



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



### **Διπλωματική εργασία**

*Βιοεξυγίανση ρυπασμένης άμμου από πετρελαιοειδή με  
χρήση αυτοχθόνων μικροοργανισμών.*

**Χανιώτης Πέτρος**

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

Χανιά  
Οκτώβριος 2011

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα ορισμένων θρεπτικών ουσιών και παραγόντων βιοαποικοδόμησης στην βιοδιάσπαση πετρελαιοειδών σε ρυπασμένες ακτές με την βοήθεια των αυτοχθόνων μικροοργανισμών .

Η βιοαποικοδόμηση των πετρελαιοειδών μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση κατάλληλων θρεπτικών υλικών που στόχο έχουν την διέγερση των αυτοχθόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν και αναπτύσσονται στις ρυπασμένες ακτές. Ωστόσο η χρήση μόνο των υδατοδιαλυτών λιπασμάτων όπως είναι τα άλατα φωσφόρου και αζώτου παρουσιάζει το πρόβλημα της γρήγορης έκπλυσης τους στο περιβάλλον των ακτών δημιουργώντας έτσι περαιτέρω περιβαλλοντικά προβλήματα.

Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος εξετάζεται η χρήση λιπόφιλων φυσικών λιπασμάτων (ουρικό οξύ, λεκιθίνη) που είναι βραδείας διάλυσης και λιπόφιλων λιπασμάτων. Η δράση τους αυτή μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (biosurfactants) όπως είναι τα ραμνολιπίδια (rhamnolipids). Η σύζευξη των λιπόφιλων λιπασμάτων και των επιφανειοδραστικών ουσιών βοηθούν στην διασκόρπιση των πετρελαιοειδών αυξάνοντας την περιοχή δράσης των μικροοργανισμών. Οι βιολογικές αυτές επιφανειοδραστικές ουσίες προτιμώνται έναντι των χημικών διότι είναι πολύ λιγότερο τοξικές και πολύ ευκολότερα αποικοδομήσιμες. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η δράση αυτών των λιπόφιλων λιπασμάτων με ή χωρίς την προσθήκη βιολογικών επιφανειοδραστικών ουσιών όσο αφορά τον βαθμό αποικοδόμησης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). Το πρωτόκολλο αυτό σχεδιάστηκε για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοαποικοδομήσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα με την Ανάλυση του πιο Πιθανού Αριθμού (Most Probable Number) και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) με τη χρήση GC-MS.

## ABSTRACT

In this study the effectiveness of certain nutrients and bioremediation agents on the bioremediation of oil spills at the shorelines with the help of the already existing native microorganisms was examined.

Bioremediation of crude oil hydrocarbons is achieved by the application of certain amounts of nutrients. These nutrients stimulate the indigenous microorganisms which are located and grown at the contaminated shorelines. The supply of these two essential elements as water-soluble salts of nitrogen and phosphorous presents several problems. These include the rapid dilution of the salts in the large volumes of polluted sand and the increase in concentration of mobile nitrogen which creates further environmental problems.

To overcome these problems the use of hydrophobic sources of nitrogen (uric acid) and phosphorous (lecithin) acting at the contaminated sand is investigated. Their activity is enhanced by the use of biosurfactants. Biosurfactants are heterogeneous group of surface active molecules produced by microorganisms, which can disperse crude oil and help microorganisms to grow on a greater area. Biosurfactants are more preferable than chemical dispersants because they are less toxic and more easily biodegradable. The effects of the lipophilic fertilizers with or without biosurfactants on the degradation of crude oil hydrocarbons are examined.

The method which has been used for the evaluation of these bioremediation agents is based on a modified bioremediation agent effectiveness testing protocol by EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). This protocol was designed to determine a product's ability to biodegrade oil by quantifying changes in the oil composition resulting from biodegradation. The protocol tests for microbial activity by Most Probable Number (MPN) determination and quantifies the disappearance of saturated hydrocarbons and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) by GC-MS analysis.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η προκείμενη εργασία έλαβε χώρα στα πλαίσια της φοίτησης μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης, στο τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος με σκοπό την απόκτηση του διπλώματος.

Στο σημείο αυτό λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς, τον **καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη** για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα διπλωματικής και κατ' επέκταση με τον αντίστοιχο τομέα δουλειάς που με ενδιαφέρει και πρόκειται να ασχοληθώ.

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

Θα πρέπει επίσης να ευχαριστήσω την **καθηγήτρια κυρία Δανάη Βενιέρη**, για τις παρατηρήσεις της όσον αφορά για τη σωστή και ασφαλή διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της εργασίας αλλά και για τις συμβουλές της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τη **Μαρία Νικολοπούλου** η οποία βοήθησε και εμένα αλλά και το συνεργάτη μου σε αυτή την εργασία, δίνοντας σ' εμάς τις γνώσεις της, το χρόνο της μα και την αμέριστη συμπαράσταση της όποτε και αν εμείς την χρειαστήκαμε, διότι χωρίς τη βοήθεια της θα βρισκόμασταν ακόμη στα εργαστήρια.

