θεωρία αυτή βασίστηκε επίσης στο γεγονός ότι στα διάφορα πετρέλαια βρέθηκαν επίσης ίχνη χλωροφύλλης και αίμης. Η ύπαρξη των ενώσεων αυτών αποδεικνύει αφενός τη φυτική και ζωική προέλευση, αφετέρου ότι η δημιουργία αυτή έγινε κάτω από ήπια βιολογική δράση, δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές αποσυντίθενται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 250 °C. Η θεωρία αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο και από το γεγονός ότι τα πετρέλαια σήμερα εντοπίζονται πάντα σε τυπικά ιζηματογενή πετρώματα, ενώ στη βάση των πετρελαϊκών κοιτασμάτων ανευρίσκεται, σχεδόν πάντα, αλμυρό νερό ^[1].



Εικόνα 1: Η δημιουργία του πετρελαίου μέσα στο πέρασμα των χρόνων, πηγή: offshoreengineering.com

1.2. Ρύπανση από πετρελαιοειδή

Τη νύχτα της 24ης Μαρτίου 1989, όταν το τάνκερ *Exxon Valdez* προσέκρουσε στον ύφαλο Bligh των παρθένων νερών της Αλάσκας το πετρέλαιο άρχισε να χύνεται στη θάλασσα σχηματίζοντας μια πετρελαιοκηλίδα που έμελλε να φτάσει στα 42 εκατ. λίτρα και να απλωθεί σε μια επιφάνεια του ωκεανού εμβαδού 28.000km², ρυπαίνοντας ταυτόχρονα και 2.100km ακτογραμμής. Εκατοντάδες χιλιάδες πουλιά, ψάρια, φώκιες και άλλα θαλάσσια ζώα πέθαναν ως αποτέλεσμα των δολοφονικών συνεπειών της πετρελαιοκηλίδας, παρά την άμεση κινητοποίηση 11.000 ανθρώπων και 1.000 σκαφών για τον καθαρισμό της^[2]. Μια τεράστια οικολογική καταστροφή σε ένα μέρος παρθένο, ταυτόχρονα με οικονομικές και κοινωνικές συνέπειες, τόσο στην αλιεία όσο και στις συνθήκες ζωής και διαβίωσης των κατοίκων της περιοχής. Για την άμεση αντιμετώπιση της καταστροφής, επιφανειοδραστικές ουσίες, μίγμα διαλυτών και χημικές ουσίες διασποράς εφαρμόστηκαν στην πετρελαιοκηλίδα. Μια ιδιωτική εταιρεία εφάρμοσε τα μέσα διασποράς από αέρος με τη βοήθεια



Εικόνα 2: Οι ισχυροί άνεμοι στο Prince William, οδηγούν το αργό πετρέλαιο στην ακτή του νησιού Squire στις 10 Απριλίου 1989, πηγή: The Guardian

ελικοπτέρου. Επειδή όμως οι καιρικές συνθήκες δεν βοηθούσαν και δεν υπήρχε αρκετή δράση των κυμάτων για την ανάμιξη του διασκορπιστικού υλικού με το πετρέλαιο στο νερό, η χρήση του μέσου διασποράς διακόπηκε. Επίσης, υπήρξε διαφωνία από την τοπική κοινωνία για την χρήση χημικών ουσιών, οι οποίες δεν ήταν πλήρως εξακριβωμένες για την τοξικότητά τους. Δύο μέρες μετά την διαρροή, καταιγίδα και δυνατοί άνεμοι ταχύτητας 80km/h, μετέφεραν μεγάλο μέρος του πετρελαίου στις ακτές των νησιών της περιοχής. Εφαρμόστηκαν

και μηχανικοί μέθοδοι καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας, όπως τα πλωτά φράγματα,

ενώ χρησιμοποιήθηκε πίεση ζεστού νερού για τον καθαρισμό των ακτών, το οποίο αργότερα έγινε κρύο, καθώς η χρήση του ζεστού νερού αποδείχθηκε επιβλαβής για τους μικροοργανισμούς^[3]. Τελικά, επιλέχθηκαν ουσίες τύπου λιπάσματος (fertilizers), οι οποίες περιέχουν θρεπτικά συστατικά, όπως άζωτο και φώσφορο και βοηθούν τις μικροβιακές κοινότητες να αναπτυχθούν και να αποδομήσουν με μεγαλύτερο ρυθμό το πετρέλαιο. Από το 1989 έως το 1991, εφαρμόστηκαν συνολικά 48.600kg αζώτου, αντιπροσωπεύοντας έτσι τη μεγαλύτερη χρήση της βιοεξυγίανσης που έγινε ποτέ. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το Μάιο και Ιούνιο του 1992, έδειξε ότι μεγάλο

ποσοστό του πετρελαίου είχε απομακρυνθεί από τις ακτές, με την Ακτοφυλακή των ΗΠΑ και την πολιτεία της Αλάσκας να δηλώνουν επίσημα ότι ο καθαρισμός ολοκληρώθηκε. Βέβαια, ακόμα ένα ποσοστό πετρελαίου ακόμη δεν έχει καθαρίσει και υπολογίζεται ότι θα παραμείνει για αρκετό καιρό στις περιοχές που έχουν ρυπανθεί. Από το ατύχημα αυτό, αποκτήθηκε μεγάλη επιστημονική εμπειρία, η οποία μπορεί πλέον να εφαρμοστεί και σε άλλες πετρελαιοκηλίδες ^[3].



Εικόνα 3: Ένα μωρό και πέντε ενήλικες θαλάσσιες ενυδρίδες, καλυμμένες με πετρέλαιο βρίσκονται νεκρές στην ακτή του Green Island στις 3 Απριλίου 1989, πηγή: The Guardian

Έως το 2010, η πετρελαιοκηλίδα του Exxon Valdez θεωρούνταν ως η μεγαλύτερη περιβαλλοντική καταστροφή που δημιούργησε ποτέ ο άνθρωπος σε ολόκληρη την αμερικανική ιστορία, με το ατύχημα της BP Deepwater Horizon στον κόλπο του Μεξικού πλέον να την ξεπερνά, ως προς την ποσότητα του πετρελαίου που διέρρευσε στο περιβάλλον.

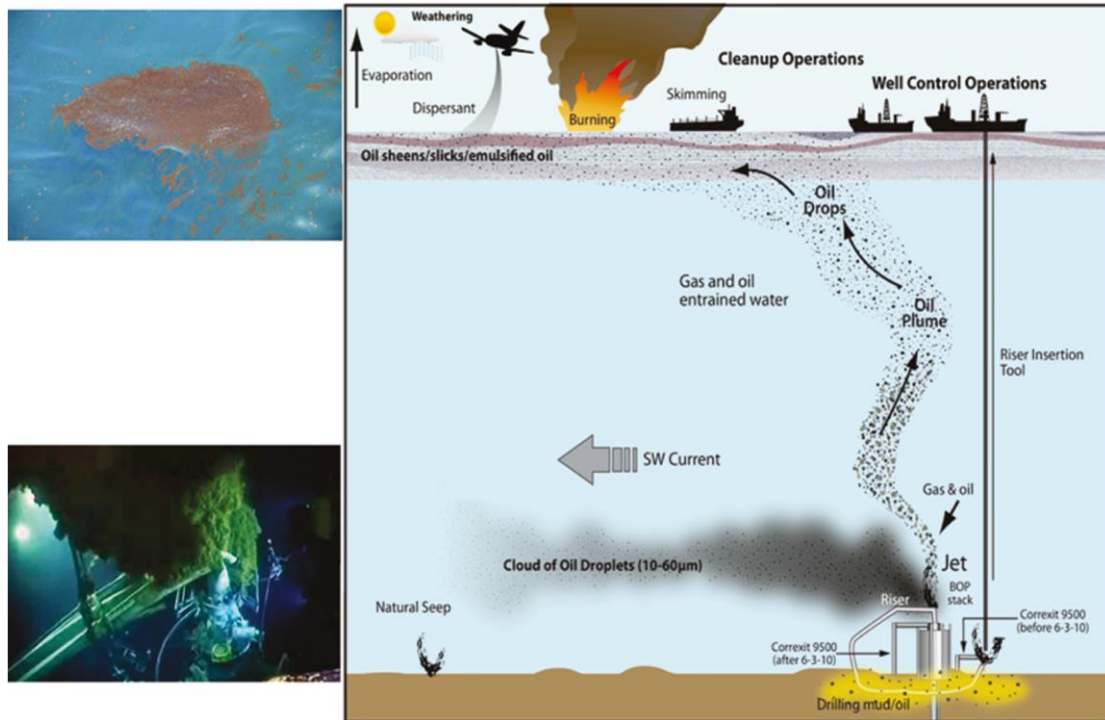
Την 20^η Απριλίου το 2010, έκρηξη από διαρροή μεθανίου προκλήθηκε στην εξέδρα εξόρυξης πετρελαίου της BP, με αποτέλεσμα 3 ημέρες μετά την βύθιση της στη θάλασσα, η διαρροή του πετρελαίου να φτάσει συνολικά τα 779 εκατ. λίτρα από την υποθαλάσσια γεώτρηση, έως και τον Ιούλιο του ίδιου έτους, όπου και καλύφθηκε σταματώντας τη διαρροή. Η διαρροή από το βάθος των 1500m είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη δημιουργία πετρελαϊκού πλουμίου, αλλά και την ταυτόχρονη του εξάπλωση στην επιφάνεια της θάλασσας. Επακολούθησε μαζική ανταπόκριση για την προστασία των παραλίων, των υγρότοπων και των εκβολών χρησιμοποιώντας πλωτά φράγματα, πλοία περισυλλογής, ελεγχόμενες καύσεις και εφαρμογή συνολικής ποσότητας 7 εκατ. λίτρων περίπου του διασκορπιστικού υλικού COREXIT 9500A. Η εφαρμογή του έγινε κατευθείαν στην κεφαλή του φρεατίου, αλλά και στην επιφάνεια της θάλασσας από αέρος ^[3]. Η ουσία αυτή είναι ειδικά σχεδιασμένη για την διασπορά του πετρελαίου στο νερό, ώστε να το κάνει πιο διαλυτό και πιο εύκολα αποδομήσιμο από τους μικροοργανισμούς. Έρευνες όμως έχουν δείξει ότι το COREXIT 9500A είναι τοξικό για την θαλάσσια ζωή και συγκεκριμένα για το μικροζωοπλανκτόν και τα κοράλλια. Ο συνδυασμός όμως, του crude oil με το Corexit αυξάνει ακόμα περισσότερο την τοξικότητα ^{[4], [5]}. Ωστόσο, δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα η τοξικότητα στις μικροβιακές κοινότητες, καθώς δεν υπάρχουν έρευνες που να αποδεικνύουν ούτε την αναστολή, αλλά ούτε και την ενίσχυση της βιοαποικοδομητικής τους ικανότητας (λόγω της διαλυτοποίησης που προσφέρουν

τα μέσα διασποράς). Για τον προσδιορισμό τοξικών επιδράσεων σε βακτηριακούς πληθυσμούς, ως αποτέλεσμα της χρήσης των μέσων διασποράς, θα πρέπει να εξεταστεί ο μηχανισμός μεταφοράς για την πρόσληψη του πετρελαίου από συγκεκριμένο μικροβιακό είδος. Οι μηχανισμοί μεταφοράς του πετρελαίου περιλαμβάνουν την πρόσληψη από την διαλυμένη φάση ή μέσω ενός μηχανισμού άμεσης επαφής. Η προσθήκη των μέσων διασποράς μπορεί να μεταβάλει τη συγκέντρωση των υδρογονανθράκων στη διαλυμένη φάση και να παρέμβει στους μηχανισμούς προσκόλλησης μεταξύ των βακτηρίων και των σταγονιδίων του πετρελαίου ^[6].

Καταλήγοντας, οι περιβαλλοντικές, και όχι μόνο, συνέπειες από το ατύχημα της BP ήταν και παραμένουν τεράστιες. Από το θαλάσσιο οικοσύστημα, με ό,τι αυτό περιλαμβάνει, τις γενετικές μεταλλάξεις εξαιτίας της εφαρμογής των χημικών διασκορπιστικών και την είσοδο τους στην τροφική αλυσίδα, μέχρι τις ακτές και την παράκτια χλωρίδα και πανίδα^[7]. Δηλαδή, ο κόλπος του Μεξικού, με τους υδροβιότοπους, τα νησιά και τους κοραλλιογενείς υφάλους φιλοξενεί περίπου 15.000 μοναδικά είδη έμβιας ζωής, τα οποία είναι άμεσα θύματα της καταστροφής αυτής ^[8]. Επίσης, έχασαν τη ζωή τους 11 εργαζόμενοι, πιθανότατα κατά την έκρηξη. Τέλος, είχε και κοινωνικοοικονομικό αντίκτυπο, δημιουργώντας τεράστια ανεργία λόγω αναστολής της υποθαλάσσιας εξόρυξης, η οποία είναι καταλυτική για την τοπική κοινωνία, αλλά και καταστροφής της αλιείας ^[9].

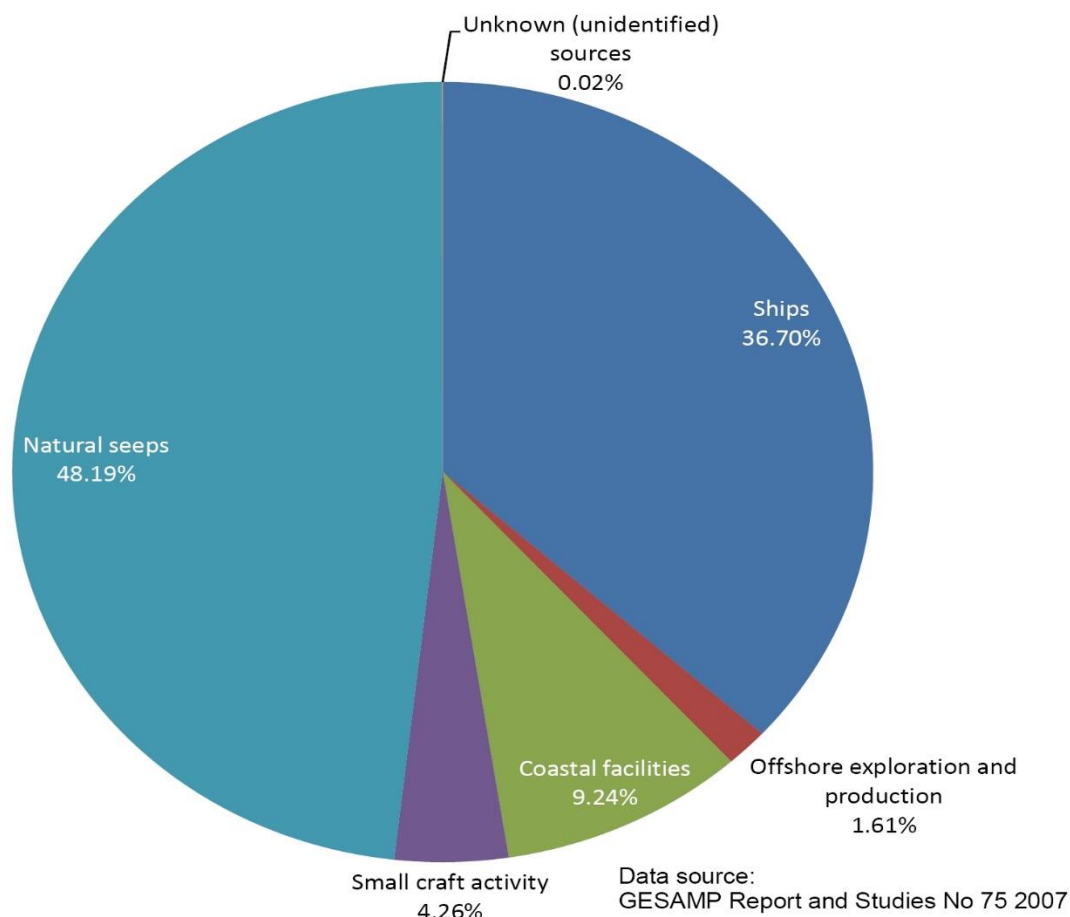


Εικόνα 4: Δορυφορική εικόνα της πετρελαιοκηλίδας στον κόλπο του Μεξικού, πηγή: earthobservatory.nasa.gov



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της υποθαλάσσιας διαρροής πετρελαίου από το Deepwater Horizon και οι τρόποι καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας.

Το γραφικό ^[11] που ακολουθεί δείχνει το ποσοστό των εισροών πετρελαίου στη θάλασσα μέσω των πλοίων και άλλων θαλάσσιων δραστηριοτήτων, καθώς επίσης και το πετρέλαιο από φυσικές πηγές (διαρροές).



Εικόνα 6: Η εκτιμώμενη μέση ετήσια εισροή πετρελαίου που εισέρχεται στο θαλάσσιο περιβάλλον από πλοία και άλλες ναυτιλιακές δραστηριότητες κατά το χρονικό διάστημα 10 ετών 1988 – 1997, πηγή: Gesamp

Περίπου 165.000 τόνοι πετρελαίου ετησίως χύνονται στη θάλασσα μετά από θαλάσσια ατυχήματα. Αυτό ισοδυναμεί με το 13,25% του συνολικού ποσού των εισροών πετρελαίου στη θάλασσα μέσω των υδάτων από δραστηριότητες βασισμένες στη θάλασσα. Άλλοι 206.000 τόνοι πετρελαίου (16,54%) απελευθερώνονται κάθε χρόνο εξαιτίας λειτουργικών απορρίψεων ρουτίνας, 186.000 τόνοι (14,94%) εκ των οποίων είναι ιλύς από τα καύσιμα των πλοίων. Οι περισσότερες, βέβαια, από τις εισροές πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον (περίπου 70%), στην πραγματικότητα προέρχονται από χερσαίες δραστηριότητες (πλήρωση, άδειασμα και καθάρισμα των δεξαμενών ή σωλήνων, ή και στην καθημερινή λειτουργία των εργοστασίων, αγωγών, ή πετρελαιοπηγών στη στεριά) ^[10].

Όσο η ανθρώπινη δραστηριότητα συνεχίζει να βασίζεται στην παραγωγή ενέργειας από υδρογονάνθρακες και δεν στρέφεται σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, τα φαινόμενα ρύπανσης θα συνεχίζουν να εμφανίζονται και μαζί με αυτά ό,τι περιβαλλοντικές συνέπειες ακολουθούν.

1.3. Περιβαλλοντικές συνέπειες ρύπανσης από το πετρέλαιο

Η ρύπανση της θάλασσας αλλά και του εδάφους με πετρελαιοειδή έχει τεράστιες συνέπειες στο φυσικό περιβάλλον. Το 30-40% των πετρελαιοειδών που ρίχνονται στην επιφάνεια της θάλασσας αποτελείται από πτητικά συστατικά, τα οποία εξατμίζονται γρήγορα, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά σχηματίζουν ένα λεπτό, 'μονομοριακό' όπως λέγεται, στρώμα πετρελαίου το οποίο εμποδίζει τις φυσικές ανταλλαγές που συμβαίνουν μεταξύ νερού και ατμοσφαιρικού αέρα, και οι οποίες είναι απαραίτητες για το βιολογικό κύκλο της θαλάσσιας ζωής. Το στρώμα αυτό του πετρελαίου, με άλλα λόγια, μειώνει στο ελάχιστο την ανανέωση του νερού με το οξυγόνο του αέρα, εμποδίζει τις ακτίνες του ήλιου να εισχωρήσουν βαθιά στη θάλασσα για τη φωτοσύνθεση, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και υπερβολική ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν οξυγόνο. Τα μαλάκια και τα φυτά είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε αυτή τη ρύπανση γιατί δηλητηριάζονται και πεθαίνουν από ασφυξία. Το ίδιο συμβαίνει και με τα ψάρια εκείνα που δεν εγκαταλείπουν έγκαιρα τη ρυπασμένη περιοχή ^[12]. Τα αυγά, οι προνύμφες των ψαριών και τα νεαρά άτομα είναι γενικά πιο ευαίσθητα στη ρύπανση από πετρελαιοειδή. Το πετρέλαιο προκαλεί διαταραχές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των οργανισμών, καθώς και ανωμαλίες στην ανάπτυξη των ψαριών, οδηγώντας τελικά στον πρόωρο θάνατό τους. Ακόμη και 1 μg/L (1 ppb) πετρελαίου στη θάλασσα μπορεί να βλάψει τους πιο ευαίσθητους οργανισμούς (UNEP, 1988). Ίχνη πετρελαίου στο νερό επηρεάζουν τη σεξουαλική συμπεριφορά των θαλασσιών οργανισμών, τη δυνατότητα προσανατολισμού τους και τους ρυθμούς αφομοίωσης της τροφής. Κάποιες από τις συνέπειες αυτές ενισχύονται από τη χαμηλή αλατότητα και τις υψηλές θερμοκρασίες, ενώ υπάρχει συνεργιστική δράση ανάμεσα στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες και κάποια μέταλλα (UNEP, 1988).