Και τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία μου έδωσε την αμέριστη συμπαράσταση της και το κουράγιο για να φέρω εις πέρας αυτήν την εργασία και για τη στήριξη τους ώστε να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εισαγωγή.....                                                                                                         | 7  |
| <b>Κεφάλαιο 1</b>                                                                                                     |    |
| Θεωρητικό υπόβαθρο.....                                                                                               | 8  |
| 1.1 Γενικές ιδιότητες του πετρελαίου.....                                                                             | 8  |
| 1.2 Συνέπειες ρύπανσης από πετρέλαιο.....                                                                             | 12 |
| 1.2.1 Συνέπειες φυσικής μορφής.....                                                                                   | 12 |
| 1.2.2 Συνέπειες βιολογικής μορφής.....                                                                                | 13 |
| 1.2.3 Επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου.....                                                                         | 13 |
| <b>Κεφάλαιο 2</b>                                                                                                     |    |
| Μέσα καταπολέμησης της θαλάσσιας και της παράκτιας ρύπανσης.....                                                      | 14 |
| 2.1 Εισαγωγή.....                                                                                                     | 14 |
| 2.2 Μέσα καταπολέμησης της θαλάσσιας ρύπανσης.....                                                                    | 14 |
| 2.2.1 Φράγματα.....                                                                                                   | 14 |
| 2.2.2 Πετρελαιοσυλλέκτες ( Skimmers ).....                                                                            | 15 |
| 2.2.3 Σκάφη Περισυλλογής (Skimmer Vessels).....                                                                       | 16 |
| 2.2.4 Απορροφητικά Υλικά (Sorbents).....                                                                              | 16 |
| 2.2.5 Χημικές Διασκορπιστικές Ουσίες (Dispersants).....                                                               | 17 |
| 2.3 Καταπολέμηση της ρύπανσης ακτών.....                                                                              | 18 |
| 2.3.1 Μέθοδοι καθαρισμού ακτών.....                                                                                   | 20 |
| 2.4 Βιοεξυγίανση εδαφών με τη μέθοδο του Landfarming.....                                                             | 22 |
| 2.4.1 Μικροοργανισμοί και οργανικές ενώσεις.....                                                                      | 24 |
| 2.4.2 Σχεδιαστικά στοιχεία της μεθόδου.....                                                                           | 26 |
| <b>Κεφάλαιο 3</b>                                                                                                     |    |
| Υλικά και Μέθοδοι – Δοκιμή Αποτελεσματικότητας των Παραγόντων Βιοδιέγερσης/Βιοεξυγίανσης.....                         | 28 |
| 3.1 Περίληψη της Μεθόδου.....                                                                                         | 28 |
| 3.2 Προετοιμασία Πετρελαίου.....                                                                                      | 30 |
| 3.3 Προετοιμασία άμμου.....                                                                                           | 30 |
| 3.4 Δομή του Πειράματος.....                                                                                          | 31 |
| 3.4.1 Μικροβιολογική Ανάλυση.....                                                                                     | 32 |
| 3.4.2 Αντιδραστήρια και Θρεπτικά Καλλιέργειας.....                                                                    | 32 |
| 3.4.3 Αραιώσεις.....                                                                                                  | 33 |
| 3.4.4 Εμβολιασμός των 96 microtiter well MPN plates (μικροβιακοί αποδομητές πετρελαίου).....                          | 33 |
| 3.5 Χημική Ανάλυση της Σύστασης του Πετρελαίου.....                                                                   | 34 |
| 3.5.1 Εκχύλιση δειγμάτων με συσκευή Soxhlet.....                                                                      | 34 |
| 3.5.2 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) –Κλασματοποίηση Πετρελαίου.....                             | 35 |
| 3.5.3 GC/MS Ανάλυση.....                                                                                              | 36 |
| <b>Κεφάλαιο 4</b>                                                                                                     |    |
| Επεξεργασία μετρήσεων – Παρουσίαση αποτελεσμάτων.....                                                                 | 40 |
| 4.1 Μικροβιακές αναλύσεις.....                                                                                        | 40 |
| 4.2 Χημικές Αναλύσεις.....                                                                                            | 42 |
| 4.3 Συγκεντρωτικά γραφήματα (MPN, CFUs, % Depletion of saturates, % Depletion of aromatics – Days) των δειγμάτων..... | 46 |
| Συμπεράσματα.....                                                                                                     | 48 |
| Βιβλιογραφία.....                                                                                                     | 51 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Γράφημα 1 Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με τον χρόνο – για το Control.....              | 40 |
| Γράφημα 2 Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το NPK.....                   | 41 |
| Γράφημα 3 Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το ULR.....                   | 42 |
| Γράφημα 4 Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το δείγμα ελέγχου (Control) με το χρόνο (μέρες)..... | 43 |
| Γράφημα 5 Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το δείγμα ελέγχου (Control) με τον χρόνο.....        | 43 |
| Γράφημα 6 Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το NPK με τον χρόνο (μέρες).....                     | 44 |
| Γράφημα 7 Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το NPK με τον χρόνο (μέρες).....                     | 45 |
| Γράφημα 8: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το ULR με τον χρόνο (μέρες).....                    | 45 |
| Γράφημα 9: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το ULR με τον χρόνο (μέρες).....                    | 46 |
| Γράφημα 10: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το Control.....                                                  | 47 |
| Γράφημα 11: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το NPK.....                                                      | 47 |
| Γράφημα 12: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το ULR.....                                                      | 48 |

## Εισαγωγή

Σχεδόν ένα χρόνο μετά την έκρηξη της 20ής Απριλίου 2010 στην πλατφόρμα άντλησης πετρελαίου Deepwater Horizon στον Κόλπο του Μεξικού, που κόστισε τη ζωή σε 11 εργαζομένους και προξένησε μία διαρροή περίπου 5 εκατομμυρίων βαρελιών αργού πετρελαίου, τη χειρότερη στην ιστορία, η επιχείρηση καθαρισμού πόρρω απέχει από την ολοκλήρωσή της. Οι συντηρητικότερες εκτιμήσεις υπολογίζονται ότι θα συνεχιστούν οπωσδήποτε ως το τέλος του 2012. Οι επίσημες καταμετρήσεις υποστηρίζουν ότι απομένουν μερικές δεκάδες χιλιόμετρα ακτογραμμής, τα οποία η αμερικανική Εθνική Υπηρεσία Ωκεανού και Ατμόσφαιρας προσδιορίζει ακριβέστερα σε 100, μία ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου της Τζόρτζια όμως αντιτείνει ότι ο βυθός είναι μολυσμένος σε έκταση 7.500 τετραγωνικών χιλιομέτρων. Έχοντας ήδη πληρωθεί αρκετά δις. δολάρια σε λανθασμένες επιχειρήσεις καθαρισμού, το μεγαλύτερο ποσοστό του πετρελαίου παραμένει, ενώ η διαφαινόμενη οικολογική καταστροφή είναι μεγάλη, αφού για πρώτη φορά στην ιστορία χρησιμοποιήθηκαν πολλοί τόνοι χημικών διασκορπιστικών (dispersants) χωρίς κανείς να υπολογίσει τις συνέπειες.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία λοιπόν εξετάζεται η αποτελεσματικότητα ορισμένων θρεπτικών ουσιών και παραγόντων βιοαποικοδόμησης στη βιοδιάσπαση πετρελαιοειδών σε ρυπασμένες ακτές αλλά παρουσιάζονται και οι πρώτες κινήσεις που θα πρέπει να λάβουν χώρα σε μία ενδεχόμενη διαρροή πετρελαίου στη θάλασσα έτσι ώστε να προληφθεί η προσέγγιση του στις ακτές.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

#### 1.1 Γενικές ιδιότητες του πετρελαίου

Το αργό πετρέλαιο, ή απλά πετρέλαιο, είναι η κοινή ονομασία διαφόρων μιγμάτων χημικών ενώσεων, που βασικά αποτελούνται από άνθρακα και υδρογόνο και τις οποίες οι χημικοί ονομάζουν "υδρογονάνθρακες". Η ποσοστιαία αναλογία (κατά βάρος) των δύο αυτών στοιχείων σε διαφορετικούς τύπους αργού πετρελαίου, που παράγονται σήμερα σε διάφορα μέρη του κόσμου, ποικίλλει μεταξύ 83% και 87% για τον άνθρακα και μεταξύ 11% και 14% για το υδρογόνο. Οι ποσότητες άλλων στοιχείων είναι πολύ μικρές, εκτός από το θείο, το οποίο μπορεί να φθάσει σε περιεκτικότητα το 8% (πετρέλαιο Ιράκ).

Τρεις σειρές υδρογονανθράκων αποτελούν τουλάχιστον το 95% όλων των αργών πετρελαίων. Πρόκειται για τους παραφινικούς (paraffins), όπως το μεθάνιο και το προπάνιο, τους ναφθενικούς (naphthenes), με χώρα προέλευσης την Βενεζουέλα και τους αρωματικούς (aromatics) υδρογονάνθρακες εκ των οποίων ο πιο γνωστός είναι το βενζόλιο.

Άλλες δύο ομάδες χημικών ενώσεων που περιέχονται στο αργό πετρέλαιο είναι γνωστές ως:

- *ασφαλτένια - είναι σειρά χημικών ενώσεων με πάρα πολύ ψηλά μοριακά βάρη. Περιέχουν θείο, άζωτο και οξυγόνο, καθώς επίσης και μέταλλα όπως νικέλιο και βανάδιο.*
- *Ρητίνες – είναι υπεύθυνες για τον αρχικό σχηματισμό γαλακτωμάτων με το θαλασσινό νερό.*

Οι αρωματικοί είναι οι περισσότεροι τοξικοί και ακολουθούν οι ασφαλτινικοί, οι ναφθενικοί και οι παραφινικοί υδρογονάνθρακες. Τέλος πρέπει να μνημονευθεί ότι υπάρχει μία άλλη σειρά υδρογονανθράκων που δεν απαντώνται, στο αργό πετρέλαιο, αλλά είναι συνήθης στα προϊόντα διύλισης:

- *αλκένια (ολεφίνες) - σαν αποτέλεσμα της μεγαλύτερης δραστικότητας τους, τα αλκένια είναι πιθανώς τοξικότερα από τα αλκάνια.*

Μερικές από τις ιδιότητες των πετρελαίων συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Τα πετρέλαια είναι υγρά και το χρώμα τους ποικίλει από ανοικτό κίτρινο μέχρι μουντό μαύρο (ασφαλτενικά πετρέλαια). Μπορεί να έχουν πράσινο (παραφινικό) ή μπλε (ναφθενικό) φθορισμό. Η οσμή τους είναι δυσάρεστη λόγω της παρουσίας ενώσεων θείου.



- Το ιξώδες τους ποικίλει και είναι συνάρτηση της περιεκτικότητας σε ελαφρά κλάσματα. Είναι πολύ εύφλεκτα (σημείο ανάφλεξης μικρότερο των 30° C).
- Το ειδικό τους βάρος ποικίλει από 0,750 (παραφινικό πετρέλαιο) μέχρι 1,06.
- Πριν από τη μεταφορά, το αργό πετρέλαιο αφυδατώνεται και σταθεροποιείται για να απομακρυνθούν τα μη συμπυκνωμένα και ασφυξιογόνα αέρια, το νερό και οι προσμίξεις.

Ύστερα από τη διαρροή τους στη θάλασσα ή στις ακτές, τα πετρέλαια υπόκεινται σε διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές, ανάλογα με τη φύση τους και τις ωκεανολογικές συνθήκες. Αυτές οι μεταβολές θα επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την επιλογή των τεχνικών καταπολέμησης του πετρελαίου, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.[8]

### 1.1.2 Φυσικοχημικές μεταβολές

Τα πετρελαιοειδή, γενικά διαχωρίζονται σε εμμένοντα (persistent) και μη εμμένοντα (non persistent), ανάλογα με τις φυσικές και χημικές διεργασίες που καταγράφονται με την εισαγωγή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Εμμένοντα θεωρούνται εκείνα τα πετρελαιοειδή τα οποία λόγω της χημικής τους σύστασης, όταν διαρρέουν στην θάλασσα αποικοδομούνται με αργούς ρυθμούς και εξαπλώνονται, με αποτέλεσμα την ανάγκη λήψης άμεσων μέτρων για την καταπολέμηση της επακόλουθης ρύπανσης. Αντιθέτως, τα μη εμμένοντα με την είσοδο τους στο θαλάσσιο περιβάλλον, υπόκεινται, σε φυσικό διασκορπισμό ή εξατμίζονται γρήγορα και δεν είναι πάντα απαραίτητο να ληφθούν μέτρα για την καταπολέμηση τους.