Η πίσσα που εκβράζεται στις αμμόδεις ακτές καταστρέφει τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, ενώ έχει υπολογιστεί ότι απαιτούνται 2-3 χρόνια για να αποκατασταθεί μερικώς η παράκτια χλωρίδα ^[13]. Εκεί λόγω χαμηλότερης διαθεσιμότητας οξυγόνου δεν ευνοείται η αποδόμηση του πετρελαίου, το οποίο διατηρεί έτσι τις τοξικές του ιδιότητες για μεγαλύτερο διάστημα ^[12]. Ως προς τα πουλιά οι επιπτώσεις της ρύπανσης είναι δραματικές. Τα φτερά τους καλύπτονται από πετρέλαιο, δεν μπορούν να πετάξουν, πεθαίνουν από υποθερμία, γιατί δεν έχουν πλέον το μονωτικό στρώμα των φτερών και των πούπουλων, ενώ όσα επιβιώνουν, δηλητηριάζονται και πεθαίνουν στην προσπάθειά τους να απαλλαγούν από το πετρέλαιο ^[12]. Το πλαγκτόν και ιδιαίτερα το νευστόν που ζει στην επιφάνεια της θάλασσας είναι ιδιαίτερα ευπαθές στις πετρελαιοκηλίδες. Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων, της τάξης των 50 ng/g, επιταχύνουν τη φωτοσύνθεση επειδή δρουν ίσως ως θρεπτικά. Πάνω από τις συγκεντρώσεις αυτές όμως υπάρχει μία σταδιακή ελάττωση

των ρυθμών της φωτοσύνθεσης. Σε συγκεντρώσεις της τάξης των 250 ng/g οι διατροφικές συνήθειες και λειτουργίες κάποιων οργανισμών μεταβάλλονται (Clark, 1986). Το ζωοπλαγκτόν καταναλώνει μικρά σταγονίδια πετρελαίου και μ' αυτόν τον τρόπο οι υδρογονάνθρακες περνούν σε υψηλότερα τροφικά επίπεδα. Επιπλέον, μη αφομοιώσιμες ουσίες καταλήγουν στο βένθος με τα εκκρίματα των οργανισμών αυτών. Αν και δεν έχει προχωρήσει αρκετά η έρευνα σχετικά με το μεταβολισμό των υδρογονανθράκων από το ζωοπλαγκτόν, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι δυνατός ο μεταβολισμός πολλών υδρογονανθράκων από ορισμένους μικροοργανισμούς, αλλά οι μεταβολίτες που προκύπτουν παραμένουν στους οργανισμούς αυτούς και δεν αποβάλλονται στο περιβάλλον. Σε πολλές περιπτώσεις οι μεταβολίτες αυτοί και κάποια ενδιάμεσα προϊόντα είναι καρκινογόνα (Rostron, 1990) ^[13].

Στη Μεσόγειο, λόγω της απουσίας μεγάλων κυμάτων, έντονων καιρικών φαινομένων, αλλά και μεγαλύτερης συγκέντρωσης αλατότητας, η φυσική διάλυση μιας πετρελαιοκηλίδας δυσχεραίνεται. Ο ρυθμός των ποσοτήτων του πετρελαίου που βουλιάζουν ή διαλύονται είναι αργός κατά τη διάρκεια μιας πετρελαϊκής ρύπανσης. Εκτός από τις καταστρεπτικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, αξιοσημείωτες είναι και οι δυσμενείς επιπτώσεις των πετρελαιοκηλίδων στην αλιεία και τον τουρισμό στις περιοχές που πλήττονται, καθώς και η απώλεια μεγάλων ποσοτήτων πετρελαίου που για να δημιουργηθεί από τη φύση χρειάστηκαν εκατομμύρια χρόνια ^[12].



Εικόνα 7: Περιβαλλοντικές συνέπειες πετρελαιοκηλίδων

1.4. Η πορεία του πετρελαίου στο περιβάλλον

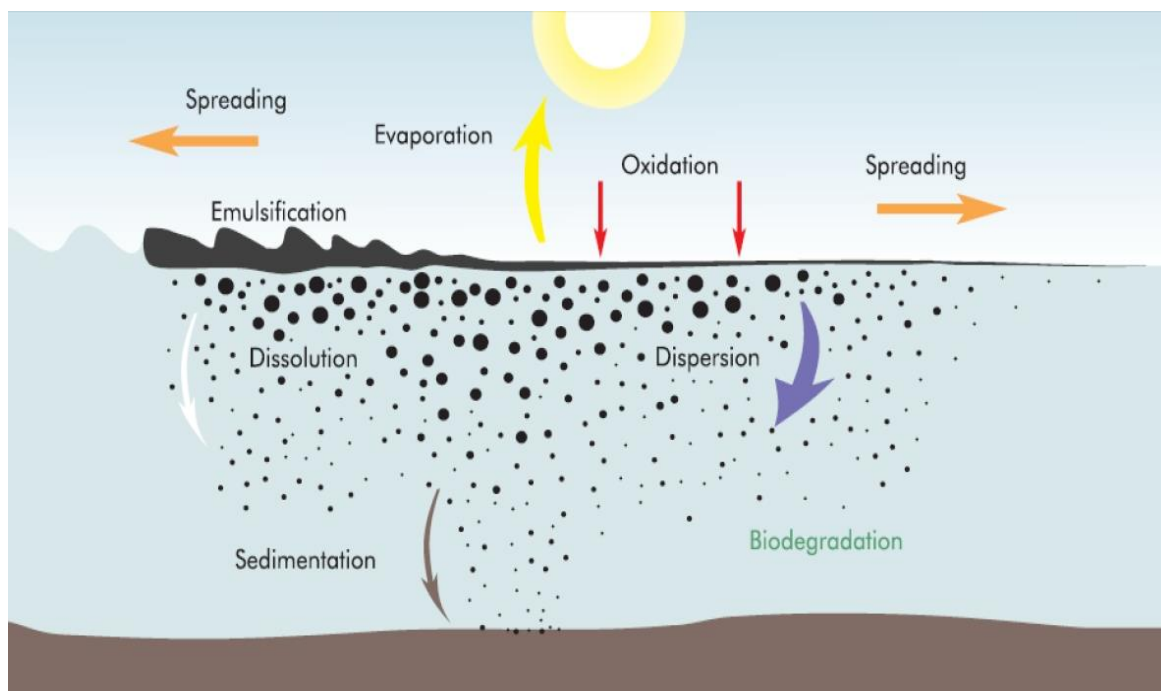
Από τη στιγμή που το πετρέλαιο θα βρεθεί στη θάλασσα, αρχίζει η διαδικασία της γήρανσης του (weathering), η οποία αναφέρεται σε μια ευρεία ποικιλία φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών που αρχίζουν να αλλάζουν τη μορφή του σχεδόν αμέσως. Αυτή η διαδικασία επηρεάζεται από τη θέση της διαρροής, από τις θερμοκρασίες του περιβάλλοντα αέρα και του νερού, τη δραστηριότητα των κυμάτων και του ανέμου, και από άλλους παράγοντες, όπως η παρουσία σωματιδίων ή ιζημάτων στο νερό. Κάθε διαδικασία γήρανσης έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των τεχνικών καθαρισμού που θα εφαρμοστούν. Ουσιαστικά, με βάση αυτούς τους παράγοντες επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική καθαρισμού της πετρελαιοκηλίδας ^[14].

- **Εξάπλωση (spreading):** Η κίνηση του πετρελαίου στην επιφάνεια του νερού. Συνήθως ακολουθεί 3 φάσεις, την κίνηση λόγω αδράνειας, λόγω ιξώδους και λόγω επιφανειακών τάσεων ^[15]. Όσο μεγαλύτερη επιφάνεια καταλαμβάνει η πετρελαιοκηλίδα, τόσο αυξάνεται και η διεπιφάνεια μεταξύ του νερού και του πετρελαίου. Έτσι, γίνεται πιο αποτελεσματική η διαλυτοποίηση του από την εφαρμογή της ουσίας διασποράς, αλλά απαιτείται περισσότερος εξοπλισμός ^[14].
- **Εξάτμιση (evaporation):** Η εξάτμιση των ελαφριών πτητικών ενώσεων από το πετρέλαιο στην ατμόσφαιρα. Στο στάδιο αυτό, υπάρχει περίπτωση να αυξηθεί η πυκνότητα και το ιξώδες του πετρελαίου ^[14]. Ανάλογα με την πυκνότητα του πετρελαίου, μέσα σε μερικές μέρες, τα ελαφριά κλάσματα μπορούν να χάσουν έως και 75% του αρχικού τους όγκου, ενώ μεσαίας πυκνότητας κλάσματα έως και 40%. Τα πιο βαριά δεν χάνουν πάνω από το 10% του αρχικού τους όγκου ^[15].
- **Γαλακτωματοποίηση (emulsification):** Δύο υγρά μπορούν να σχηματίσουν διάφορα είδη γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα, το πετρέλαιο και το νερό μπορούν να σχηματίσουν, πρώτον, ένα γαλάκτωμα ‘ελαίου-σε-νερό’, όπου το έλαιο είναι η διαλυτοποιημένη φάση, και το νερό είναι το μέσο διάλυσης. Δεύτερον, μπορούν να σχηματίσουν ένα γαλάκτωμα ‘νερού-σε-έλαιο’, όπου το νερό είναι η διαλυτοποιημένη φάση και το πετρέλαιο είναι η εξωτερική φάση ^[16]. Στην δεύτερη περίπτωση, όπου το πετρέλαιο έχει απορροφήσει το νερό, ο τελικός όγκος του αυξάνεται κατά 3-5 φορές ως προς τον αρχικό του, ενώ το ποσοστό του νερού κυμαίνεται από 60% έως 85% στα σταθερά γαλακτώματα. Το γαλάκτωμα αυτό ονομάζεται ‘chocolate mousse’, λόγω και του σκούρου καφέ χρώματος, αλλά και της πηχτής, σχεδόν στερεής μορφής του ^{[15],[17]}. Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί γαλάκτωμα (διότι δεν

συμβαίνει πάντα) η αύξηση του ιξώδους μετατρέπει το υγρό πετρέλαιο σε ημι-στερεό και επηρεάζει άμεσα τη συμπεριφορά του. Δυσκολεύει σε μεγάλο βαθμό την εξάτμισή του, αλλά και τη διαδικασία καθαρισμού του ^[15].

- **Φυσική διασπορά (natural dispersion):** Στο φαινόμενο αυτό συμβάλλουν η δράση των κυμάτων και οι στροβιλισμοί, κατά τη διάρκεια του οποίου, μια πετρελαιοκηλίδα ‘σπάει’ σε μικρότερα σταγονίδια, τα οποία είτε εξαπλώνονται μέσα στο νερό, είτε επιστρέφουν στην επιφάνεια δημιουργώντας και πάλι κηλίδα. Οι μικρές σταγόνες που αναμιγνύονται με το νερό ξεκινούν να καθιζάνουν και να βιοαποδομούνται από τους μικροοργανισμούς ^{[14], [17]}.
- **Διάλυση (dissolution):** Διάλυση είναι η χημική σταθεροποίηση των συστατικών του πετρελαίου στο νερό. Η διάλυση αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό μέρος της απώλειας του πετρελαίου, αλλά εξακολουθεί να θεωρείται μια σημαντική παράμετρος για τη συμπεριφορά του, επειδή τα διαλυτά συστατικά του πετρελαίου, ιδιαίτερα οι ελαφρύτερες αρωματικές ενώσεις, είναι πιο τοξικές για τους υδρόβια είδη, σε σχέση με τα αλειφατικούς υδρογονάνθρακες ^[15].
- **Βύθιση και καθίζηση (sinking and sedimentation):** Αφορά κυρίως τα βαριά συστατικά του πετρελαίου τα οποία βυθίζονται στο νερό. Προκαλείται επίσης με προσκόλληση σωματιδίων άμμου στο πετρέλαιο, όταν αυτό βρίσκεται κοντά σε ακτές. Εάν μάλιστα, εφαρμοστούν ουσίες διασποράς πριν το φαινόμενο αυτό, αποτρέπουν την διασπορά του πετρελαίου σε αβαθείς περιοχές της ακτογραμμής. Λειτουργούν δηλαδή, προληπτικά ^{[14], [17]}.
- **Φωτοχημική οξείδωση (photo-oxidation):** Η φωτο-οξείδωση είναι μια ομάδα αντιδράσεων που οξειδώνουν τα συστατικά του πετρελαίου. Περιλαμβάνει τις άμεσες αντιδράσεις, όπου τα αντιδρώντα απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία δημιουργώντας ένα λιγότερο σταθερό μέσο και τις έμμεσες αντιδράσεις, όπου άλλα συστατικά στο διάλυμα απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία. Και οι δύο παράγουν ενδιάμεσα προϊόντα (ελεύθερα ηλεκτρόνια, ρίζες υδροξυλίου), τα οποία επιτίθενται στα μόρια των υδρογονανθράκων ή μεταφέρουν ενέργεια στα αντιδρώντα των υδρογονανθράκων, ώστε να διασπαστούν ^[16]. Επίσης, η επίδραση του οξυγόνου και της ηλιακής ακτινοβολίας στην κηλίδα, εξαρτάται από το πάχος του ‘φιλμ’ που δημιουργείται στην επιφάνεια της θάλασσας. Υπό την επίδραση έντονου ηλιακού φωτός λεπτά φιλμ διασπώνται με ρυθμό 0,1% την ημέρα. Η φωτοχημική οξείδωση παχέων στρωμάτων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους (πίσσα) με μεγάλους χρόνους ζωής ^[15].

- **Βιοαποικοδόμηση (biodegradation):** Η διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπως βακτήρια και μύκητες, καταναλώνουν τους υδρογονάνθρακες ως πηγή ενέργειας. Οι ελαφρύτεροι υδρογονάνθρακες, δηλαδή ενώσεις με λιγότερα μόρια άνθρακα, όπως αλκάνια και κυκλικοί υδρογονάνθρακες, αποδομούνται γρηγορότερα με τελικά προϊόντα, μια ολοκληρωμένης αποδόμησης, διοξείδιο του άνθρακα και νερό (CO_2 & H_2O). Οι πιο πολύπλοκοι υδρογονάνθρακες, όπως διακλαδωμένα αλκάνια και πολυκυκλικοί αρωματικοί και αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, απαιτούν πολύπλοκες μεταβολικές διαδικασίες και συνήθως εμπλέκονται διάφορα βακτηριακά στελέχη σε συνεργασία. Επίσης, η βιοαποικοδόμηση λαμβάνει χώρα στην διεπιφάνεια μεταξύ πετρελαίου και νερού, οπότε τα μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν από την αποδόμηση των υδρογονανθράκων, αποτελούν ενώσεις που είναι ευδιάλυτες στο νερό. Με άλλα λόγια, οι μικροοργανισμοί καταφέρνουν να διαλυτοποιήσουν το πετρέλαιο μέσα στο νερό. Τέλος, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η συγκέντρωση του οξυγόνου, οι θρεπτικές ουσίες (άζωτο και φώσφορος), η θερμοκρασία, η αλατότητα, και οι διαφορές πίεσης, καθώς και οι φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου (συμπεριλαμβανομένων του λόγου επιφάνειας προς όγκου) και το επίπεδο ενέργειας του περιβάλλοντος, μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τα ποσοστά βιοαποικοδόμησης ^[15].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των φυσικών, χημικών και βιολογικών μεταβολών του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον, πηγή: Mediterranean Decision Support System for Marine Safety

1.5. Τεχνικές απορρύπανσης

Υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων και επηρεάζονται πολύ από ποικίλους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά της ρυπασμένης περιοχής, τον τύπο και τη σύσταση του πετρελαίου και τις καιρικές συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν φυσικές μέθοδοι, χημικές και μη χημικές μέθοδοι. Επίσης, μία τεχνική απορρύπανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επί τόπου (*in situ*), ή να προηγηθεί απομάκρυνση του ρυπασμένου τμήματος και μεταφορά του σε ειδικά διαμορφωμένη τοποθεσία για επεξεργασία (*ex-situ*).

1.5.1. Φυσικές μέθοδοι

Η φυσική βιοεξυγίανση (natural attenuation) ή η φυσική αποκατάσταση είναι βασικά η επιλογή όπου δεν λαμβάνεται κάποιο μέτρο και 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 και να καθαριστεί 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 μπορούν να προκαλέσουν περισσότερη ζημιά από καλό. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι απαιτείται ένα πρόγραμμα παρακολούθησης για να αξιολογηθεί η απόδοση της ^[18].

1.5.2. Μη Χημικές μέθοδοι

- ❖ Booming and skimming: Χρήση των πλωτών φραγμάτων για να συγκρατηθεί και να ελεγχθεί η μετακίνηση του επιπλέοντος πετρελαίου και χρήση των εξαρτιστών για να ανακτηθεί. Η περιβαλλοντική επίδραση αυτής της μεθόδου είναι ελάχιστη εάν ελέγχεται η κυκλοφορία του εργατικού δυναμικού καθαρισμού^[18].
- ❖ Wiping with absorbent materials: 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^[18].
- ❖ Μηχανική απομάκρυνση: Συλλογή και απομάκρυνση των ιζημάτων από τις ρυπασμένες περιοχές 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^[18].

- ❖ Πλύση: έκπλυση του πετρελαίου που προσκολλάται κατά μήκος των ακτών στο νερό, για συλλογή. Οι στρατηγικές έκπλυσης κυμαίνονται από χαμηλής πίεσεως έκπλυση με κρύο νερό σε έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό. Αυτή η μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται ειδικά με υψηλή πίεση ή καυτό νερό, πρέπει να αποφεύγεται σε υγρά τοπούς ή άλλους ευαίσθητους βιότοπούς^[18].
- ❖ Sediment relocation and tilling: Μετακίνηση του ρυπασμένου με πετρέλαιο ιζήματος από το ένα τμήμα της παραλίας σε άλλο ή με επιφανειακή κατεργασία του εδάφους (tilling) και ανάμιξη 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^[18].
- ❖ In-situ burning: Η καύση είναι μια μέθοδος η οποία έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει μεγάλες ποσότητες πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας. Πρακτικά προβλήματα όμως περιορίζουν τις δυνατότητες της χρήσης της μεθόδου αυτής. Τέτοια προβλήματα είναι η ανάφλεξη, η διατήρηση της καύσης, οι μεγάλες ποσότητες καπνού στην ατμόσφαιρα, η δημιουργία και πιθανή βύθιση εξαιρετικά παχύρρευστων υπολειμμάτων και λόγοι ασφαλείας^[19]. Στην ακτή, το πετρέλαιο καίγεται συνήθως όταν βρίσκεται πάνω σε καύσιμο υπόστρωμα όπως η βλάστηση, τα κούτσουρα και άλλα συντρίμια. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προκαλέσει σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή της χλωρίδας και της πανίδας^[18].

1.5.3. Χημικές μέθοδοι

- ❖ Χημικές ενώσεις διασποράς: 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. Αυτή 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 διεπιφάνειάς του^[18].
- ❖ Demulsifiers: Χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τα γαλακτώματα και για να ενισχυθεί η φυσική διασπορά^[18].

- ❖ Solidifiers: 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 ^[18].
- ❖ 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 ^[18].



Εικόνα 9: Χρήση booms για τη συλλογή και ανάκτηση του πετρελαίου

Αν και οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η φυσική απομάκρυνση, τα πλωτά φράγματα και η χρήση υδροφοβικών υλικών, είναι ο πρώτος τρόπος αντιμετώπισης, σπάνια επιτυγχάνουν τον πλήρη καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων. Οι μηχανικές μέθοδοι ανακτούν χαρακτηριστικά λιγότερο από 10-15 % του πετρελαίου μετά από μία μεγάλης έκτασης πετρελαιοκηλίδα ^[18].

1.6. Βιοεξυγίανση

Η βιοεξυγίανση έχει οριστεί ως 'η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοδιάσπασης' ^[20]. Ή σύμφωνα με την EPA (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ μια 'τεχνολογία που χρησιμοποιεί οργανισμούς για να αποδομήσει επικίνδυνες ουσίες σε λιγότερο τοξικές ή μη τοξικές ουσίες' ^[21]. Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην προϋπόθεση ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου είναι

εύκολα βιοδιασπάσιμο στη φύση. 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:

- **Βιοενίσχυση** (*bioaugmentation*), στην οποία γνωστά βακτήρια που αποικοδομούν το πετρέλαιο προστίθενται για να συμπληρώσουν τον υπάρχοντα μικροβιακό πληθυσμό, και
- **Βιοδιέγερση** (*biostimulation*), στην οποία η αύξηση των γηγενών μικροβιακών αποδομητών πετρελαίου υποκινείται με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών 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, κ.λπ.)^[18].