Οι φυσικοχημικές μεταβολές των πετρελαιοειδών είναι οι εξής:

**Εξάπλωση (spreading):** Το πλέον προφανές χαρακτηριστικό του πετρελαίου που διαρρέει στην επιφάνεια της θάλασσας είναι η τάση του να διασκορπίζεται οριζόντια, κάτω από τη δράση των συνδυασμένων δυνάμεων βαρύτητας, ιξώδους και επιφανειακής τάσης. Κατά κανόνα, επικρατεί αρχικά η βαρύτητα, επηρεαζόμενη και από το ιξώδες του πετρελαίου. Ύστερα από λίγες ώρες το πάχος του πετρελαίου θα μειωθεί κατά πολύ και η επιφανειακή τάση διαδέχεται τη βαρύτητα σαν κύρια δύναμη εξάπλωσης. Τυπικά, το πετρέλαιο που διαρρέει σε νερό θα σχηματίσει ένα λεπτό φιλμ, του οποίου το εσωτερικό τμήμα έχει μεγαλύτερο πάχος απ' ότι στις άκρες. Τα περισσότερα είδη αργού πετρελαίου εξαπλώνονται σε στρώμα πάχους περίπου 0,3 mm εντός 12 ωρών. Όταν δεν υπάρχουν άλλες επιδράσεις, η εξάπλωση συνεχίζεται μέχρις ότου το πετρέλαιο σχηματίσει στρώμα πάχους από 0,5 μικρά (1 μικρό = 103 χιλιοστά).

**Εξάτμιση (evaporation):** Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα σε λίγες ώρες ύστερα από τη διαρροή και τα πλέον πτητικά κλάσματα μίας πετρελαιοκηλίδας χάνονται στην ατμόσφαιρα με ρυθμό που καθορίζεται από την ταχύτητα του ανέμου, τη θερμοκρασία και τον τύπο του πετρελαίου. Όταν η θάλασσα είναι ταραγμένη ο ρυθμός εξάτμισης αυξάνεται, γιατί διευκολύνεται η απώλεια πετρελαίου από τις κορυφές των κυμάτων, υπό μορφή σταγονιδίων.

Μεγάλες ταχύτητες ανέμου και υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν επίσης τους ρυθμούς εξάτμισης. Το υπόλοιπο πετρέλαιο που παραμένει στη θάλασσα έχει μεγαλύτερη

πυκνότητα και ιξώδες απ' ότι το αρχικό. Στις περισσότερες κηλίδες αργού πετρελαίου χάνεται μέχρι το 40% του όγκου τους στις πρώτες 48 ώρες, ενώ το βαρύ πετρέλαιο που περιέχει λίγες πτητικές ενώσεις θα παρουσιάσει λίγη εξάτμιση ακόμη και μετά από αρκετές ημέρες. Τα ελαφρά προϊόντα διύλισης, όπως βενζίνη, κηροζίνη και πετρέλαιο ντίζελ θα εξατμισθούν σχεδόν τελείως σε διάστημα ωρών, δημιουργώντας κίνδυνο πυρκαγιάς σε κλειστές περιοχές, όπως τα λιμάνια.

**Διάλυση (dissolution):** Οι απώλειες από διάλυση είναι σχετικά μικρές, αφού οι περισσότεροι υδρογονάνθρακες από τους οποίους αποτελείται το πετρέλαιο έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό της θάλασσας. Εκείνα τα συστατικά του πετρελαίου που μπορούν να διαλυθούν στο νερό, απομακρύνονται μέσω της εξάτμισης, η οποία κατά κανόνα προηγείται της διάλυσης. Στην πραγματικότητα, όσο αλμυρότερη είναι η θάλασσα (όπως συμβαίνει στη Μεσόγειο), τόσο ασθενέστερη είναι η διάλυση.

**Βιοαποικοδόμηση (biodegradation):** Η βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου από βακτηρίδια που ζουν στη θάλασσα, συμβάλλει σημαντικά στη μετατροπή του πετρελαίου σε οξειδωμένα προϊόντα. Ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τις θρεπτικές ουσίες, την ύπαρξη οξυγόνου και τον τύπο πετρελαίου. Επειδή τα βακτηρίδια είναι ενεργά στη διαχωριστική επιφάνεια πετρελαίου/νερού, ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξάνεται όταν σχηματίζονται λεπτές μεμβράνες ή σταγονίδια διασκορπισμένου πετρελαίου σε μεγάλη επιφάνεια. Τα ελαφρότερα κλάσματα αποικοδομούνται γρηγορότερα απ' ότι τα κλάσματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Οι πλέον ευνοϊκές θερμοκρασίες για μικροβιακή ανάπτυξη είναι πάνω από 25° C. Κάτω των 5° C οποιαδήποτε ανάπτυξη σταματά. Η διαλυτότητα του οξυγόνου στο θαλασσινό νερό είναι χαμηλή (6 έως 8 mg ανά λίτρο) σε σύγκριση με τις ποσότητες που απαιτούνται για πλήρη οξείδωση των υδρογονανθράκων: 3 έως 4 mg οξυγόνου ανά mg υδρογονάνθρακα για μετατροπή σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O.

#### **Γαλακτοματοποίηση (emulsification) :**

**Πετρέλαιο στο νερό:** Αν η ροή στην επιφάνεια του νερού είναι τυρβώδης, το πετρέλαιο είναι δυνατόν να διασπασθεί σε σταγονίδια που αιωρούνται στο νερό. Τότε η κηλίδα δεν επηρεάζεται από τον άνεμο και μπορεί να ξανασηματιστεί σε κάποια απόσταση από την περιοχή που έγινε η αρχική διαρροή.

**Νερό στο πετρέλαιο (''chocolate mousse'')**: Αυτός ο τύπος γαλακτώματος μπορεί να σχηματισθεί εντός ολίγων ωρών και περιέχει μέχρι 90% νερό. Επομένως η πυκνότητα και το ειδικό βάρος αυξάνουν καθώς επίσης και οι όγκοι που θα πρέπει να καταπολεμηθούν και να ανακτηθούν. Ο σχηματισμός των γαλακτωμάτων μεγαλώνει μέχρι και στο δεκαπλάσιο τον όγκο του ρύπου, επιβραδύνει, τις υπόλοιπες διαδικασίες της γήρανσης και τον μετασχηματίζει σε μορφή που μοιάζει να είναι περισσότερο στερεή παρά υγρή. Πρόκειται λοιπόν για την πλέον δυσάρεστη εξέλιξη ρύπανσης από πετρελαιοειδή στη θάλασσα και, αυτήν που δυσχεραίνει περισσότερο το έργο των μηχανισμών αντιμετώπισης.

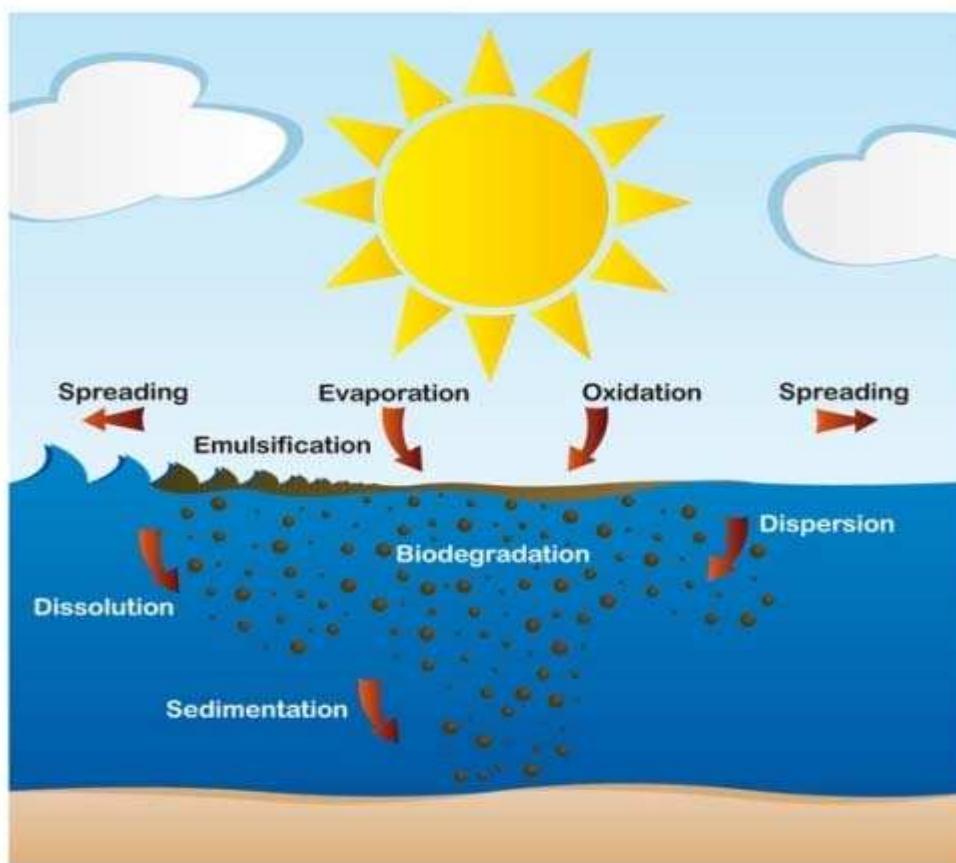
**Φώτο-οξείδωση (oxidation):** Η χημική αντίδραση των υδρογονανθράκων με το οξυγόνο καλείται οξείδωση. Η αντίδραση αυτή γίνεται στην επιφάνεια και λαμβάνει χώρα ταχύτερα, όταν το πετρέλαιο εξαπλωθεί σε λεπτή μεμβράνη. Η υπεριώδης ακτινοβολία από το φως του ηλίου επιταχύνει την οξείδωση και κάτω από ιδανικές συνθήκες μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την επίδραση των καιρικών συνθηκών σε

ποσοστό μέχρι 1% του πετρελαίου που διέρρευσε ανά ημέρα. Λόγω της ταχείας μείωσης της διείσδυσης του φωτός σε στρώματα πετρελαίου μεγάλου πάχους, οι επιπτώσεις της φωτοοξείδωσης παρουσιάζονται σε κηλίδες μικρού πάχους ή στο επιφανειακό στρώμα κηλίδων μεγάλου πάχους. Οι επιπτώσεις αυτού μπορεί να ευνοούν ή να εμποδίζουν την περαιτέρω ανάπτυξη της ρύπανσης. Τα πετρέλαια που οξειδώνονται με τη δράση του φωτός είναι γενικά περισσότερο διαλυτά και διασκορπίζονται καλύτερα στο θαλασσίνο νερό και επομένως είναι βιοαποικοδομήσιμα. Σε βαρέα πετρέλαια ή σε εκείνα που έχουν χάσει τα ελαφρά συστατικά τους, η φωτοοξείδωση ευνοεί τις αντιδράσεις πολυμερισμού που εμποδίζει το χειρισμό αυτών των πετρελαίων και την τελική αποικοδόμησή τους.

**Βύθιση και κατακάθιση (sedimentation and sinking):** Η εξάτμιση και γαλακτοποίηση καθώς και η αύξηση της πυκνότητας που θα προκύψει μπορεί να βοηθήσει στη βύθιση της κηλίδας. Συχνά, η αιτία της βύθισης είναι η προσκόλληση ιζημάτων και άλλων οργανικών ουσιών ή και άμμου σε ρηχές θάλασσες με αμμώδη βυθό. Η βύθιση είναι επίσης δυνατή όταν παρατηρείται σημαντική πτώση της πυκνότητας των επιφανειακών νερών, όπως π.χ. παρατηρείται στις εκβολές ποταμών.

**Κίνηση:** Ο μηχανισμός της επιφανειακής κίνησης του πετρελαίου υπό την επίδραση του ανέμου δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά έχει βρεθεί εμπειρικά ότι το πετρέλαιο κινείται κατά την κατεύθυνση του ανέμου με ταχύτητα που είναι περίπου το 3% της ταχύτητας του ανέμου. Όταν υπάρχουν επιφανειακά ρεύματα, θα προστεθεί στην πιο πάνω ταχύτητα και η ταχύτητα του ρεύματος.[9]

Όλες οι παραπάνω φυσικοχημικές διεργασίες του πετρελαίου, όταν αυτό διαρρέει στο θαλασσίνο νερό, απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Φυσικοχημικές μεταβολές πετρελαιοειδών.