Εκτός από τις παραπάνω προσεγγίσεις η βιοεξυγίανση περιλαμβάνει και άλλες τεχνολογίες, όπως ο βιο-εξαερισμός (*bioventing*), ο βιο-αερισμός (*bio-sparging*), η τεχνική της εξαγωγής αερίων εδάφους (*soil vapor extraction*), το τεστ ρυθμού αναπνοής (*respiration test*), η τεχνική της άντλησης και επεξεργασίας (*pump and treat systems*), η τεχνική της άντλησης, επεξεργασίας και ανακυκλοφορίας (*pump - treat and reinjection systems*), η τεχνική υπόγειων φραγμάτων (*reactive walls*), η ενεργή τάφρος υψηλής διαπερατότητας (*permeable reactive trench*) και τα συστήματα συγκλίνων διαφραγμάτων και διόδου (*funnel and gate systems*). Οι τεχνολογίες αυτές εφαρμόζονται *in-situ*. Οι *ex-situ* τεχνολογίες περιλαμβάνουν την τεχνική ανάμειξης με χώμα σε έκταση καλλιέργειας (*landfarming*), την τεχνική της κομποστοποίησης (*composting*), της βιοαποδόμησης ιλύος (*slurry-phase bioremediation*) και της βιοδιάσπασης αέριων ρύπων (*vapor phase biological treatment*)^[22].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοεξυγίανση, και η βιοδιέγερση ειδικότερα, μπορεί να ενισχύσει τη βιοδιάσπαση πετρελαίου στις ρυπασμένες ακτές. 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^[18].

Ακόμη, η βιοεξυγίανση ως μέθοδος αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών έχει διάφορα πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνολογιών. Αυτά είναι:

Πλεονεκτήματα:

- Συνήθως περιλαμβάνει μόνο την ελάχιστη φυσική διακοπή της περιοχής
- Δεν παρατηρούνται σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όταν εφαρμόζεται σωστά
- Περιβαλλοντικά φιλική τεχνολογία, αφού τα τελικά προϊόντα είναι ανόργανα
- Προσφέρει μια απλούστερη και πιο εμπειριστατωμένη λύση από τις μηχανικές τεχνολογίες
- Λιγότερο δαπανηρή από ό, τι άλλες προσεγγίσεις
- Αποδεκτή από το ευρύ κοινό, ως πιο ‘πράσινη τεχνολογία’

Μειονεκτήματα:

- Η λειτουργική της χρήση μπορεί να περιοριστεί από την σύνθεση του πετρελαίου
- Ανησυχία ως προς την τοξικότητα των μεταβολικών προϊόντων
- Χρειάζεται χρόνος για να εφαρμοστεί
- Η προσέγγιση πρέπει να είναι ειδικά προσαρμοσμένη ειδικά για κάθε ρυπασμένη περιοχή
- Για να γίνει βελτιστοποίηση της προσέγγισης απαιτούνται σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την τοποθεσία διαρροής και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου ^[20].

Η βιοαποικοδόμηση (biodegradation), που περιλαμβάνεται στην βιοεξυγίανση και δεν είναι συνώνυμοι οι όροι, αναφέρεται στη φυσική διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα βακτηρίδια ή άλλους μικροοργανισμούς μεταβάλλουν και διασπούν τα οργανικά μόρια (υδρογονάνθρακες) σε άλλες ουσίες, όπως λιπαρά οξέα και διοξείδιο του άνθρακα ^[20].

Πιο συγκεκριμένα, η βιοαποικοδόμηση πετρελαίου συνήθως έχει τα εξής αποτελέσματα ως προς τις αλλαγές του πετρελαίου:

- αυξάνει το ιξώδες του πετρελαίου
- μειώνει τη βαρύτητα API (μέτρο σύγκρισης της πυκνότητας των διαφόρων ειδών του πετρελαίου σε σχέση με το νερό) , το οποίο μειώνει την αξία του παραγόμενου πετρελαίου
- αυξάνει το περιεχόμενο ασφατενίου (σε σχέση με το κορεσμένο και αρωματικό περιεχόμενο υδρογονάνθρακα)
- αυξάνει τη συγκέντρωση ορισμένων μετάλλων
- αυξάνει την περιεκτικότητα σε θείο
- αυξάνει την οξύτητα του πετρελαίου
- προσθέτει ενώσεις όπως καρβοξυλικά οξέα και φαινόλες ^[23]

Επίσης, υπάρχουν κάποιες περιβαλλοντικές παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τον ρυθμό και την έκταση της βιοαποικοδόμησης. Μεταβλητές όπως το οξυγόνο και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών μπορεί συχνά να ελέγχονται στους χώρους διαρροής για την φυσική ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης. Άλλες μεταβλητές, όπως η αλατότητα, συνήθως δεν είναι ελέγξιμες. Αυτοί οι παράγοντες είναι το οξυγόνο, τα θρεπτικά, η θερμοκρασία, το pH, η αλατότητα και οι διαφορετικές πιέσεις ^[20].

Κεφάλαιο 2 Πειραματικό μέρος

2.1. Περιγραφή εξοπλισμού και πειραματικού σχεδιασμού

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα του πειράματος, έπρεπε πρώτα να γίνουν οι απαραίτητες προετοιμασίες ώστε οι πειραματικές συνθήκες να προσομοιώνουν όσο το δυνατόν περισσότερο τις συνθήκες του πεδίου.

Πιο συγκεκριμένα, εξετάσαμε πόσο αποτελεσματικά θα αντιδράσουν οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου, σε βάθος περίπου 1 km από την επιφάνεια της θάλασσας, σε περίπτωση διαρροής. Εξετάστηκαν δύο βασικά πειράματα:

- με χρήση αυτόχθονων και πιεζοφιλικών μικροοργανισμών
- και με χρήση μόνο πιεζοφιλικών μικροοργανισμών με ενίσχυση σε θρεπτικά συστατικά.

Το βασικό όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν ο αντιδραστήρας υψηλής πίεσης, τύπου bench top, της εταιρείας Parr Instrument Company, μοντέλο 4525, κατασκευασμένος από ανοξείδωτο ατσάλι, με τις εξής τεχνικές προδιαγραφές:

- Μέγιστη πίεση: 200 bar/ 3000 psi
- Μέγιστη χωρητικότητα αντιδραστήρα: 0.970 L
- Μαγνητικός αναδευτήρας συνεχούς κίνησης
- Εξωτερικό περίβλημα ψύξης και θέρμανσης (5°C – 30°C)
- Βαλβίδα εκτόνωσης πεπιεσμένου αέρα και βαλβίδα ασφαλείας
- Είσοδος/έξοδος για τη δειγματοληψία
- Έτος κατασκευής: 2015



Εικόνα 10: Ο αντιδραστήρας της Parr Instruments



Εικόνα 11: Η συσκευή ελέγχου του αντιδραστήρα και οι φιάλες με την παροχή αέρα και αζώτου



Εικόνα 12: Ολόκληρη η διάταξη του αντιδραστήρα

Η πίεση μέσα στον αντιδραστήρα αυξήθηκε με την εισαγωγή πεπιεσμένου μίγματος αέρα αζώτου, σε ίσες ποσότητες, διατηρώντας έτσι την πίεση στα 100 bar.

Επίσης, βασικό χαρακτηριστικό του βάθους των 1000 m είναι οι 14 °C, οπότε για την σταθερή ψύξη του αντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε ανακυκλοφορητής νερού (Water bath) της εταιρείας Witeg.



Εικόνα 13: Ανακυκλοφορητής νερού της Witeg

Πριν τα βασικά πειράματα που αναφέρθηκαν στην αρχή της παραγράφου, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα με αργό πετρέλαιο (crude oil) και με ντίζελ (diesel oil) σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ώστε να εξεταστούν οι διαφορές μεταξύ των πειραμάτων στην αποδόμηση του πετρελαίου.

Τα προκαταρκτικά που έγιναν σε ατμοσφαιρική πίεση είχαν χρονική διάρκεια που κυμαινόταν από 14 ημέρες έως 21 ημέρες, ενώ στη συνέχεια η χρονική διάρκεια για τα κύρια πειράματα αυξήθηκε σε 28 ημέρες, ώστε να βασίζεται σε τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C) για την δοκιμή αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης στη βιοαποδόμηση του πετρελαίου. Οι δειγματοληψίες ήταν εβδομαδιαίες, ώστε να έχουμε μια σταδιακή και συγκρίσιμη εικόνα για την βιοαποδόμηση του πετρελαίου.

Κατά την πειραματική διαδικασία, οι χημικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα του πετρελαίου συμπεριελάμβαναν εκχύλιση υγρού σε υγρό, εκχύλιση στερεής φάσης και ανάλυση σε GC/MS. Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκε εφαρμογή βαφής στο DNA των κυττάρων στους μικροοργανισμών.

Όλα τα παραπάνω σενάρια και πειραματισμοί περιγράφονται αναλυτικότερα στην παράγραφο που ακολουθεί την πειραματική διαδικασία.

2.2. Υλικά και πειραματική διαδικασία

2.2.1. Εκχύλιση υγρού σε υγρό (Liquid to liquid Extraction)

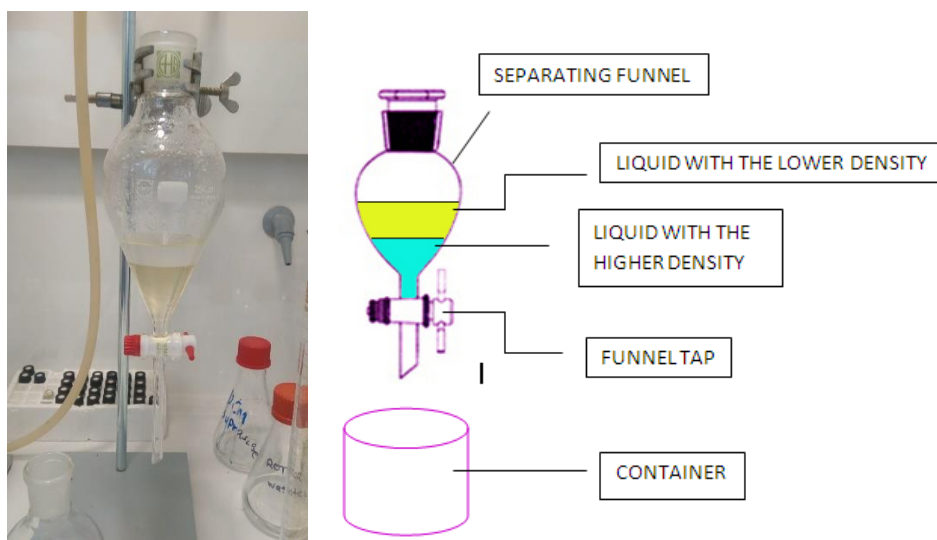
Το πρώτο βήμα για την ανάλυση του δείγματος είναι η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης. Η εκχύλιση γίνεται με διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM). Ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιείται είναι 3 φορές τον όγκο του διαλύματος. Δηλαδή για 30 mL δείγματος χρησιμοποιούμε 90 mL DCM συνολικά. Να σημειώσουμε ότι λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητας του DCM, η οργανική φάση είναι βαρύτερη από την υδατική και απομακρύνεται πρώτη από την διαχωριστική χοάνη ($\rho_{DCM} = 1.3266 \frac{g}{m^3} > \rho_{H_2O} = 1.000 \frac{g}{m^3}$).

Υλικά

1. Χοάνη εκχύλισης των 250 mL
2. Μποτίλιες των 250 mL
3. Rotary evaporator
4. Vials των 4 mL

Μέθοδος

- Το διάλυμα μαζί με ίση ποσότητα διαλύτη αναδεύεται πολύ καλά σε χοάνη εκχύλισης.
- Αφήνουμε το διάλυμα να ηρεμήσει και να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (υδατική-οργανική).
- Με αργό ρυθμό αφήνουμε την οργανική φάση να διαπεράσει την χοάνη.
- Η ίδια διαδικασία γίνεται 3 φορές με την ίδια ποσότητα διαλύτη κάθε φορά.
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε το δείγμα στο rotary evaporator ώστε να εξατμιστεί όλο το DCM.
- Ζυγίζουμε τα άδεια vials των 4 mL στα οποία θα μεταφέρουμε το δείγμα.
- Ξεπλένουμε με λίγη ποσότητα DCM για να πάρουμε όλο το δείγμα και το περνάμε στα ζυγισμένα vials.
- Τοποθετούμε τα δείγματα σε θερμαινόμενη βάση, στους 50°C και με τη βοήθεια εμφυσούμενου αέριου αζώτου, εξατμίζεται σταδιακά ο διαλύτης.
- Τέλος, μετά την εξάτμιση, τα μεταφέρουμε στον ξηραντήρα. Την επομένη, ζυγίζουμε τα vials και από τη διαφορά του αρχικά ζυγισμένου απόβαρου βρίσκουμε τη ζητούμενη μάζα του εκχυλίσματος.



Εικόνα 14: Εκχύλιση υγρού σε υγρό

2.2.2. Εκχύλιση Στερεής Φάσης - Κλασματοποίηση πετρελαίου (Solid phase extraction)

Το επόμενο βήμα είναι η εκχύλιση SPE. Είναι μια διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος με την οποία οι ενώσεις οι οποίες διαλύονται ή εναιωρούνται σε ένα υγρό μίγμα διαχωρίζονται από άλλες ενώσεις στο μίγμα, σύμφωνα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. Διαχωρίζει δηλαδή, τα συστατικά της κινητής φάσης (mobile phase) από τα συστατικά της στατικής φάσης (stationary phase). Τα αναλυτικά εργαστήρια χρησιμοποιούν την εκχύλιση στερεάς φάσης για να συγκεντρώσουν και να εξευγενίσουν δείγματα για ανάλυση ^[24].

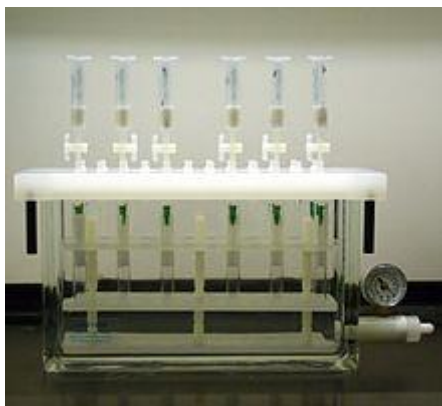
Οι διαλύτες που χρησιμοποιούμε είναι το εξάνιο C₆, για την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και το διχλωρομεθάνιο DCM, για την απομάκρυνση των αρωματικών υδρογονανθράκων, που περιέχονται στο δείγμα του πετρελαίου.

Υλικά

1. Διάταξη εκχύλισης SPE
2. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 mL
3. Πιπέτες
4. Vials
5. Σύριγγες με διηθητικό φίλτρο

Μέθοδος

- Αρχικά, κάνουμε ‘pre-conditioning’ των στηλών (σύριγγες) γεμίζοντας τες με 2 mL C₆. Ανοίγουμε τις στήλες και αφήνουμε τον διαλύτη να ξεπλύνει, συλλέγοντας τον παράλληλα με τοποθετημένα vials από κάτω.
- Επίσης, διαλύουμε σε 1 mL C₆ τα δείγματα.
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε καθαρά vials των 6 mL κάτω από τις μύτες των στηλών, όπου διαπερνάει το δείγμα. Γεμίζουμε τους ογκομετρικούς κύλινδρους με 4 mL C₆ και τους αντιστοιχούμε σε κάθε στήλη για να μην χάνεται η σειρά.
- Με διαφορετικές πιπέτες για κάθε δείγμα, γεμίζουμε κάθε στήλη με τα δείγματα.
- Ανοίγουμε τις στήλες και αφήνουμε να περάσει το δείγμα. Μόλις αδειάσει η στήλη, εκλούουμε με όλη την ποσότητα του διαλύτη.
- Όταν γεμίσουν τα vials έχοντας πάρει το κλάσμα των *κορεσμένων*, τα αλλάζουμε με καθαρά για να πάρουμε στη συνέχεια το κλάσμα των *αρωματικών*.
- Γεμίζουμε τους ογκομετρικούς κυλίνδρους με 4 mL DCM.
- Ξεπλένουμε με ελάχιστη ποσότητα DCM τα vials με τα δείγματα και γεμίζουμε τις στήλες. Μόλις περάσει όλο το δείγμα από τις στήλες, ξεπλένουμε και πάλι με όλη την ποσότητα του διαλύτη.
- Τοποθετούμε τα vials σε θερμαινόμενη βάση, στους 50° C και με τη βοήθεια εμφυσούμενου αέριου αζώτου, εξατμίζεται σταδιακά ο διαλύτης.
- Την επόμενη, προσθέτουμε στα εξατμισμένα δείγματα τον αντίστοιχο διαλύτη για κάθε κλάσμα και τα μεταφέρουμε σε προ ζυγισμένα vials των 2 mL. Τα αφήνουμε να εξατμιστούν overnight και τα μεταφέρουμε στον ξηραντήρα.
- Μετά την εξάτμιση, ζυγίζουμε τα vials και από τη διαφορά του αρχικά ζυγισμένου απόβαρου βρίσκουμε τη ζητούμενη μάζα του εκχυλίσματος. Τέλος, προσθέτουμε από 1 mL C₆ και DCM στα αντίστοιχα δείγματα (κορεσμένα και αρωματικά) και προχωράμε στην ανάλυση GC/MS των δειγμάτων.



Εικόνα 15: SPE διάταξη



Εικόνα 16: Εκχύλιση SPE-Διαχωρισμός των κορεσμένων υδρογονανθράκων (F1 fraction)



Εικόνα 17: Εκχύλιση SPE-Διαχωρισμός των αρωματικών υδρογονανθράκων (F2 fraction)

2.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων για την ανάλυση με GCMS

Για τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, την ταυτοποίηση καθώς και την ποσοτικοποίηση των συστατικών του δείγματος χρησιμοποιείται η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Είναι μια αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας για τον προσδιορισμό διαφορετικών πτητικών ουσιών σε ένα δείγμα ^[25]. Η συσκευή που χρησιμοποιούμε για τις αναλύσεις είναι το μοντέλο 7890A της Agilent Technologies. Επίσης, τη μέθοδο που έχουμε επιλέξει να τρέχουν οι αναλύσεις, την έχουμε θέσει στην παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (περιγράφεται παρακάτω), καθώς ψάχνουμε συγκεκριμένα στοιχεία που βρίσκονται στο αργό πετρέλαιο. Πιο συγκεκριμένα η αρχή λειτουργίας του έχει ως εξής:

Αέριος χρωματογράφος:

Το φέρον αέριο (συνήθως N₂, He, H₂, Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου. Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2m για της πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών δεκάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των μm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες. Το δείγμα, συνήθως όγκου 1 μL, εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Φασματομετρία μάζας:

Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματομέτρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους.

Τα φασματομέτρα μαζών αποτελούνται από:

- Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου,
- Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z ,
- Τον ανιχνευτή.

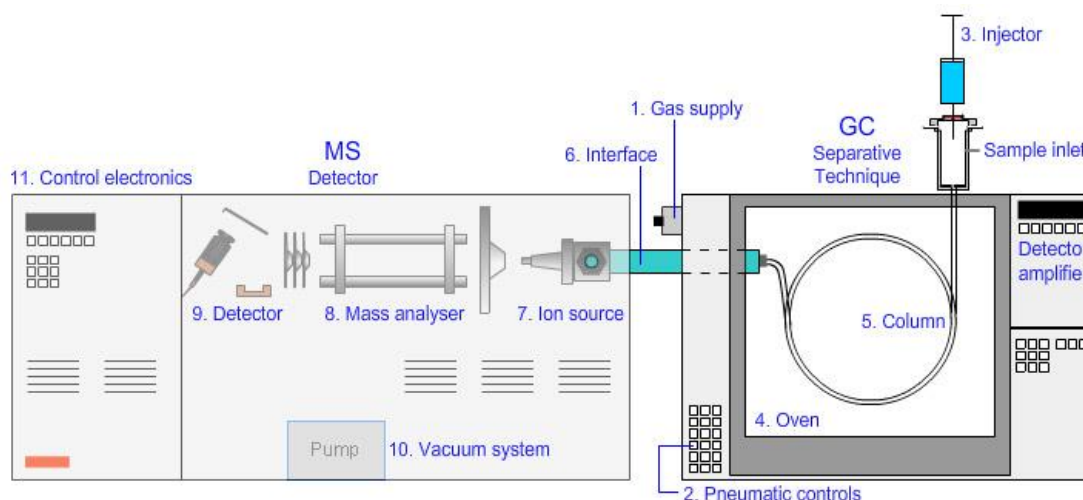
Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές – διαφράγματα μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται.

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (συνήθως 70 eV), δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιονική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιονικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι: ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμός με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB).

Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι: αναλυτής τομέα, τετραπολικός αναλυτής, παγίδα ιόντων, αναλυτής χρόνου πτήσης.

Στην παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM-selected ion monitoring) ορισμένα θραύσματα ιόντων εισέρχονται στη μέθοδο του οργάνου και μόνο εκείνα τα θραύσματα μάζας ανιχνεύονται από το φασματόμετρο μάζας. Τα πλεονεκτήματα της SIM είναι ότι το όριο ανίχνευσης είναι χαμηλότερο αφού το όργανο αναζητά μόνο σε ένα μικρό αριθμό στοιχείων (π.χ. τρία θραύσματα) κατά τη διάρκεια κάθε σάρωσης. Περισσότερες σαρώσεις μπορούν να λάβουν χώρα κάθε δευτερόλεπτο. Για επιπλέον επιβεβαίωση της πιθανότητας ενός δυνητικού θετικού αποτελέσματος, είναι σημαντικό να είμαστε σίγουροι ότι οι αναλογίες ιόντων των διαφόρων θραυσμάτων μάζας είναι συγκρίσιμες με ένα γνωστό πρότυπο αναφοράς^[24].