## 1.2 Συνέπειες ρύπανσης από πετρέλαιο

### 1.2.1 Συνέπειες φυσικής μορφής

Μια μεμβράνη πετρελαίου απλωμένη στην επιφάνεια της θάλασσας ή της ακτής εμποδίζει τις εναλλαγές αέρα/θάλασσας/ακτής, που είναι απαραίτητες για τους θαλασσίους βιολογικούς κύκλους. Επομένως:

- Μειώνει την ανανέωση του οξυγόνου.
- Παρεμβάλλεται στις ακτίνες του ήλιου επιβραδύνοντας έτσι τη χλωροφυλική σύνθεση.
- Έχει σαν επακόλουθο την αύξηση της θερμοκρασίας και ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταναλώνουν οξυγόνο.

### 1.2.2 Συνέπειες βιολογικής μορφής

Οι επιπτώσεις του πετρελαίου στο περιβάλλον είναι ποικιλόμορφες και πολύπλοκες. Μερικές εμφανίζονται αμέσως, άλλες είναι μακροχρόνιες. Επιδρούν σε διαφορετικό βαθμό τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο της θάλασσας. Στην περίπτωση αργών πετρελαίων, τα πλέον πτητικά συστατικά και οι αρωματικές ενώσεις είναι τα πλέον τοξικά. Για τα προϊόντα διύλισης οι πλέον επιβλαβείς επιπτώσεις, προέρχονται γενικά από προϊόντα τα οποία έχουν χαμηλό σημείο βρασμού.

### 1.2.3 Επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου

Εκτός από τη δηλητηρίαση, που προκαλείται από την παρατεταμένη εισπνοή προϊόντων πετρελαίου, η κατανάλωση ορισμένων θαλασσίων ζώων (ψάρια, οστρακόδερμα, οστρακοειδή) που ήλθαν σε επαφή με το πετρέλαιο μπορεί να είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο, λόγω σωρευτικών επιπτώσεων.

Τις περισσότερες όμως φορές, οι επιβλαβείς επιπτώσεις της ρύπανσης γίνονται έμμεσα αντιληπτές μέσω των οικονομικών και οικολογικών επιπτώσεων:

- Ζημιά σε βιολογικές πηγές, θαλάσσια πανίδα και χλωρίδα και κατά συνεπεία εμπόδιση ορισμένων θαλασσίων δραστηριοτήτων.
- Υποβάθμιση χώρων αναψυχής με σοβαρότατες επιπτώσεις στον τουρισμό, που σε όλες σχεδόν τις χώρες της Μεσογείου, είναι θεμελιώδους οικονομικής σημασίας.
- Μείωση της ποιότητας του θαλασσινού νερού με επιπτώσεις στις πολλαπλές χρήσεις του.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΜΕΣΑ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΤΙΑΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ

#### 2.1 Εισαγωγή

Η ρύπανση της θάλασσας από πετρελαιοειδή έχει σοβαρές επιπτώσεις για το φυσικό περιβάλλον και πολλές φορές προκαλεί ανεπανόρθωτες οικολογικές καταστροφές. Είναι επίσης αυτονόητο ότι όσο πιο γρήγορη και αποτελεσματική είναι η επέμβαση για την αντιμετώπιση ενός περιστατικού ρύπανσης, τόσο μειώνονται οι κίνδυνοι για το περιβάλλον και ελαχιστοποιείται το κόστος απορρύπανσης. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για την αποτελεσματική επέμβαση, είναι η γνώση της τακτικής που θα ακολουθηθεί και των μέσων που θα χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση της ρύπανσης και τον περιορισμό των δυσμενών επιπτώσεων της.

Ο παραπάνω, όμως, στόχος δεν μπορεί να επιτευχθεί, πλήρως, χωρίς την κατάλληλη επιχειρησιακή οργάνωση και εκπαίδευση, η οποία θα παρέχει μία πλήρη εξειδίκευση του αντικείμενου στους εμπλεκόμενους στην όλη διαδικασία (Αρχές - πληρώματα - φορτοεκφορτωτές - παράκτιες εγκαταστάσεις - εθελοντές κ.λπ.).

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται ορισμένα από τα μέσα καταπολέμησης της θαλάσσιας ρύπανσης που διαθέτει το Υ.Ε.Ν., διότι είναι το πρώτο βήμα αντιμετώπισης πριν φθάσει το πετρέλαιο στις ακτές, ενώ έπειτα δίνονται και σαφείς οδηγίες για τους τρόπους καταπολέμησης της ρύπανσης ακτών.

#### 2.2 Μέσα καταπολέμησης της θαλάσσιας ρύπανσης

##### 2.2.1 Φράγματα

Όταν το πετρέλαιο διαρρεύσει στην επιφάνεια της θάλασσας δεν θα παραμείνει στάσιμο στην περιοχή που διέρρευσε. Η βαρύτητα θα προκαλέσει το διασκορπισμό του και τα ρεύματα και οι άνεμοι την μετατόπιση του. Και οι δύο αυτές δυνάμεις δημιουργούν προβλήματα σε κάθε προσπάθεια που καταβάλλεται για την απομάκρυνση του πετρελαίου από την επιφάνεια της θάλασσας, που είναι και ο τελικός σκοπός όλων των προσπαθειών που αποσκοπούν στον έλεγχο της κηλίδας. Κάθε εμπόδιο στην πορεία του πετρελαίου θα επηρεάσει συνήθως την κίνηση του, αλλά μόνο η ακτή θα σταματήσει οριστικά την πορεία αυτή. Αφού στις περισσότερες περιπτώσεις η ανεξέλεγκτη πορεία του πετρελαίου στην ακτή είναι το λιγότερο επιθυμητό αποτέλεσμα μίας πετρελαιοκηλίδας, ο έλεγχος της κίνησης του πετρελαίου

και της εξάπλωσης του είναι ένας από τους κυρίους στόχους της τεχνολογίας για τον έλεγχο της πετρελαιοκηλίδας.

Τα πλωτά φράγματα που έχουν κατασκευαστεί για το σκοπό αυτό είναι κατάλληλα να δώσουν ένα σχετικά ικανοποιητικό βαθμό ελέγχου στη κίνηση της πετρελαιοκηλίδας.

Τα φράγματα είναι συσκευές που έχουν ειδικά κατασκευαστεί για τον έλεγχο της κίνησης του πετρελαίου στην επιφάνεια της θάλασσας. Τα φράγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλωβισμό, τη συγκέντρωση και την κατεύθυνση των κηλίδων πετρελαίου.

Οι κυριότεροι αντικειμενικοί σκοποί για τους οποίους χρησιμοποιούνται τα φράγματα είναι:

- Η συγκέντρωση πετρελαίου για να διευκολυνθεί η περισυλλογή του.
- Η προστασία ορισμένων περιοχών της ακτής από πετρέλαιο που διέρρευσε ή επανέπλευσε στην επιφάνεια του νερού.

### **2.2.2 Πετρελαιοσυλλέκτες ( Skimmers )**

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 αλλάζουν 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. Έτσι μπορούμε να διακρίνουμε δύο μεγάλες κατηγορίες μηχανημάτων:

- **Μηχανικοί Πετρελαιοσυλλέκτες**

Οι συσκευές αυτού του τύπου βασίζονται στις ιδιότητες των πετρελαίων και

των μιγμάτων πετρελαίου/νερού, καθώς και στη διαφορά πυκνότητας μεταξύ ρύπου και του νερού.

- **Ελαιόφιλοι Πετρελαιοσυλλέκτες**

Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στα χαρακτηριστικά ορισμένων υλικών που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια στο πετρέλαιο παρά στο νερό. Τα υλικά αυτά είναι γνωστά ως ελαιόφιλα.

### 2.2.3 Σκάφη Περισυλλογής (Skimmer Vessels)

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

Υπάρχουν πολλές σχεδιάσεις και μεγέθη σκαφών. Οι κύριοι τύποι αυτών των σκαφών που χρησιμοποιούνται έχουν ενσωματωμένη, με κάποια ειδική διάταξη, ανάλογη συσκευή, μηχανική ή ελαιοφιλή, για τη συλλογή του πετρελαίου. Άλλοι πάλι τύποι δέχονται διαφόρων ειδών συσκευές περισυλλογής. Οι μεγαλύτεροι τύποι σκαφών διαθέτουν και δεξαμενές απόθεσης του πετρελαίου, ενώ είναι ικανά για μεγαλύτερους ρυθμούς ανάκτησης, καλύτερη απόδοση και μπορούν να λειτουργήσουν και σε παραγμένη θάλασσα.

Τα βασικά χαρακτηριστικά των σκαφών αυτών είναι η χρήση τους στην ανοιχτή θάλασσα. Η απόδοσή τους είναι αρκετά καλύτερη από αυτή των συσκευών περισυλλογής και μπορούν να χαρακτηρισθούν ανάλογα με το σύστημα ανάκτησης του ρύπου που χρησιμοποιούν. Η χρήση τους περιορίζεται στην ανοιχτή θάλασσα αλλά και σε κλειστούς κόλπου με αρκετό βάθος.

Συνήθως δεν έχουμε την πολυτέλεια να επιλέξουμε από ένα ευρύ φάσμα σκαφών καθώς τα μέσα αυτά είναι αρκετά ακριβά για την απόκτηση τους. Ωστόσο κατά την επιλογή θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας το σημείο εντοπισμού της κηλίδας και την ταχύτητα προσέγγισης των σκαφών ώστε να προλάβουμε την κηλίδα πριν αυτή πλήξει τις ακτές. Ακόμη λαμβάνουμε υπόψη μας την κατάσταση της θάλασσας και το μέγεθος ή την έκταση της ρύπανσης.

Υπάρχουν συνέχεια νέες σχεδιάσεις και το ενδιαφέρον για τα μέσα αυτά συνεχώς αυξάνει καθώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε πολύ δυσμενής καιρικές συνθήκες.

### 2.2.4 Απορροφητικά Υλικά (Sorbents)

Τα απορροφητικά είναι υλικά που χρησιμοποιούν απορροφητικές ή προσκολλητικές ιδιότητες προκειμένου να περισυλλέξουν ρευστά. Τα απορροφητικά υλικά είναι ειδικά σχεδιασμένα για να περισυλλέγουν πετρέλαιο από την επιφάνεια του νερού.

Τα υλικά αυτά διακρίνονται ανάλογα με την πρώτη ύλη κατασκευής τους στις εξής βασικές κατηγορίες :

- *Κατεργασμένα Φυτικά (Natural Organic Sorbents).*
- *Κατεργασμένα Ορυκτά (Mineral Sorbents).*
- *Συνθετικά- Πολυμερή (Synthetic Sorbents).*

Ανάλογα με τη μορφή διάθεσή τους, μπορούν να διαχωριστούν σε:



- **Απορροφητικά Χύμα**

Τα προϊόντα αυτά είναι συνήθως σκόνες, λεπτά σωματίδια και μικρού μεγέθους οργανικές ή ορυκτές ίνες, ή βιομηχανικά κατάλοιπα.

- **Απορροφητικά Φράγματα και Μαξιλάρια και Φύλλα.**

Τα υλικά αυτά κατασκευάζονται με τη μορφή φραγμάτων, μαξιλαριών ή φύλλων και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση μικρών διαρροών ή προς το τέλος των εργασιών καθαρισμού.

Τα απορροφητικά υλικά διασκορπίζονται (με εξαίρεση τα απορροφητικά φράγματα) στην κηλίδα, όπου αφήνονται να κορεστούν από το πετρέλαιο και στη συνέχεια περισυλλέγονται. Τέλος χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό και με άλλα μέσα απορρύπανσης.

Η απαιτούμενη ποσότητα απορροφητικών που απαιτείται για την καταπολέμηση σε μεγάλες κηλίδες καθιστούν τη χρήση δυνατή πρακτικά μόνο σε μικρές και μεσαίου μεγέθους κηλίδες (λίγοι τόνοι μέχρι μερικές δεκάδες τόνοι). Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπισθεί ρύπανση διαφορετικών μορφών, για τις οποίες άλλες μέθοδοι καταπολέμησης δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν λόγω τεχνικών ή οικολογικών λόγων. Τέτοιες περιπτώσεις είναι η καταπολέμηση πετρελαίων μεγάλου ιξώδους και συνήθως κοντά στις ακτές. Σε πρώτη φάση τα απορροφητικά πρέπει να διασκορπισθούν πάνω στην επιφάνεια της κηλίδας. Τα απορροφητικά αφού κορεστούν συλλέγονται. [1]

## 2.2.5 Χημικές Διασκορπιστικές Ουσίες (Dispersants)

Τα διασκορπιστικά είναι μίγματα στα οποία περιλαμβάνονται επιφανειακά ενεργές ουσίες οι οποίες μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ νερού και πετρελαίου. Η δράση τους καθιστά δυνατή τη διάσπαση μιας πετρελαιοκηλίδας σε πολύ μικρά σταγονίδια που διασκορπίζονται γρήγορα στην υδάτινη στήλη λόγω της φυσικής κίνησης του νερού.