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού ενός αέριου χρωματογράφου με φασματομετρία μάζας, πηγή: chromacademy.com

Για την ανάλυση αρχικά χρειάζονται τα εξής:

1. Τυφλό δείγμα με εξάνιο C₆ για το ξέπλυμα της σύριγγας του οργάνου.
2. Internal Standard 200 ppm (εσωτερικό πρότυπο: διάλυμα 4 δευτεριωμένων ενώσεων (d₈-naphthalene, d₁₀-anthracene, d₁₂-chrysene και d₁₂-perylene), όπου η κάθε μία ποσοτικοποιεί διαφορετική ομάδα υδρογονανθράκων)

- Αρχικά, θερμαίνουμε το internal standard σε αμμόλουτρο και στη συνέχεια περνάμε 5 μL σε καθένα από τα δείγματα με την ειδική σύριγγα.
- Στη συνέχεια, θερμαίνουμε ομοιόμορφα και τα δείγματα σε αμμόλουτρο στους 60 °C για 45 λεπτά.
- Αφού έχουμε επιλέξει μέθοδο ανάλυσης στο όργανο, τοποθετούμε στις θέσεις 1, A και B το τυφλό δείγμα, το χλωροφόρμιο και το C_6 supra soln αντίστοιχα.
- Το όργανο, αφού πρώτα ξεπλύνει τη σύριγγα του (πρώτα με χλωροφόρμιο και μετά με εξάνιο), σταματάει και τοποθετούμε τα φιαλίδια με τα δείγματα στις θέσεις που του έχουμε θέσει στην καρτέλα sequence του προγράμματος στον H/Y. Θέτουμε σε λειτουργία το όργανο, με χρονική διάρκεια για την επεξεργασία κάθε δείγματος τα 60 λεπτά.



Εικόνα 19: GC/MS 7890A της Agilent Technologies (αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας)

2.3. Αναλύσεις μικροβιολογικών δειγμάτων

2.3.1. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων υγρής φάσης

Αραιώσεις υγρής φάσης πραγματοποιήθηκαν στα πειράματα που καλλιεργήθηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα διαλύματα των αραιώσεων στρώθηκαν σε τρυβλία (petri dish), στα οποία πραγματοποιήθηκε επώαση των μικροοργανισμών. Σκοπός ήταν να εξεταστεί η ζωτικότητα και η επιβίωση των μικροοργανισμών μέσα στο διάλυμα του πετρελαίου. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στον μικροβιολογικό απαγωγό σε αποστειρωμένες συνθήκες. Δηλαδή, πληρούνται οι προϋποθέσεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Υλικά

- Σωλήνες αραίωσης
- Τρυβλία
- Πιπέτες των 10ml, 1ml, 100μl
- Διάλυμα ONR7
- Vortex

Μέθοδος

- Αρχικά, προσθέτω σε κάθε σωλήνα από 9 mL ONR7.
- Στον πρώτο σωλήνα προσθέτω και 1 mL δείγματος (από την καλλιέργεια του πετρελαίου).
- Στη συνέχεια, μεταφέρουμε 1 mL από τον ένα σωλήνα στον άλλον, αφού πρώτα προηγηθεί ανάδευση με vortex, από την 10^{-1} μέχρι την 10^{-10} αραίωση.
- Για τις αραιώσεις 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} στρώνουμε από 2 τρυβλία (duplicates) προσθέτοντας σε κάθε τρυβλίο από 100μl.
- Τέλος, τα τοποθετούμε στον επωαστικό θάλαμο και τα αφήνουμε να αναπτυχθούν.

2.3.2. Εφαρμογή βαφής Acridine Orange σε δείγμα μικροοργανισμών

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στα δείγματα των μικροοργανισμών των πειραμάτων σε υψηλή πίεση. Δεν εφαρμόστηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις, καθώς λόγω της εκτόνωσης κατά τη δειγματοληψία, οι μικροοργανισμοί πολύ πιθανόν να μην επιβιώνουν. Οπότε δεν θα μπορούσαν να σχηματιστούν αποικίες κατά την επώαση σε τρυβλία. Γι' αυτό λοιπόν τον λόγο επιλέχθηκε η τεχνική αυτή, αφού η βαφή της πορτοκαλί ακριδίνης εφαρμόζεται στο DNA των μικροβιακών κυττάρων, είτε ζωντανών είτε όχι. Στόχος ήταν να επιβεβαιωθεί η βιωσιμότητα μικροοργανισμών μέσα στον αντιδραστήρα. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

Υλικά

- Διάλυμα acridine orange 1% w/v (0.1g acridine orange σε 10 mL απιονισμένου νερού)
- Διάλυμα glacial acetic acid + Acridine orange (0.5 mL acridine orange 1 %w/v + 0.5 mL glacial acetic acid 1%v/v σε 50 mL H₂O)
- Διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% v/v
- Διάλυμα 1xPBS (phosphate buffer saline)
- Συσκευή διήθησης κενού με φίλτρα
- Μικροσκόπιο

Μέθοδος

1. Αρχικά, λαμβάνουμε τα δείγματα από τον αντιδραστήρα μέσα σε σύριγγες που περιέχουν 10 mL φορμαλδεΰδης.
2. Τα δείγματα φιλτράρονται αρχικά στη συσκευή διήθησης μέσω black polycarbonate μεμβράνης διαμέτρου πόρων 0.2 μm .
3. Οι φιλτραρισμένες μεμβράνες βάφονται με το διάλυμα glacial acetic acid + acridine orange 1% w/v. Οι μεμβράνες φυλάσσονται για 2 λεπτά στο σκοτάδι.
4. Υπόλειμμα της βαφής ξεπλένεται από το φίλτρο με 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος 1x PBS.
5. Οι μεμβράνες τοποθετούνται προσεκτικά στα γυάλινα slides του μικροσκοπίου και καταγράφουμε τα βαμμένα κύτταρα.
6. Τέλος, με την χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής τραβήξαμε φωτογραφίες που απεικονίζουν τα βαμμένα κύτταρα των μικροοργανισμών πάνω στις μεμβράνες.

Να τονιστεί το γεγονός ότι τα κύτταρα κατά τη δειγματοληψία από τον αντιδραστήρα δεν προλαβαίνουν να διαχωριστούν, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ‘κορδέλες’ (ribbons), οι οποίες αποτελούν τα συσσωματώματα των κυττάρων αυτών. Δηλαδή στις απεικονίσεις φαίνονται ξεκάθαρα αυτές οι τύπου ‘κορδέλες’.

2.4. Προκαταρκτικά πειράματα

Τα προκαταρκτικά πειράματα καλλιεργήθηκαν με βάση συνθετικό θαλασσινό νερό (ONR7) που συνθέσαμε εμείς στο εργαστήριο. Στα τελικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό επιλεγμένο από την παραλία του Αγίου Ονουφρίου στα Ακρωτήρι Χανίων.

Η μικροβιακή κοινότητα που επιλέχθηκε (consortia), απομονώθηκε πρώτα από μεγάλο βάθος της θάλασσας και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, πράγμα το οποίο την καθιστά ανθεκτική σε διαφορετικές πιέσεις (piezotolerant).

Στο διάλυμα του συνθετικού θαλασσινού νερού, προστέθηκε επίσης διάλυμα αζώτου και φωσφόρου ως θρεπτικά, καθώς και πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, σε αναλογία C:N:P 100:10:1. Η αναλογία του πετρελαίου και του όγκου της υγρής καλλιέργειας ήταν 0,5% w/v. Δηλαδή στα 100 mL υγρού όγκου καλλιέργειας έχουμε 0,5 g crude oil, 0,05 g N και

0,005 g P. Η πυκνότητα του πετρελαίου ήταν 0,8232 g/mL. Επίσης, να σημειωθεί ότι το πετρέλαιο προέρχεται από την περιοχή του Καζακστάν και χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο στα διαλύματα.

Παρασκευή διαλύματος ONR7:

Για την παρασκευή του συνθετικού θαλασσινού νερού ONR7 παρασκευάστηκαν αρχικά τρία πυκνά διαλύματα. Όλα τα διαλύματα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε θερμοκρασία 120 °C και σε πίεση 1.1 bar για 40 λεπτά.

<i>Διάλυμα 1 (σε 1L H₂O)</i>	<i>Διάλυμα 2 (σε 500 mL H₂O)</i>	<i>Διάλυμα 3 (σε 100 mL H₂O)</i>
NaCl 113,95 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O 55,9 g	FeCl ₂ x 4H ₂ O 10 mg
Na₂SO₄ 19,9 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O 7,3 g	
KCl 3,6 g	SrCl ₂ x 6H ₂ O 120 mg	
NaBr 415 mg		
NaHCO₃ 155 mg		
H₃BO₃ 135 mg		
FeCl₂ x 4H₂O 10 mg		
NaF 13 mg		
NH₄Cl 0,35 g		
Na₂HPO₄ x 7H₂O 445 mg		

1. Ανάμειξη 200 mL από το διάλυμα 1 με 133 mL απιονισμένου νερού και ρύθμιση του pH στο 7,6 με χρήση διαλύματος NaOH (2M).
2. Προσθήκη 100 mL από το διάλυμα 2.
3. Προσθήκη 20 mL από το διάλυμα 3.
4. Προσθήκη 446 mL απιονισμένου νερού.

Το τελικό διάλυμα ONR7 αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1bar για 40 λεπτά.

Παρασκευή διαλύματος N-P 50x (συμπυκνωμένο):

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού επιλέχθηκε η συγκέντρωση του αζώτου να είναι 0,05 g/L και η συγκέντρωση του φωσφόρου 0,005 g/L. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα KNO_3 και K_2HPO_4 με μοριακό βάρος 101,10 g/mol και 174,18 g/mol αντίστοιχα. Με βάση το μοριακό βάρος του αζώτου (14 g) και του φωσφόρου (30,9gr) που περιέχονται στα αντίστοιχα άλατα, προέκυψε ότι χρειάζονται 36,10 g KNO_3 και 2,81 g K_2HPO_4 σε 100 mL απιονισμένου νερού. Για το συμπυκνωμένο διάλυμα 50x αραιώνουμε το παραπάνω διάλυμα (100x) σε επιπλέον 100 mL απιονισμένου νερού (δηλαδή τελικός όγκος διαλύματος 200ml). Το τελικό διάλυμα N-P αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120 °C και πίεση 1.1 bar για 40 λεπτά.

2.4.1. Πειράματα σε ατμοσφαιρική πίεση

a. Σύνθεση δείγματος crude oil

Οι αναλογίες των συστατικών που συνθέτουν το διάλυμα είναι οι εξής:

- 150 mL διάλυμα ONR7
- 6 mL διάλυμα N-P 50x
- 1 mL crude oil
- 2 mL consortia

Η διαδικασία γίνεται σε μικροβιολογικό απαγωγό με χρήση αποστειρωμένων σκευών. Σε 150 mL ONR7 προσθέτουμε 6 mL N-P, δόση η οποία είναι ενισχυμένη καθώς η κανονική δόση είναι 3ml. Επίσης, υπολογίζουμε ότι 0,5 g πετρελαίου (crude oil) στα 100 mL είναι 0,915 ml ~1 mL στα 150ml, ποσότητα την οποία προσθέτουμε στο ONR7. Τέλος, προσθέτουμε και τα consortia, ποσότητα των 2 mL. Χρησιμοποιήθηκαν 2 αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως των 400ml. Τέλος, τοποθετούμε τα ποτήρια σε συσκευή ανάδευσης σε χώρο κατάλληλο διαμορφωμένο για επώαση (ελαφρά σκοτεινό με θερμοκρασία σταθερή στους 20 °C) σε συνεχή ανάδευση στις 120 rpm.

Η δειγματοληψία έγινε στο τέλος του πειράματος, μετά από 14 ημέρες, όπου και εκχυλίσουμε όλη την ποσότητα από κάθε δοχείο.

Ύστερα από τις πρώτες 3 μέρες τα δείγματα των μικροοργανισμών καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, αναμένοντας την ανάπτυξη τους.

Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος marine broth:

Λόγω του ότι μελετούμε θαλάσσιους μικροοργανισμούς, το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας τους θα πρέπει να έχει το αντίστοιχο υπόβαθρο. Οπότε, για την παρασκευή αυτού του διαλύματος χρειάστηκαν 15 g agar και 40,25 g Zobell Marine Broth 2216 σε 1 L απιονισμένου νερού. Το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε θερμοκρασία 120 °C και πίεση 1.1 bar για 40 λεπτά. Ύστερα, το διάλυμα μοιράστηκε ισόποσα σε τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ψυγείο ώστε να στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό.

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν στην καλλιέργεια, όταν επιστρωθούν σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο, σχηματίζουν ορατές και ξεχωριστές αποικίες. Επιλέχθηκε λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στο δείγμα. Οι αραιώσεις έγιναν σε διάλυμα ONR7.

b. Σύνθεση δείγματος diesel oil

Οι αναλογίες των συστατικών που συνθέτουν το διάλυμα είναι οι εξής:

- 200 mL διάλυμα ONR7
- 3 mL διάλυμα N-P 50x
- 1,22 mL diesel oil
- 0,8 mL consortia

Η διαδικασία γίνεται σε μικροβιολογικό απαγωγό με χρήση αποστειρωμένων σκευών. Σε 200 mL ONR7 προσθέτουμε 3 mL N-P. Επίσης, υπολογίζουμε ότι 0,5 g diesel στα 100 mL είναι 0,061ml, οπότε 1,22 mL στα 200 mL, ποσότητα την οποία προσθέτουμε στο ONR7. Τέλος, προσθέτουμε και τα consortia, ποσότητα των 0,8ml. Χρησιμοποιήθηκαν 2 αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως των 400ml. Τέλος, τοποθετούμε τα ποτήρια σε συσκευή ανάδευσης σε χώρο κατάλληλο διαμορφωμένο για επώαση (ελαφρά σκοτεινό με θερμοκρασία σταθερή στους 20°C) σε συνεχόμενη ανάδευση στις 120rpm.

Οι δειγματοληψίες ήταν εβδομαδιαίες, δηλαδή κάθε 7 ημέρες λαμβάναμε 15 mL από κάθε δοχείο για τις χημικές αναλύσεις (30 mL συνολικά κάθε φορά).

Ύστερα από τις πρώτες 3 μέρες επαναλάβαμε την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων, όπου τα δείγματα των μικροοργανισμών καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, αναμένοντας την ανάπτυξη τους.

2.4.2. Πειράματα σε υψηλή πίεση

a. Σύνθεση δείγματος *diesel oil*

Οι αναλογίες των συστατικών που συνθέτουν το διάλυμα στον αντιδραστήρα υψηλής πίεσης είναι οι εξής:

- 600 mL ONR7
- 4 mL diesel oil
- 12 mL N-P
- 6,5 mL consortia

Θέσαμε σε λειτουργία τον αντιδραστήρα, αυξάνοντας την πίεση στα 100bar, παρέχοντας 50bar άζωτο και 50bar μίγμα ατμοσφαιρικού αέρα. Ακόμη, με τη βοήθεια του ανακυκλοφορητή νερού η θερμοκρασία μειώθηκε στους 14°C, η οποία διατηρήθηκε σταθερή. Επίσης, οι στροφές ανάδευσης του δοχείου επιλέχθηκαν στις 60rpm.

Κατά την δειγματοληψία αυξάναμε τις στροφές στις 200rpm για να πάρουμε το δείγμα του πετρελαίου των 60 mL συνολικά (30 mL κάθε δείγμα). Αντίθετα, για το δείγμα των μικροοργανισμών διακόπταμε τελείως την ανάδευση, ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο καθαρό από πετρέλαιο. Στη συνέχεια, το δείγμα αυτό, το οποίο διατηρούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4%, αναλυόταν με τη διαδικασία της βαφής acridine orange, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία.

2.5. Κύρια πειράματα υψηλής πίεσης

a. 1^ο πείραμα: Αυτόχθονες + Πιεζοφιλικοί μικροοργανισμοί (*Indigenous + Consortia*)

Το πρώτο από τα δύο κύρια πειράματα της εργασίας αυτής, είχε διάρκεια 28 ημέρες και η σύνθεση του διαλύματος ήταν η εξής:

- 600 mL φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό
- 5 mL πιεζοφιλικά (piezotolerant) consortia
- 3 mL crude oil

Το διάλυμα λόγω του ότι είχε φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό (και όχι αποστειρωμένο) περιείχε και τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς της περιοχής. Ο αντιδραστήρας τέθηκε σε λειτουργία σε πίεση 100 bar, σε στροφές 60 rpm με συνεχή ανάδευση και θερμοκρασία στους 14°C.

Το σενάριο λοιπόν του πειράματος αυτού ήταν η παρακολούθηση της βιοαποδόμησης του πετρελαίου στην περίπτωση που στο υδάτινο θαλασσινό περιβάλλον με τους ενδογενείς/αυτόχθονες

μικροοργανισμούς, προσθέσουμε επιπλέον μικροοργανισμούς, οι οποίοι προέρχονται από μεγάλο θαλάσσιο βάθος και είναι καλλιεργημένοι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ώστε να είναι ανθεκτικοί σε διαφορετικές πιέσεις.

Με άλλα λόγια, εξετάζουμε εάν η πληθώρα και ποικιλία σε μικροοργανισμούς καταφέρει να αποδώσει στον καθαρισμό του πετρελαίου, ή εάν τελικά θα έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Εάν δηλαδή θα καταλήξει σε συνεργασία ή θα οδηγήσει σε ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών.

Να σημειωθεί επίσης, ότι σε αυτό το πείραμα δεν προστέθηκε επιπλέον άζωτο και φώσφορος (N-P) ως θρεπτικά, καθώς σκοπός ήταν να παρατηρήσουμε εάν με το υπάρχον υπόβαθρο σε θρεπτικά από το θαλασσινό νερό (Mediterranean background), καταφέρουν οι μικροοργανισμοί να τραφούν και να αποδομήσουν το πετρέλαιο.

Η δειγματοληψία ήταν εβδομαδιαία (στις 0, 7, 14, 21, 28 ημέρες) και λαμβάναμε από 30 mL σε διπλή ποσότητα για την χημική ανάλυση, αυξάνοντας τις στροφές στις 100 rpm, ενώ για την μικροβιακή ανάλυση, με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας, η οποία περιείχε 10 mL φορμαλδεΰδης, λαμβάναμε διάλυμα 10 mL μικροοργανισμών με μηδενική ανάδευση. Να σημειωθεί ότι η φορμαλδεΰδη είναι εξαιρετικά χρήσιμη, καθώς βοηθάει στη διατήρηση των κυττάρων των βιολογικών οργανισμών ^[27].

b. 2^ο πείραμα: Πιεζοφιλικοί μικροοργανισμοί με ενίσχυση θρεπτικών (Consortia + N-P)

Το 2^ο από τα δύο κύρια πειράματα, είχε και αυτό χρονική διάρκεια 28 ημέρες και η σύνθεση του διαλύματος που καλλιεργήθηκε στον αντιδραστήρα ήταν η εξής:

- 600 mL φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό από τον Άγιο Ονούφριο
- 5 mL consortia
- 3 mL crude oil
- 12 mL N-P

Το διάλυμα καλλιεργήθηκε στον αντιδραστήρα σε πίεση 100 bar, σε στροφές 60 rpm με συνεχή ανάδευση και θερμοκρασία στους 14°C.

Το σενάριο αυτό, αρχικά, είχε σκοπό την προσθήκη μονάχα των consortia σε αποστειρωμένο νερό, ώστε να μην υπάρχουν αυτόχθονες μικροοργανισμοί, χωρίς την επιπλέον προσθήκη θρεπτικών N-P. Με αυτόν τον τρόπο, τα δύο πειράματα θα ήταν συγκρίσιμα ως προς την δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Μετά τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος, αποφασίσαμε να προσθέσουμε θρεπτικά και να ενισχύσουμε τους μικροοργανισμούς στην γρηγορότερη αποδόμηση του πετρελαίου.

Η δειγματοληψία ήταν εβδομαδιαία (στις 0, 7, 14, 21, 28 ημέρες) και λαμβάναμε από 30 mL σε διπλή ποσότητα για την χημική ανάλυση, αυξάνοντας τις στροφές στις 100rpm, ενώ για την μικροβιακή ανάλυση, με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας, η οποία περιείχε 10 mL φορμαλδεΰδης, λαμβάναμε διάλυμα 10 mL μικροοργανισμών με μηδενική ανάδευση.

Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα πειραμάτων

Μετά το πέρας των χημικών και βιολογικών αναλύσεων των δειγμάτων, περάσαμε στην επεξεργασία των χρωματογραφημάτων με το πρόγραμμα του GC/MS Data Analysis και στην εισαγωγή και περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων με το υπολογιστικό πρόγραμμα Excel.

Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα από την διόρθωση των χρωματογραφημάτων, δηλαδή οι συγκεντρώσεις των στοιχείων κάθε δείγματος, αποθηκεύονται σε ένα αρχείο text, το οποίο εισάγουμε στο excel. Στη συνέχεια, διαιρούμε τις συγκεντρώσεις αυτές (μονάδες ppm-parts per million) με τις ποσότητες των εκχυλισμάτων από κάθε δείγμα (extracts), ώστε να ανάγουμε τις συγκεντρώσεις αυτές στην ποσότητα του δείγματος που έχουμε, δηλαδή προκύπτει $\frac{ppm}{gr\ extract}$.

Αυτές τις τιμές τις διαιρούμε με τη συγκέντρωση του χοπανίου (17a21b_hopane), η οποία λειτουργεί ως διορθωτικός παράγοντας. Οπότε προκύπτει $\frac{\frac{ppm\ A}{gr\ extract}}{\frac{ppm\ hopane}{gr\ extract}}$, όπου A ένα στοιχείο. Για

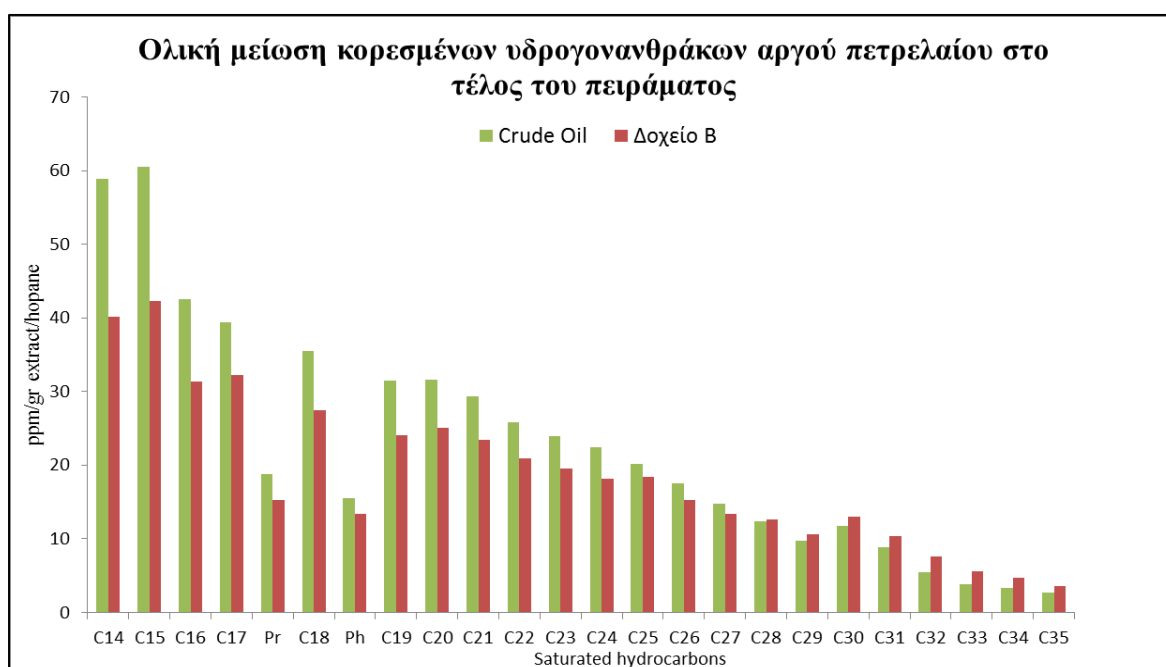
να ποσοτικοποιήσουμε τις διαφορές από μέρα σε μέρα (δηλαδή από δείγμα σε δείγμα) δημιουργούμε γραφήματα με τις διορθωμένες συγκεντρώσεις ως προς το χοπάνιο, για κάθε πείραμα ξεχωριστά. Επίσης, να αναφερθεί ότι ανά ημέρα έχουν ληφθεί υπόψη οι μέσοι όροι των τιμών των δειγμάτων, διότι σε κάθε δειγματοληψία λαμβάναμε διπλή ποσότητα δείγματος.

Επίσης, στο τέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες από την εφαρμογή της βαφής *Acridine Orange* και απεικονίζονται τα βαμμένα κύτταρα των μικροοργανισμών από τα δείγματα του αντιδραστήρα.

3.2. Πειράματα σε ατμοσφαιρική πίεση

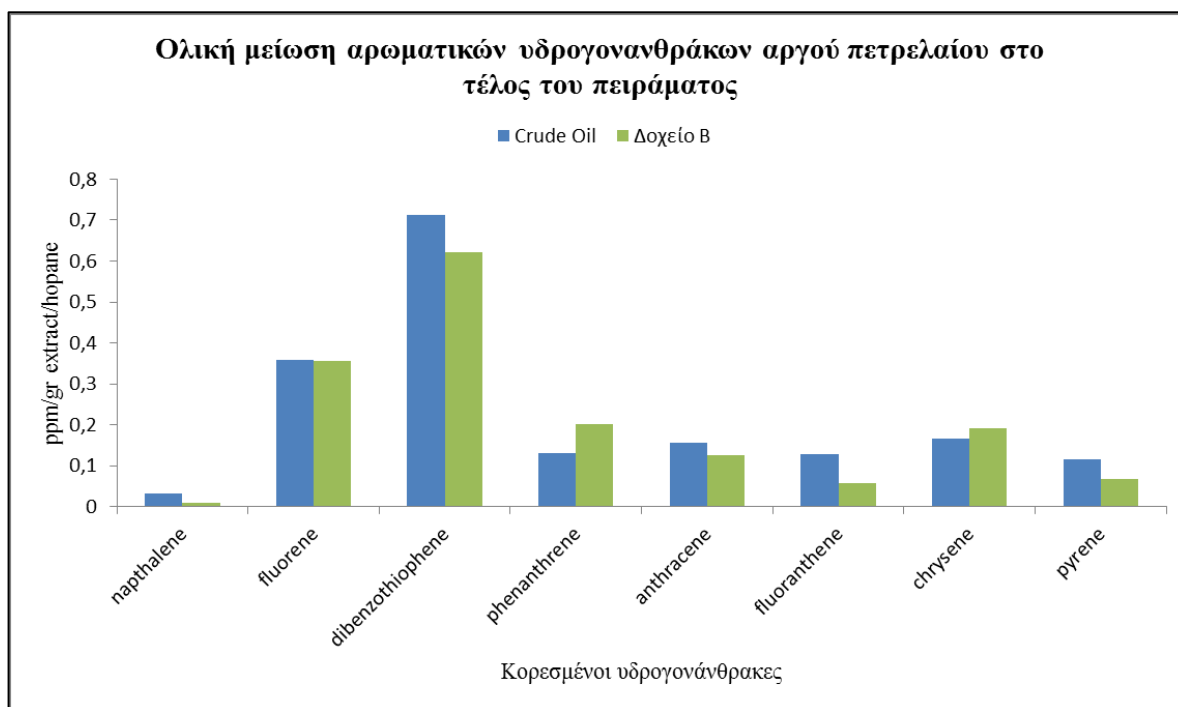
3.2.1. Crude oil

Το γράφημα για το πρώτο πείραμα σε ατμοσφαιρική πίεση, απεικονίζει την διαφορά στο κλάσμα των κορεσμένων υδρογονανθράκων μεταξύ του αρχικού εκχυλίσματος του αργού πετρελαίου και του τελικού εκχυλίσματος του δοχείου B μετά το πέρας του πειράματος στις 14 μέρες. Δηλαδή εκχυλίσουμε όλη τη ποσότητα του δοχείου B, ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε αρχικό με τελικό. Παρατηρούμε ότι υπάρχει μια μείωση της τάξης του 20% (μέσος όρος ποσοστού από όλα τα στοιχεία). Εάν η χρονική διάρκεια του πειράματος ήταν μεγαλύτερη ίσως να είχε παρατηρηθεί ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης. Επίσης, στο πείραμα αυτό λόγω περιορισμένου χρόνου δεν έχουμε εικόνα εβδομαδιαίων δειγματοληψιών, όπως με τα άλλα πειράματα, ώστε να έχουμε εικόνα για την γενική πορεία της διαλυτοποίησης του πετρελαίου στην υδατική φάση.



Γράφημα 1: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος αργού πετρελαίου / Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε ατμοσφαιρική πίεση)

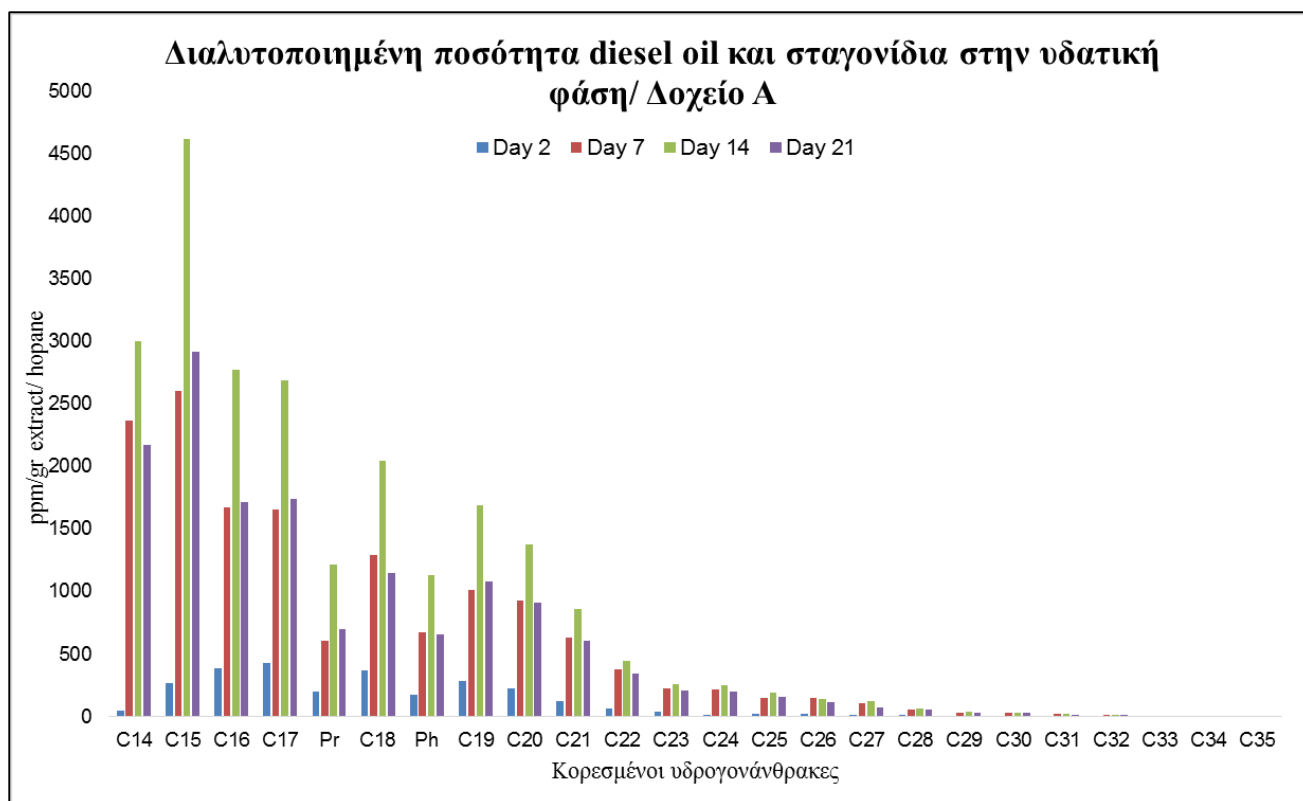
Και στο διάγραμμα του κλάσματος των αρωματικών υδρογονανθράκων παρατηρούμε μείωση μεταξύ αρχικού και τελικού εκχυλίσματος, με κάποιες τιμές να παρουσιάζουν σφάλμα και να φαίνονται αυξημένες. Οι τιμές των συγκεντρώσεων είναι αρκετά μικρές, καθώς δεν ξεπερνούν το 1 ppm.



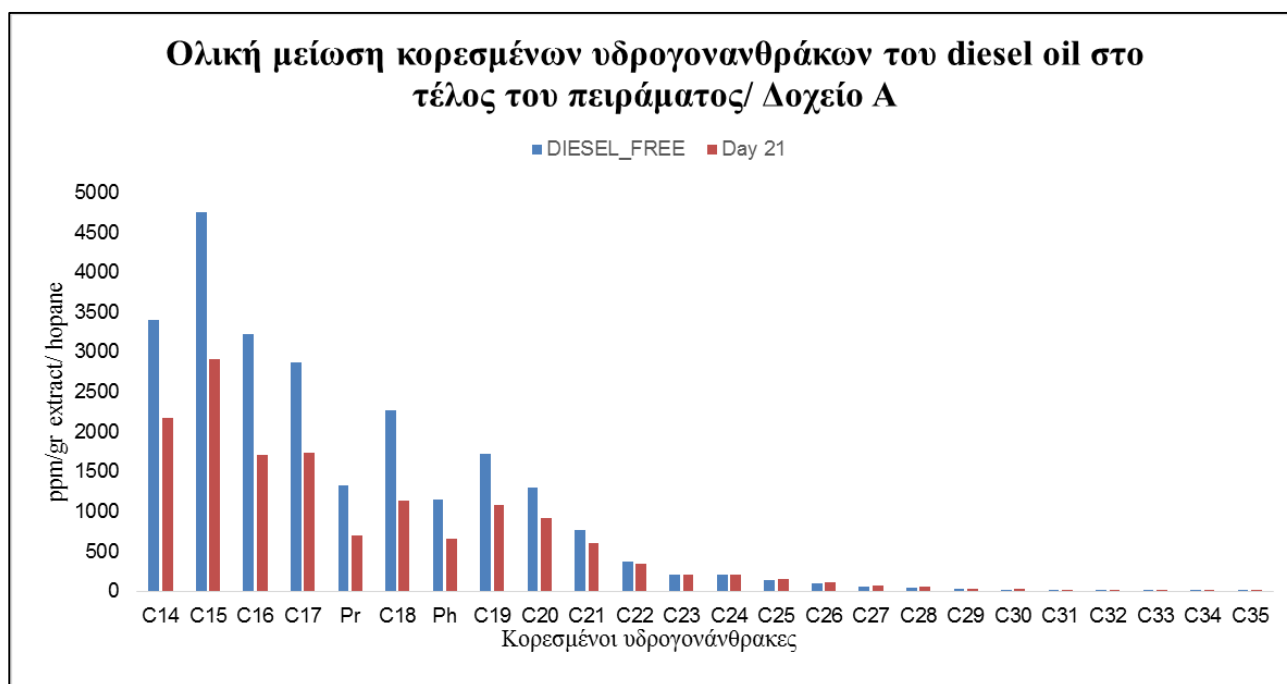
Γράφημα 2: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος αργού πετρελαίου / Αρωματικοί υδρογονάνθρακες σε ατμοσφαιρική πίεση)

3.2.2. Diesel Oil

Στο δοχείο Α, για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες, παρατηρούμε μια αύξηση της διαλυτοποίησης από την ημέρα 2 και μέχρι την ημέρα 14. Αντίθετα, την ημέρα 21 υπάρχει μείωση, σε αντίστοιχα επίπεδα με την ημέρα 7. Οι τιμές των συγκεντρώσεων γενικά του diesel κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα. Επίσης, να αναφερθεί ότι ανά ημέρα έχουν ληφθεί υπόψη οι μέσοι όροι των τιμών των δειγμάτων, διότι σε κάθε δειγματοληψία λαμβάναμε διπλή ποσότητα δείγματος. Ακόμη στο επόμενο διάγραμμα παρατηρούμε την ολική μείωση μεταξύ αρχικού και τελικού εκχυλίσματος του δοχείου Α. Το ποσοστό μείωσης είναι στο 9,7% (μέσος όρος ποσοστού από όλα τα στοιχεία).

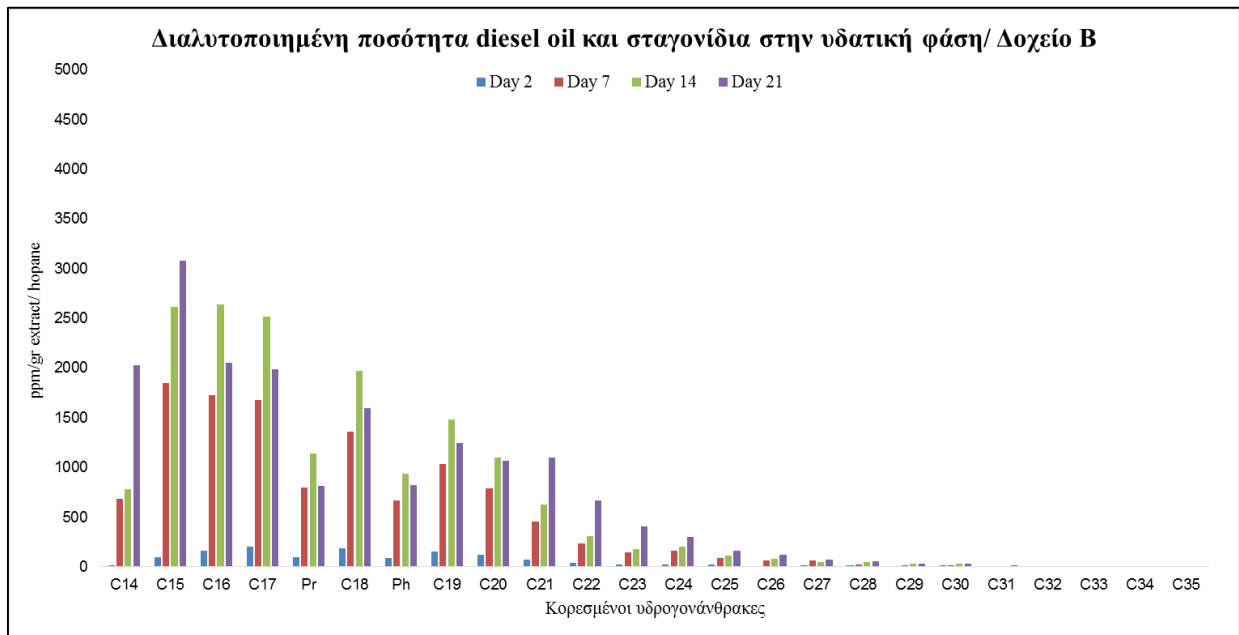


Γράφημα 3: Συνολική εικόνα ανά δειγματοληψία/ Δοχείο Α/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε ατμοσφαιρική πίεση)

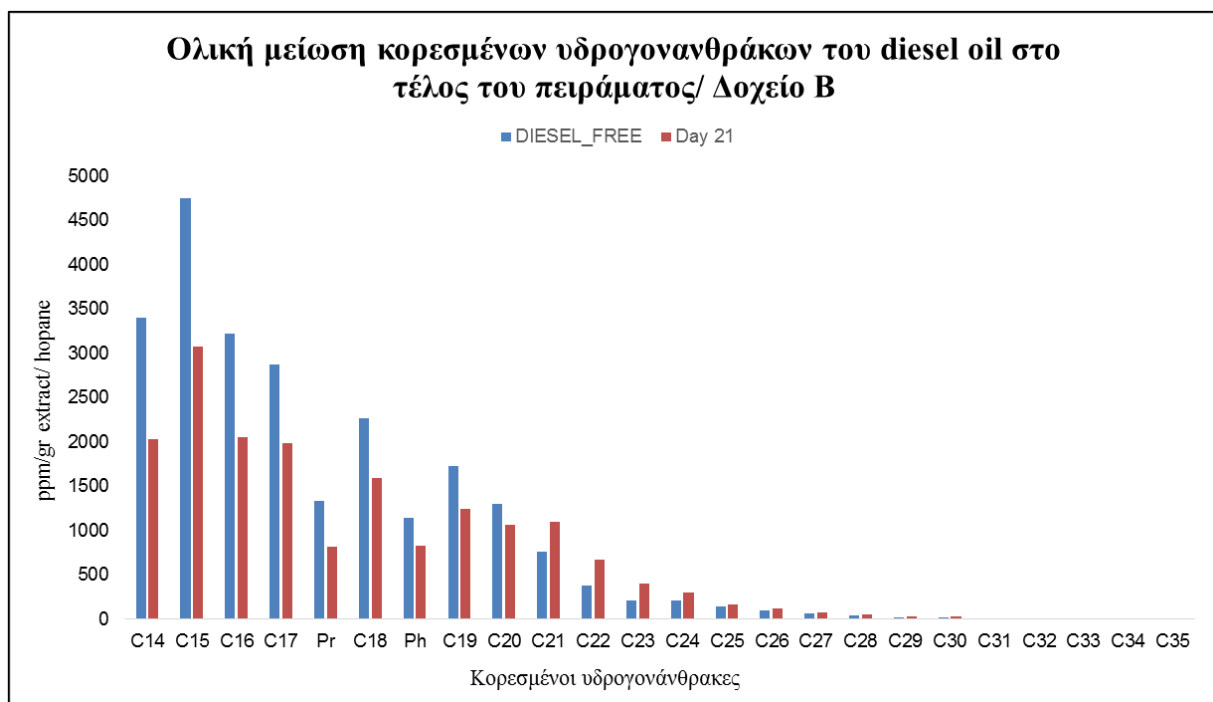


Γράφημα 4: : Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος diesel oil / Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε ατμοσφαιρική πίεση)

Στο δοχείο B, παρατηρούμε και εδώ πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά χαμηλότερες από του δοχείου A. Και εδώ υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά, δηλαδή αύξηση της διαλυτοποίησης από την ημέρα 2 μέχρι και την 14 (εκτός από κάποιες εξαιρέσεις π.χ. C14, C15, C21, C22, C23), με τη διαφορά ότι η ημέρα 21 κυμαίνεται σε υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ημέρα 7. Επίσης, στο διάγραμμα παρατηρούμε την ολική μείωση μεταξύ αρχικού και τελικού εκχυλίσματος του δοχείου B με το ποσοστό μείωσης να προκύπτει 8,8% (μέσος όρος ποσοστού από όλα τα στοιχεία).



Γράφημα 5: Συνολική εικόνα ανά δειγματοληψία/ Δοχείο B/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε ατμοσφαιρική πίεση)

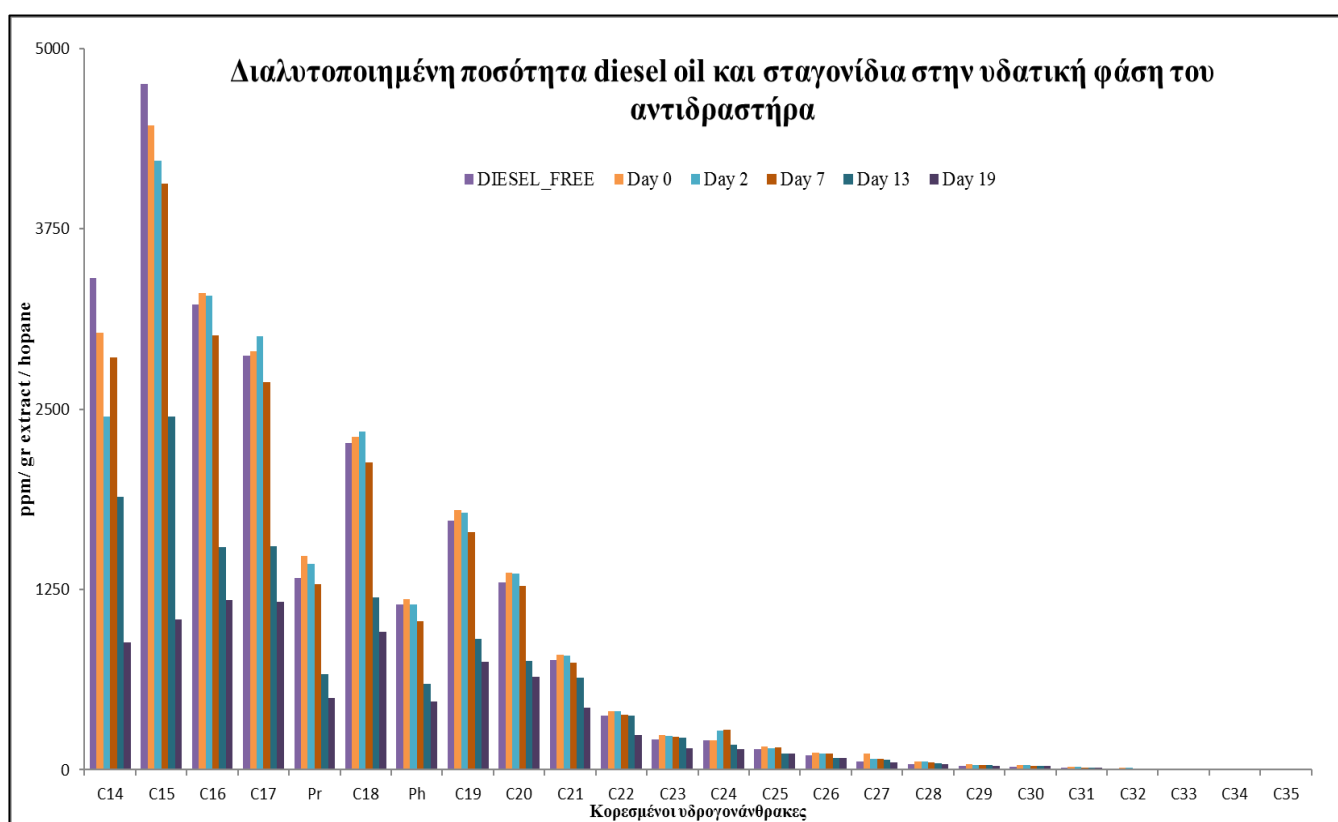


Γράφημα 6: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος diesel oil / Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε ατμοσφαιρική πίεση)

3.3. Πειράματα σε υψηλή πίεση

3.3.1. Diesel Oil

Στο πείραμα αυτό, οι τιμές των συγκεντρώσεων από την ημέρα 0 έως και την ημέρα 7 κυμαίνονται σε πολύ κοντινά επίπεδα, ενώ στις ημέρες 2 και 7 παρατηρείται λίγο πιο αυξημένη η διατολυποίηση στα περισσότερα στοιχεία και αντίστοιχα μείωση τις μέρες 13. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του ντίζελ, πιθανόν να οφείλονται στο συνδυασμό πολλών στρωφών στην ανάδευση κατά τη δειγματοληψία από τον αντιδραστήρα (200 rpm) και στο γεγονός ότι το ντίζελ είναι ελαφρύ κλάσμα πετρελαίου. Πιθανόν δηλαδή να λαμβάναμε μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτοποιημένου ντίζελ.

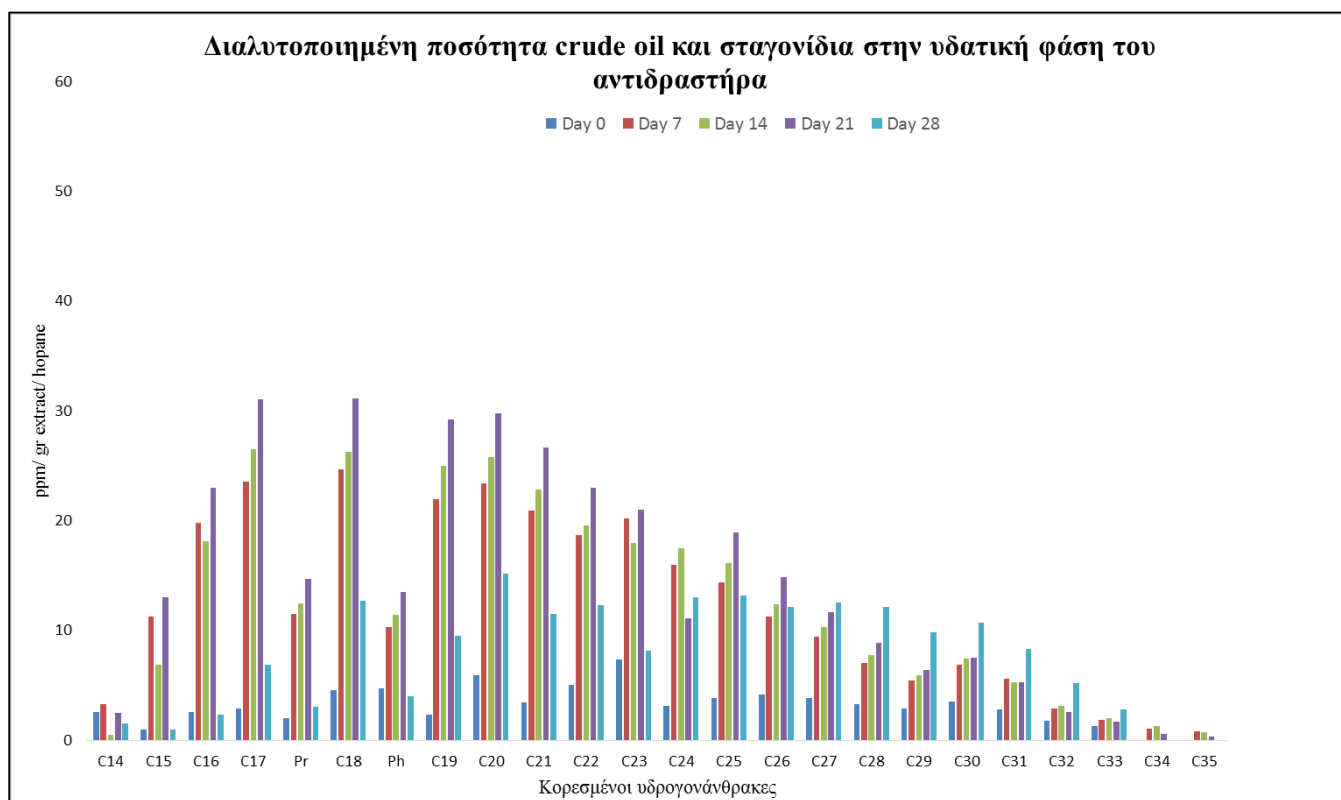


Γράφημα 7: Συνολική εικόνα ανά δειγματοληψία/ Diesel Oil / Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)

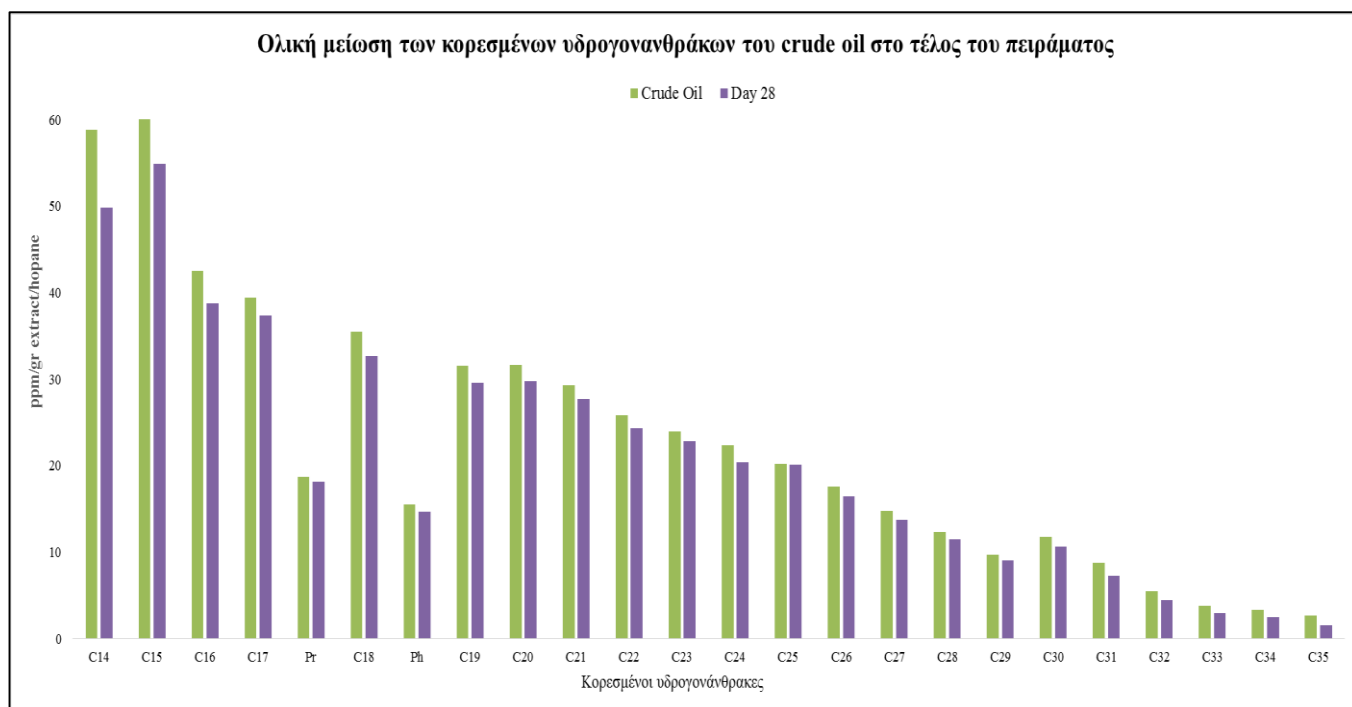
3.3.2. Crude Oil

a. Indigenous + Piezophilic Consortia

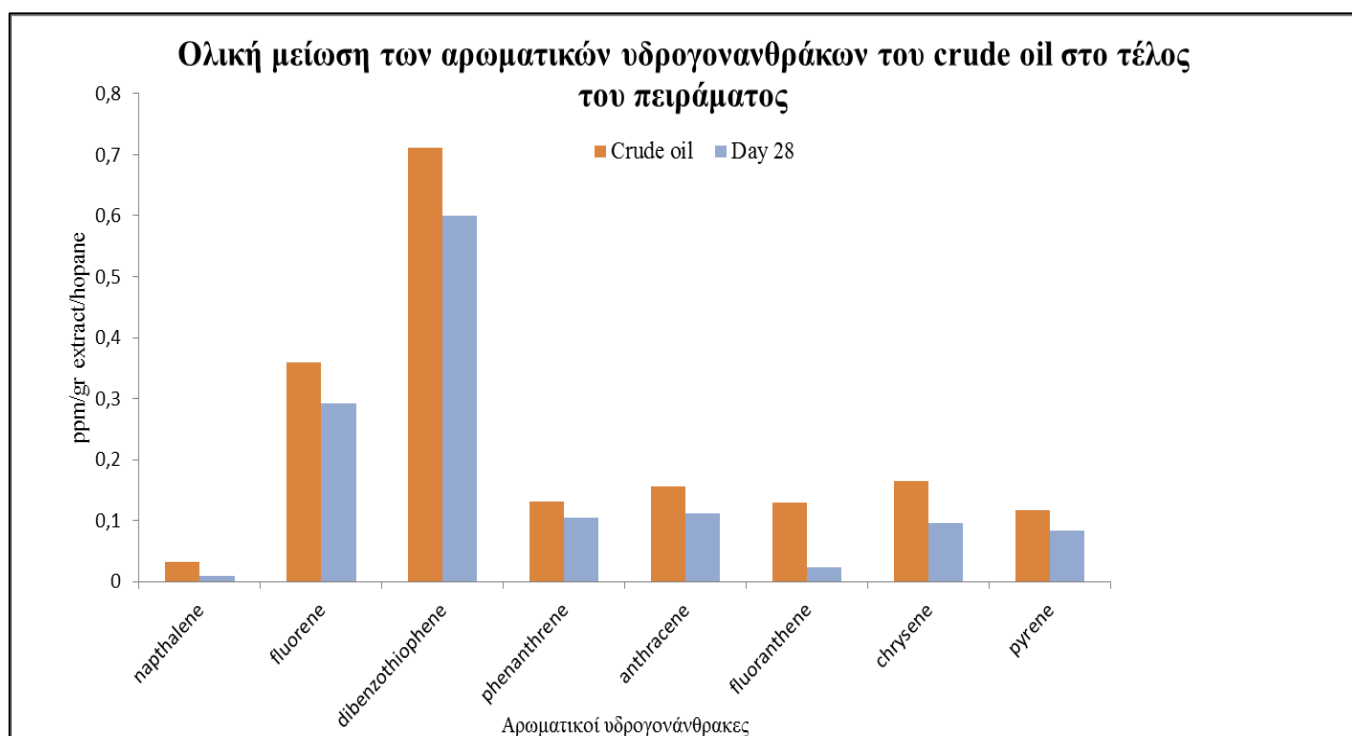
Σε αυτό το πείραμα, συμμετείχαν και αυτόχθονες μικροοργανισμοί μαζί με τους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς. Οπότε τα ενδεχόμενα ήταν δύο, είτε συνεργασία μεταξύ των μικροοργανισμών, είτε ανταγωνισμός για την επικράτηση. Επίσης, πολύ πιθανόν, οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί να μην άντεξαν την διαφορά πίεσης, καθώς το θαλασσινό νερό το οποίο τους φιλοξενούσε και χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα, προήλθε από μικρό βάθος. Η τάση που παρατηρείται είναι αύξηση της διαλυτοποίησης από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 21 και μείωση την ημέρα 28. Στα επόμενα διαγράμματα παρατηρούμε την διαφορά στο κλάσμα των κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων μεταξύ του αρχικού εκχυλίσματος του αργού πετρελαίου και του τελικού εκχυλίσματος του εναπομείναντος τελικού όγκου του διαλύματος στον αντιδραστήρα, μετά το πέρας του πειράματος στις 28 μέρες. Παρατηρούμε ότι η ολική μείωση είναι της τάξης του 12% στους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (μέσος όρος ποσοστού από όλα τα στοιχεία).



Γράφημα 8: Συνολική εικόνα ανά δειγματοληψία/ Crude oil/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)



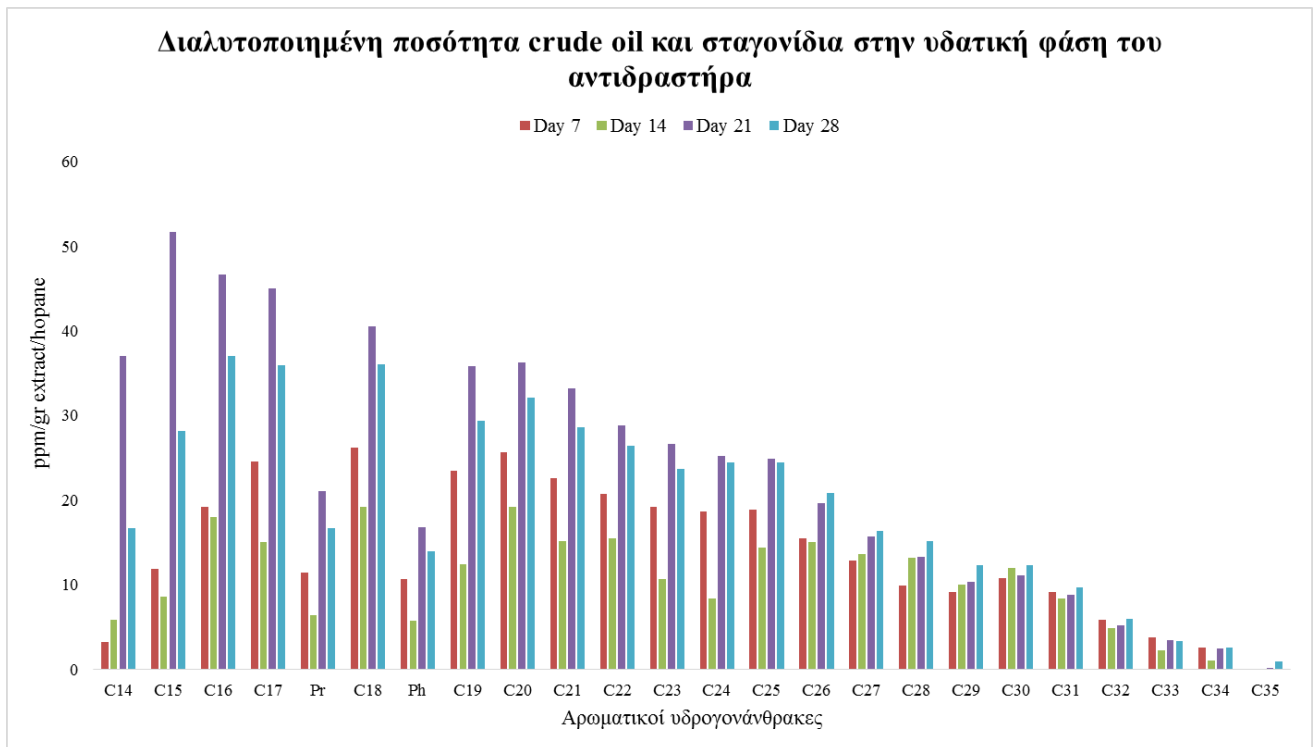
Γράφημα 9: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος αργού πετρελαίου / Crude oil/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)



Γράφημα 10: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος αργού πετρελαίου / Crude oil/ Αρωματικοί υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)

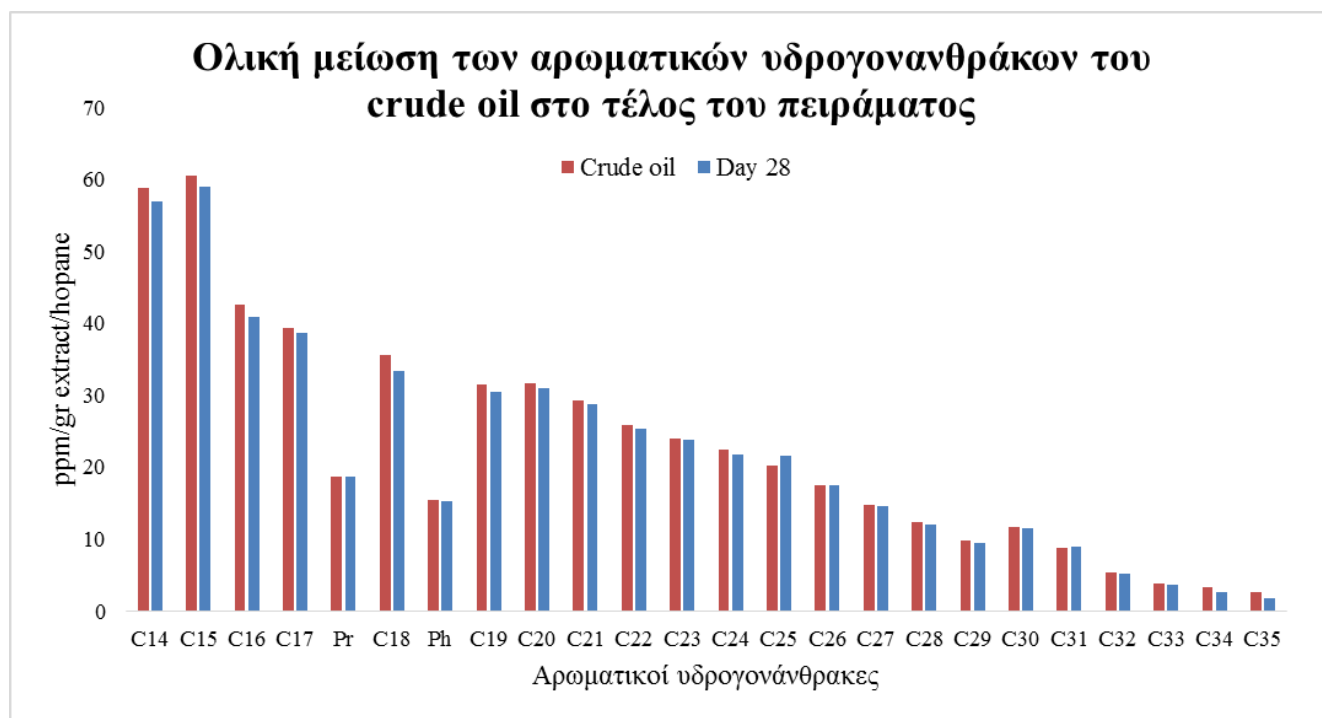
b. Consortia + Ενίσχυση με θρεπτικά N-P

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε μόνο τους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και τους ενισχύσαμε με θρεπτικά. Παρατηρείται και πάλι η ίδια τάση με το προηγούμενο πείραμα (pattern), δηλαδή αύξηση της διαλυτοποίησης από την ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 21 και μείωση την ημέρα 28. Με τη διαφορά όμως ότι οι συγκεντρώσεις εδώ κυμαίνονται σε λίγο πιο υψηλά επίπεδα.



Γράφημα 11: Συνολική εικόνα ανά δειγματοληψία/ Crude oil/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)

Και πάλι το τελικό διάγραμμα που απεικονίζει την διαφορά στο κλάσμα των κορεσμένων υδρογονανθράκων μεταξύ του αρχικού εκχυλίσματος του αργού πετρελαίου και του τελικού εκχυλίσματος του εναπομείναντος τελικού όγκου του διαλύματος στον αντιδραστήρα, μετά το πέρας του πειράματος στις 28 μέρες. Παρατηρούμε ότι υπάρχει μια μείωση της τάξης του 4,7% (μέσος όρος ποσοστού από όλα τα στοιχεία), ένα αρκετά ελάχιστο ποσοστό.



Γράφημα 12: Διαφορά αρχικού και τελικού εκχυλίσματος αργού πετρελαίου / Crude oil/ Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (σε υψηλή πίεση)

Παρατηρήθηκε ότι και τα δύο πειράματα ακολούθησαν ένα παρόμοιο μοτίβο, δηλαδή αύξηση της διαλυτοποίησης στην υδατική φάση, από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 21 και μείωση μέχρι την ημέρα 28, όπου ήταν και το πέρας των πειραμάτων. Επίσης, η συνολική μείωση των υδρογονανθράκων μέσα σε αυτό το διάστημα ήταν της τάξης του 12% για το πρώτο πείραμα και 4,7% για το δεύτερο αντίστοιχα, διαφορά περίπου στο 1/3. Σημαντική όμως διαφορά μεταξύ των δύο πειραμάτων ήταν οι τιμές των συγκεντρώσεων στα διαγράμματα της διαλυτοποίησης, με τις συγκεντρώσεις στο πρώτο πείραμα να μην ξεπερνούν τα 30 ppm, ενώ στο δεύτερο να έχουμε και τιμές που ξεπερνούν και τα 40 ppm.

Επίσης, η μεγάλη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων του ντίζελ και του αργού πετρελαίου (από μία έως δύο τάξεις μεγέθους διαφορά) που παρατηρείται, πιθανόν να οφείλονται στο συνδυασμό πολλών στροφών στην ανάδευση κατά τη δειγματοληψία από τον αντιδραστήρα (200 rpm) και στο γεγονός ότι το ντίζελ είναι ελαφρύ κλάσμα πετρελαίου. Αντίθετα, κατά τη δειγματοληψία του δείγματος του αργού πετρελαίου από τον αντιδραστήρα οι στρόφες ανάδευσης ήταν στις 100rpm. Πιθανόν δηλαδή να λαμβάναμε μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτοποιημένου ντίζελ κα λιγότερη αργού πετρελαίου.

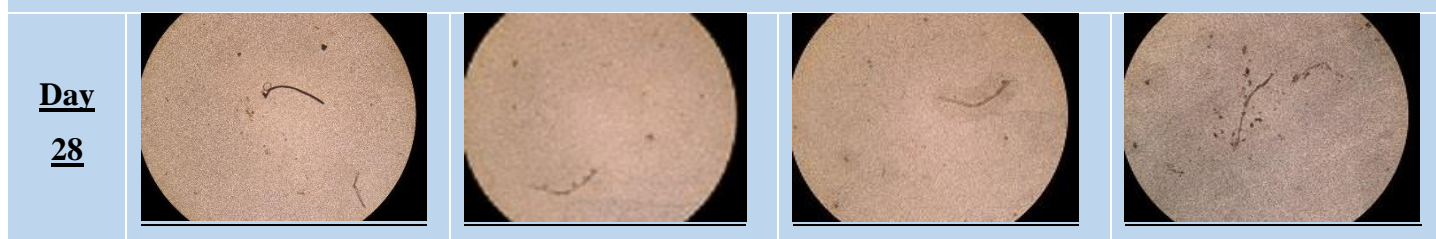
3.4. Ενδεικτικά αποτελέσματα εφαρμογής της βαφής *Acridine orange* στα κύτταρα των μικροοργανισμών και των επώσεων των δειγμάτων σε τρυβλία

Οι εικόνες που ακολουθούν είναι από τα κύρια πειράματα σε υψηλή πίεση:

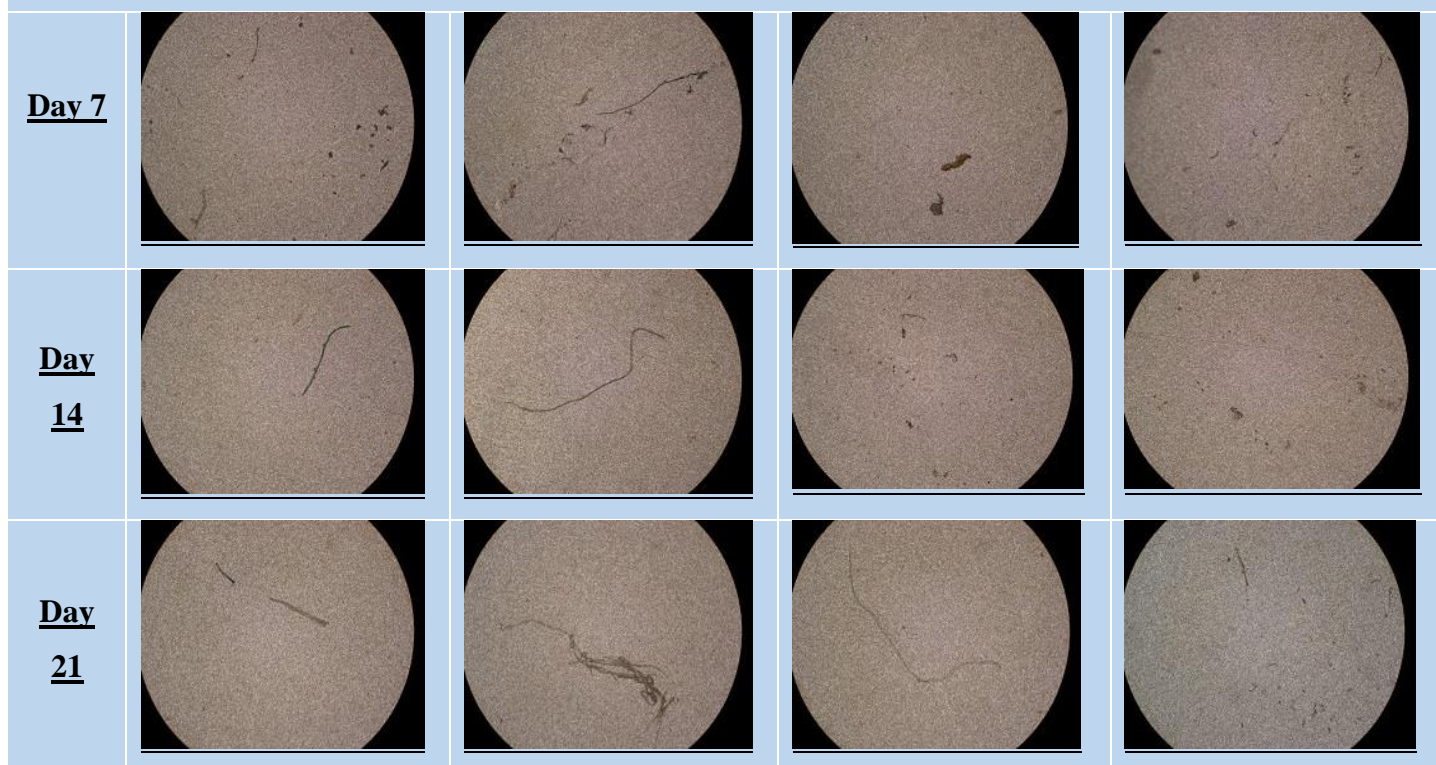
- αυτόχθονες + πιεζοφιλικόι μικροοργανισμοί,
- πιεζοφιλικόι μικροοργανισμοί με θρεπτικά

Στις απεικονίσεις από το μικροσκόπιο παρατηρούμε τις ‘κορδέλες’ (ribbons) που σχηματίζουν οι μικροοργανισμοί και όπως αναφέρθηκε, δημιουργούνται κατά την δειγματοληψία όταν πραγματοποιείται εκτόνωση του αντιδραστήρα. Με άλλα λόγια οι κορδέλες αυτές είναι συσσωματώματα κυττάρων που δεν έχουν προλάβει να διαιρεθούν. Ακόμη, εντοπίζουμε και ξεχωριστά βαμμένα κύτταρα.

Πείραμα HP Indigenous + Consortia



Πείραμα HP Consortia + NP



Όσον αφορά την καλλιέργεια των πειραμάτων σε ατμοσφαιρική πίεση, η επώαση των δειγμάτων στα τρυβλία υποθέτουμε ότι επιβεβαιώνει την επιβίωση διαφορετικών μικροβιακών στελεχών, καθώς εμφανίζονται αποικίες διαφορετικού χρώματος (πορτοκαλί και κίτρινες). Ουσιαστικά αυτό επιζητούμε διότι η καλλιέργεια έγινε με consortium, δηλαδή με συνεργασία πολλών μικροοργανισμών.



Εικόνα 20: Αποικίες μικροοργανισμών μετά από επώαση

Η τεχνική της *Acridine Orange* αποδείχθηκε θετική για τις καλλιέργειες σε υψηλή πίεση, καθώς είχε επιτυχημένα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες τεχνικές που δοκιμάστηκαν, όπως ο καθορισμός της βιομάζας με χρήση φυγόκεντρου.

Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα και συζήτηση

4.1. Τελικά συμπεράσματα

Αρχικά, στο πείραμα που μελετήθηκε στην ατμοσφαιρική πίεση με τους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και το αργό πετρέλαιο, παρατηρήθηκε μια μείωση των υδρογονανθράκων στις 14 μέρες, αλλά πιθανόν οι μικροοργανισμοί αυτοί να μην λειτουργούν αρκετά αποδοτικά σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης σε σχέση με τους μικροοργανισμούς της θαλάσσιας επιφάνειας. Στα τελικά πειράματα που μελετήθηκαν στις συνθήκες υψηλής πίεσης, η διαφορά μεταξύ των διαλυτοποιημένων συγκεντρώσεων που παρατηρήθηκε, υποθέτουμε ότι οφείλεται στο γεγονός πως παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες επιφανειοδραστικών ουσιών από τους πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς με την ενίσχυση των θρεπτικών. Όμως το μικρό ποσοστό μείωσης των ολικών υδρογονανθράκων (4,7%) οφείλεται ίσως στο ότι ίσως οι πιεζοφιλικοί μικροοργανισμοί δεν καταναλώνουν αρκετό πετρέλαιο. Από την άλλη, οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί ίσως να μην επιβίωσαν στην υψηλή πίεση, οπότε να αποτέλεσαν θρεπτικό υλικό για τους πιεζοφιλικούς και έτσι να παρατηρήθηκε πιο μεγάλο ποσοστό μείωσης ολικών υδρογονανθράκων (12%). Συνολικά, παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά βιοαποδόμησης των υδρογονανθράκων και στο αργό πετρέλαιο και στο ντίζελ, συμπεραίνοντας ότι η συγκεκριμένη μικροβιακή κοινότητα να μην είναι πλήρως αποτελεσματική για το σκοπό αυτό.

Ακόμη, είναι απαραίτητο να γίνει αναφορά στα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν από την αρχή των πειραμάτων και πιθανόν να επηρεάζουν την έκβαση των αποτελεσμάτων.

- Δεν έχουμε εικόνα του εσωτερικού δοχείου του αντιδραστήρα. Ιδανικά, εάν το δοχείο ήταν διάφανο θα μπορούσε να παρατηρηθεί και η διαλυτοποίηση του πετρελαίου στην υδατική φάση (όπως με πειράματα στην ατμοσφαιρική πίεση) .
- Πιθανόν το πετρέλαιο να προσκολλάει στα τοιχώματα του αντιδραστήρα με την ανάδευση, το οποίο συμπεραίνεται από το χρώμα των δειγμάτων (διάφανο έως ελαφρύ σκούρο) που λαμβάναμε. Δηλαδή η ποσότητα πετρελαίου που λαμβάναμε ήταν αρκετά μικρή.
- Τέλος, βασικό θέμα ήταν οι μεταβολές πιέσεων στον αντιδραστήρα. Πιο συγκεκριμένα, η πίεση ήταν σταθερή στα 100bar σε κάθε πείραμα, αλλά κατά την δειγματοληψία γινόταν, όπως είναι αναμενόμενο, εκτόνωση του πεπιεσμένου αέρα και μείωση της πίεσης κατά 15bar περίπου. Οπότε έπρεπε πάλι να αυξηθεί στο επίπεδο των 100bar. Πολύ πιθανόν, αυτές οι αυξομειώσεις της πίεσης να επηρεάζουν αρνητικά τα κύτταρα των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση την ανάπτυξή τους.

4.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής αποτελούν την βάση για την χρήση αντιδραστήρα υψηλής πίεσης στην βιοαποδόμηση των πετρελαιοειδών. Θα παραθέσουμε μερικές προτάσεις για την περαιτέρω βελτίωση της έρευνας του θέματος αυτού.

Αρχικά, θα πρέπει να μελετηθεί πείραμα χωρίς αέρια φάση, δηλαδή με πλήρωμένο όλο τον όγκο του αντιδραστήρα με υδατική φάση.

Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να γίνεται προσδιορισμός της ποσότητας των θρεπτικών που έχουν απομείνει στο διάλυμα σε όλη την διάρκεια ενός πειράματος, ώστε να γνωρίζουμε σε τι στάδιο βρίσκεται η συγκέντρωσή τους και αν χρειαστεί να γίνει προσθήκη, ώστε να συνεχίζεται ομαλά η ανάπτυξη των μικροβιακών κοινοτήτων και εν τέλει να μην παύονται οι μεταβολικές δραστηριότητες τους.

Τέλος, ο χρόνος των πειραμάτων θα πρέπει να αυξηθεί πέραν των 28 ημερών, καθώς η αποδόμηση του πετρελαίου με αποκλειστική εφαρμογή μικροοργανισμών χωρίς την ενίσχυση με χημικές ουσίες, απαιτεί χρόνο αφού αποτελεί μια φυσική διαδικασία.

Κεφάλαιο 5 Βιβλιογραφία

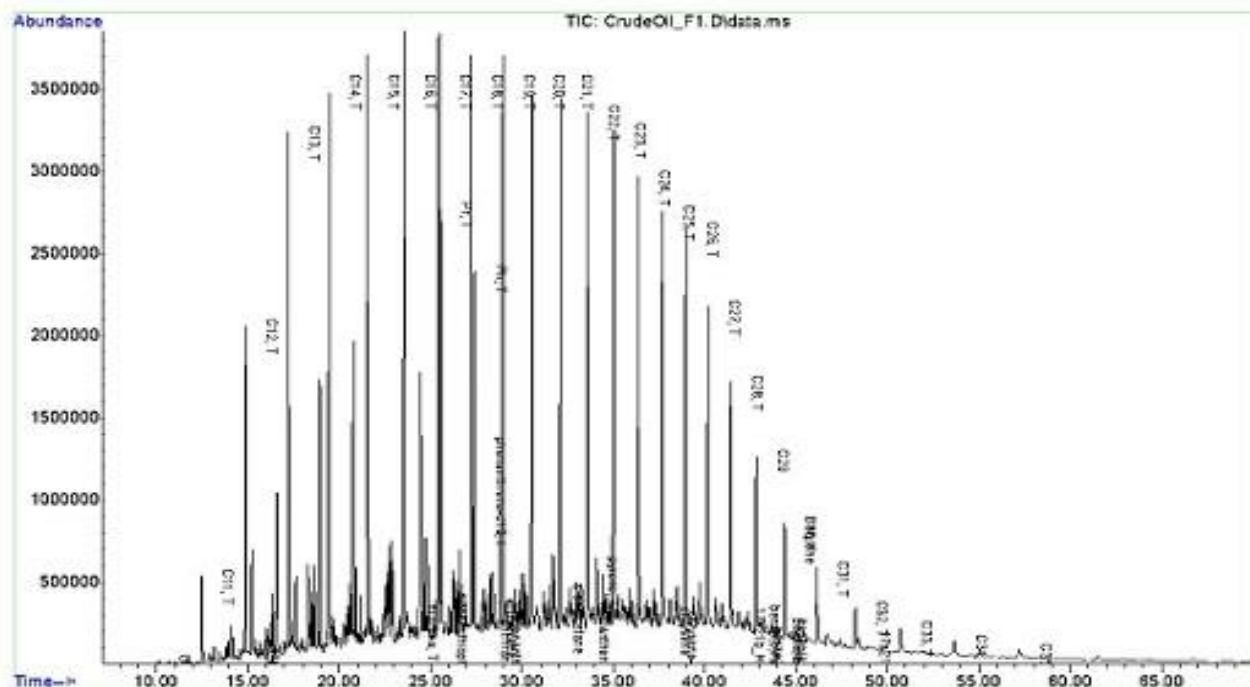
1. 'Μαύρος Χρυσός - Ο καταραμένος πλούτος', 25/9/2016, http://oil-evolution.blogspot.gr/2007/10/blog-post_2582.html, [Ηλεκτρονικό]
2. Daily Article, 25/9/2016, <http://dailyarticle.gr/2012/11/28/oi-10-megalyteres-perivallontikes-katastrofes-tou-planiti/>, [Ηλεκτρονικό]
3. Atlas, R. M., & Hazen, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*, (2011), 45 (16), 6709–6715.
4. Rodrigo A. , Cammie H., Edward J. B., Toxicity of dispersant Corexit 9500A and crude oil to marine microzooplankton, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2014), 106, 76-85
5. Goodbody-Gringley G, Wetzel DL, Gillon D, Pulster E, Miller A, et al. , Toxicity of Deepwater Horizon Source Oil and the Chemical Dispersant, Corexit 9500, to Coral Larvae, (2013), *PLoS ONE* 8(1)
6. National Research Council (NRC). Chapter 5: Toxicological effects of dispersants and dispersed oil. In: *Oil Spill Dispersants: Efficacy and Effects*. 2005, National Academy Press, Washington, D.C. pp. 193-276.
7. Mitra, S., et al. Macondo-1 well oil-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in mesozooplankton from the northern Gulf of Mexico, (2012), *Geophysical Research Letters*, 39, AGU Journals
8. National Wildlife Federation, 25/9/2016, www.nwf.org/What-We-Do/Protect-Habitat/Gulf-Restoration, [Ηλεκτρονικό]
9. Ναυτεμπορική, 25/9/2016, <http://www.naftemporiki.gr/story/339453/deepwater-horizon-i-periballontiki-katastrofi-ena-xrono-meta>, [Ηλεκτρονικό]
10. 'Η θαλάσσια ρύπανση' , 25/9/2016/, <http://www.seos-project.eu/modules/marinepollution/marinepollution-c02-p02.gr>, [Ηλεκτρονικό]
11. GESAMP (Group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection), 'Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities', 2007
12. 'Ο κόσμος της θάλασσας', 26/9/2016, http://5dim-pyrgou.ilei.sch.gr/sea_web/htm/polution2.html, [Ηλεκτρονικό]
13. 'ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ', Greenpeace Greece, Αύγουστος 2006
14. 'Fate of oil and weathering', 26/9/2016, SpillPrevention.org

15. National Research Council (NRC). Chapter 4: Behavior and fate of oil, in '*Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects*', 2003, The National Academies Press, Washington, D.C
16. Wikipedia, en.wikipedia.org/wiki/Emulsion
17. '*ΟΤΑΝ ΤΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ ΧΥΘΕΙ ΣΤΗ ΘΑΛΑΣΣΑ*', Greenpeace Greece, Αύγουστος 2006
18. Νικολοπούλου Μαρία, '*Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων*', Μεταπτυχιακή Διατριβή, Χανιά 2005
19. Κορκακάκη Εμμανουέλα, '*ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΑ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ*', Μεταπτυχιακή Διατριβή, Χανιά 2013
20. Office of Technology Assessment, *Bioremediation of Marine Oil Spills: An Analysis of Oil Spill Response Technologies*, (1991), OTA-BP-O-70, Washington, DC
21. epa.gov, 28/9/2016, epa.gov/remedytech/introduction-situ-bioremediation-groundwater
22. Καλογεράκης Ν., *Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος*, 2013, Χανιά
23. Weatherford Laboratories, '*Oil biodegradation - bacterial alteration of petroleum*', 27/9/2016, labs.weatherford.com/oil-biodegradation-bacterial-alteration-of-petroleum, [Ηλεκτρονικό]
24. Χατζηγιάννου Π.Θ. , Κούππαρης Α.Μ., *ΕΝΟΠΤΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ*, 1990, Αθήνα
25. PubChem, Open Chemistry Database, National Center for Biotechnological Information, 28/9/2016, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde>, [Ηλεκτρονικό]

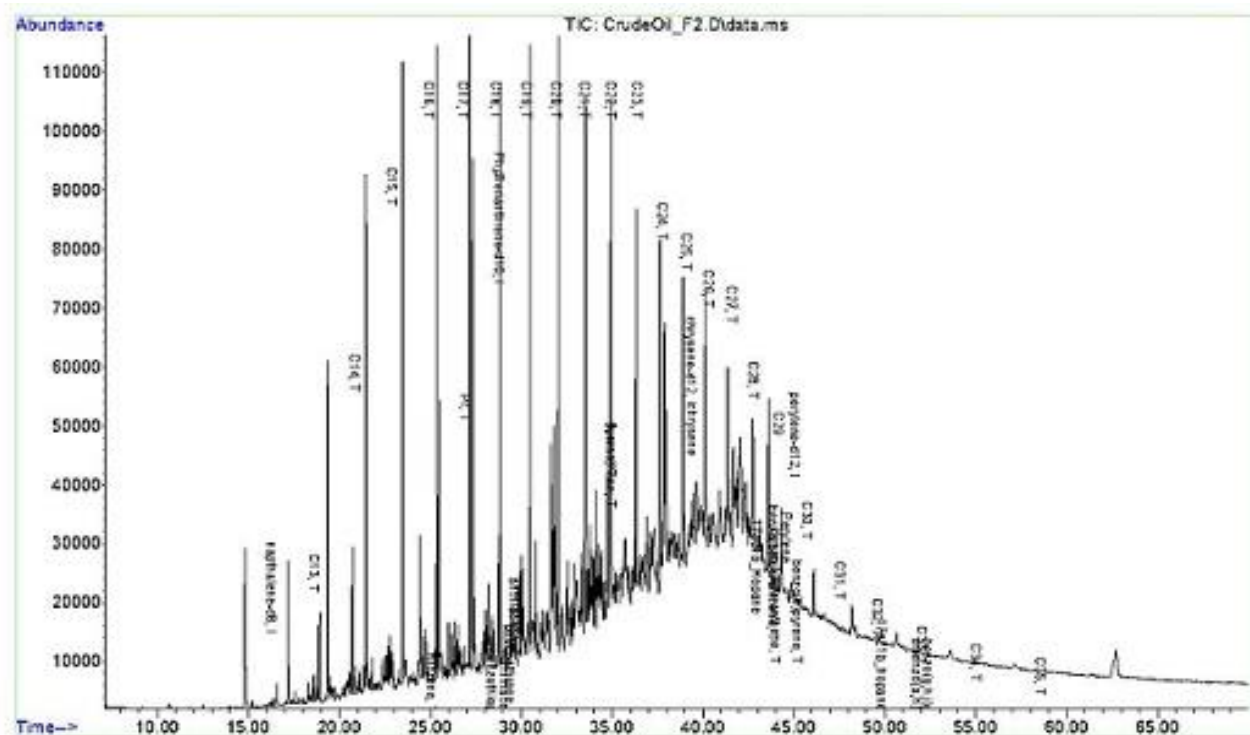
Κεφάλαιο 6 Παράρτημα

6.1. Χρωματογραφήματα

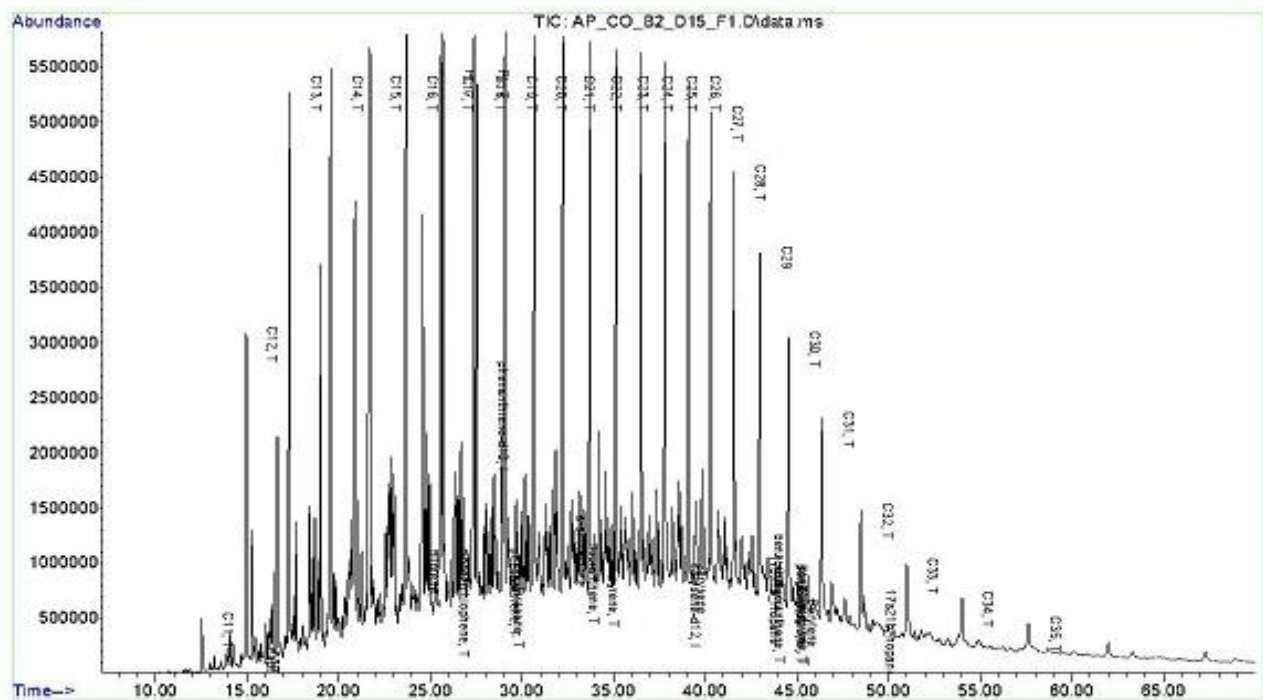
6.1.1. Crude Oil F1



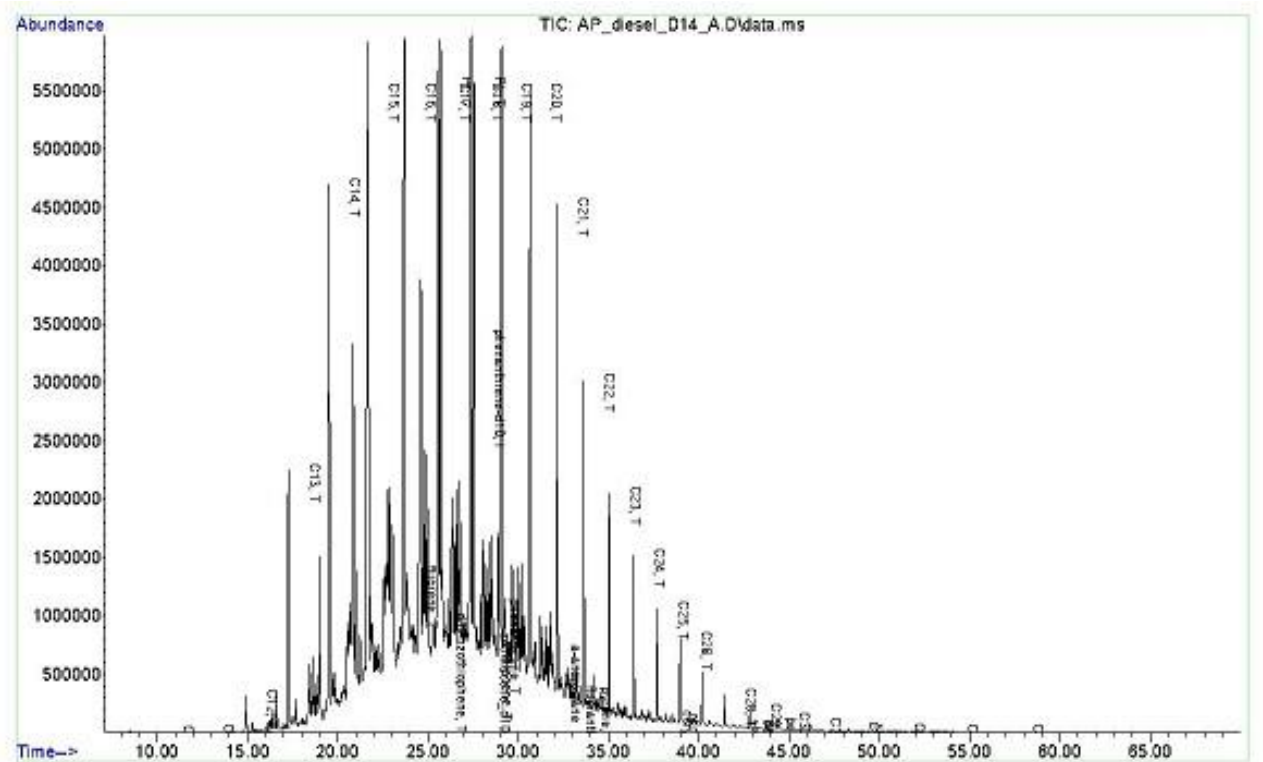
6.1.2. Crude Oil F2



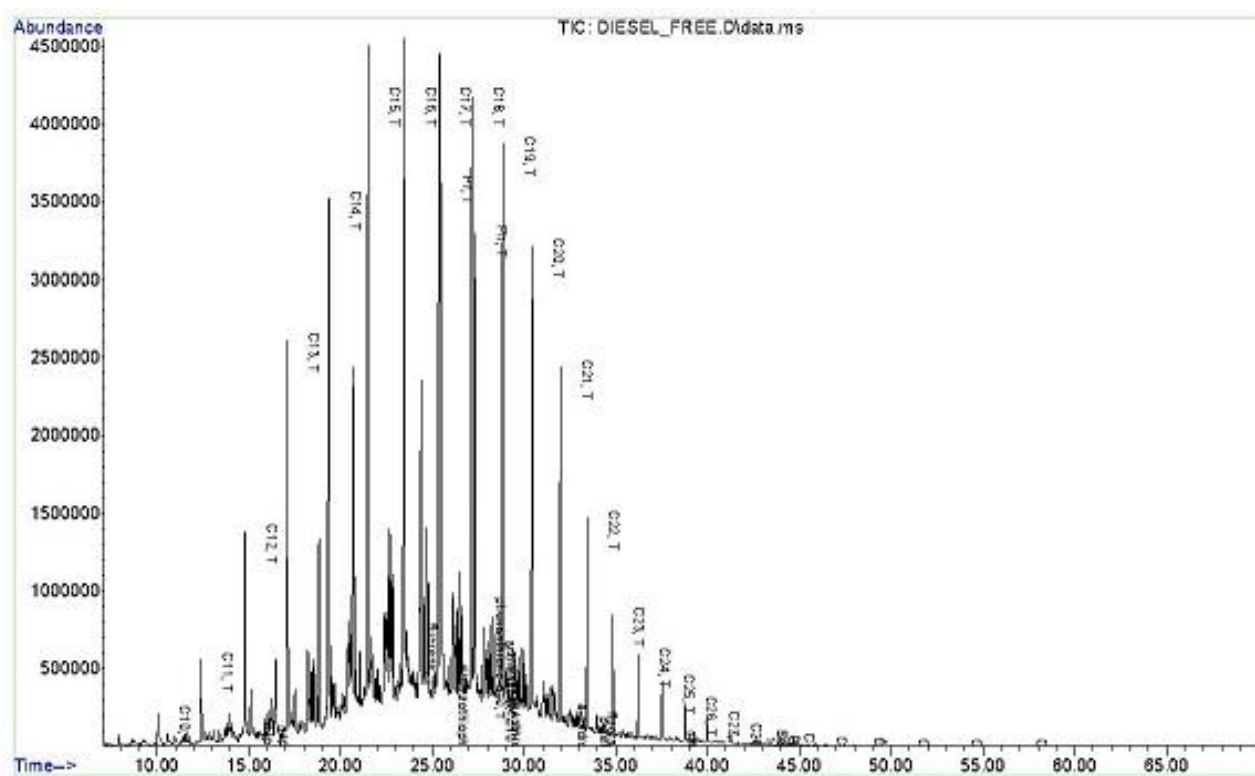
6.1.3. Crude Oil σε ατμοσφαιρική πίεση



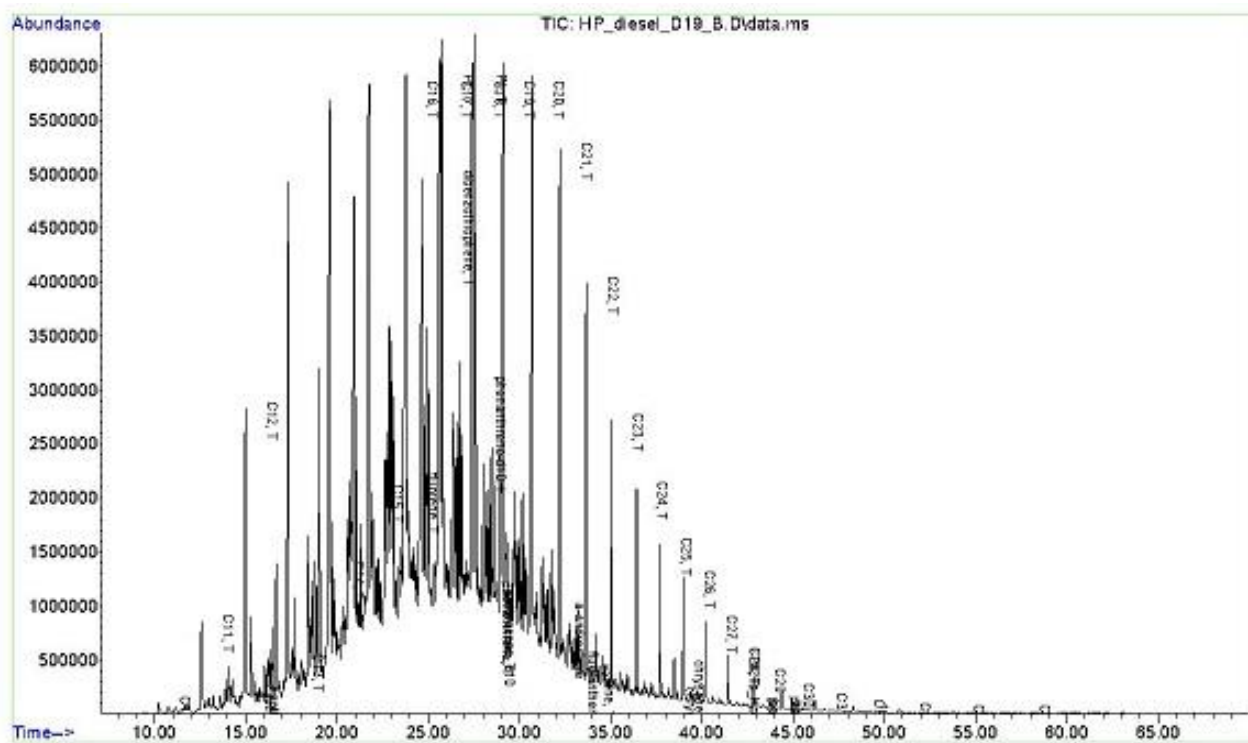
6.1.4. Diesel Oil σε ατμοσφαιρική πίεση (ημέρα 14)



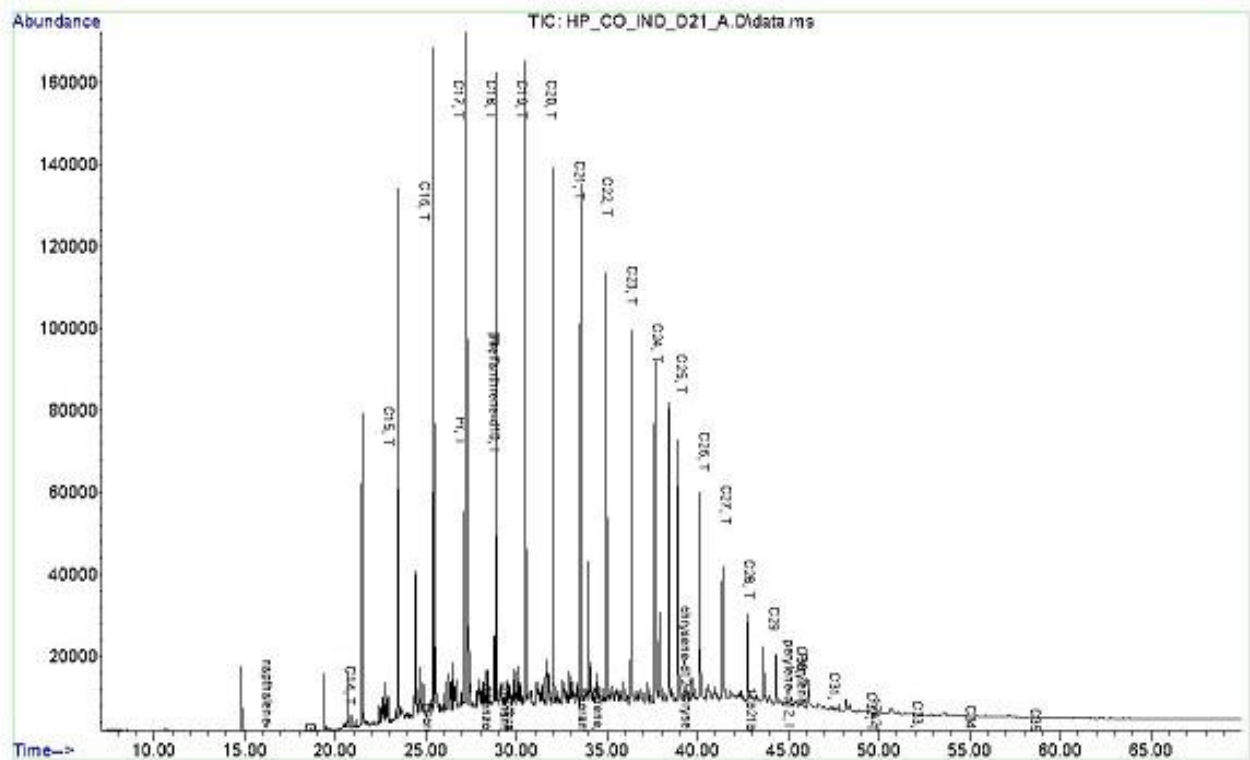
6.1.5. Diesel Free



6.1.6. Diesel oil σε υψηλή πίεση (ημέρα 19)



6.1.7. Crude oil σε υψηλή πίεση με αυτόχθονες και πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς (ημέρα 21)



6.1.8. Crude oil σε υψηλή πίεση με πιεζοφιλικούς μικροοργανισμούς και θρεπτικά (ημέρα 21)