Χρησιμοποιούνται δύο τύποι διασκορπιστικών πετρελαίου. Αυτά συνήθως λέγονται "Συμβατικά" και "Συμπυκνωμένα" διασκορπιστικά αντίστοιχα. Τα συμβατικά διασκορπιστικά (που παλαιότερα ονομάζονταν διασκορπιστικά 2ης γενιάς) είναι συνήθως διαλύτες υδρογονανθρακικής βάσης και περιέχουν μίγμα γαλακτοποιητικών. Γενικά χρησιμοποιούνται αδιάλυτα όπως διατίθενται στο εμπόριο.

Τα συμπυκνωμένα διασκορπιστικά (που παλαιότερα ονομάζονταν διασκορπιστικά 3ης γενιάς) είναι μίγματα γαλακτοποιητών, διυγραντών και οξυγονωμένων διαλυτών. Περιέχουν περισσότερα ενεργά συστατικά από τα συμβατικά διασκορπιστικά και γενικά επιφέρουν ταχύτερο και καλύτερο διασκορπισμό του πετρελαίου.

Από εργαστηριακές δοκιμές έχει αποδειχθεί ότι τα συμβατικά ή τα συμπυκνωμένα διασκορπιστικά, που έχουν διαλυθεί σε νερό μπορούν να διασκορπίσουν μέχρι 8πλάσιο όγκο πετρελαίου, ενώ τα συμπυκνωμένα (αδιάλυτα) διασκορπιστικά μπορούν να διασκορπίσουν μέχρι και 80πλάσιο όγκο πετρελαίου.

Ο βαθμός διασκορπισμού μίας κηλίδας πετρελαίου εξαρτάται κατά πολύ από το σημείο ροής της και το ιξώδες σε θερμοκρασία θάλασσας. Οι καιρικές συνθήκες και η γαλακτοποίηση αυξάνουν γρήγορα το ιξώδες και τον βαθμό ρευστότητας με επακόλουθο την αύξηση της αντίστασης στο διασκορπισμό. Η κατάσταση της θάλασσας, η θερμοκρασία και η αλατότητά της παίζουν επίσης κάποιο ρόλο. Οι χρήστες διασκορπιστικών πρέπει να εξετάσουν τις φυσικές ιδιότητες της συγκεκριμένης πετρελαιοκηλίδας, τις θερμοκρασίες θάλασσας που επικρατούν κατά το χρόνο της διαρροής, καθώς επίσης και την κατάσταση της θάλασσας και το διαθέσιμο τύπο διασκορπιστικών.

Στην ανοικτή θάλασσα είναι δυνατόν να εκτοξευθούν από πλοία και αεροσκάφη. Σε προστατευόμενες περιοχές είναι δυνατόν να εκτοξευθούν από φορητές συσκευές ή οχήματα που είναι εφοδιασμένα με ψεκαστικό εξοπλισμό και σε μερικές περιπτώσεις από αεροσκάφη. Είναι πολύ σημαντικό να γίνεται χρήση δοκιμασμένου εξοπλισμού και να ακολουθούνται οι οδηγίες των κατασκευαστών του εξοπλισμού και των διασκορπιστικών. Οι εργασίες εκτόξευσης διασκορπιστικών πρέπει να αρχίζουν όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την οριστική απόφαση για χρήση διασκορπιστικών. Πολλά πετρέλαια σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα νερού στο πετρέλαιο (chocolate mousse), των οποίων το ιξώδες είναι μεγαλύτερο από αυτό του αρχικού πετρελαίου. Το γαλακτοποιημένο πετρέλαιο είναι πολύ δύσκολο να διασκορπισθεί. Συνεπώς, η χρήση διασκορπιστικών θα πρέπει να γίνει πριν αρχίσει η εκτεταμένη γαλακτοποίηση του πετρελαίου. [2]

Στη Μεσόγειο θάλασσα, που είναι μία ευαίσθητη περιοχή, και γενικότερα βέβαια η χρησιμοποίηση διασκορπιστικών στην παράκτια ζώνη δεν πρέπει να θεωρείται η καλύτερη επιλογή για την καταπολέμηση μίας σοβαρής ρύπανσης λόγω των τεράστιων επιπτώσεων που υπάρχουν στη χλωρίδα και στην πανίδα της περιοχής. Ωστόσο, επιλέχτηκε η καταπολέμηση με διασκορπιστικά ως τρόπος αντιμετώπισης της μεγαλύτερης μέχρι στιγμής οικολογικής καταστροφής προερχόμενης από πετρελαιοκηλίδα, στον Κόλπο του Μεξικού, τον Απρίλιο του 2010.

### 2.3 Καταπολέμηση της ρύπανσης ακτών

Παρά τις διάφορες μεθόδους και τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση μιας πετρελαιοκηλίδας μακριά από τις ακτές, είναι πολύ πιθανό ένα τμήμα του πετρελαίου, μικρό ή μεγάλο να φθάσει στην ακτή. Όπως έχει αποδειχθεί από την προηγούμενη εμπειρία, ένας μεγάλος αριθμός πετρελαιοκηλίδων, ιδιαίτερα εκείνες που παρατηρούνται σε σχετικά μικρή απόσταση από την ακτή, προκαλούν τις περισσότερες φορές σημαντική ρύπανση των ακτών.

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των ακτών θα αποφασιστεί μετά την εκτίμηση μίας σειράς παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται:

- Ο τύπος και η ποιότητα του πετρελαίου που χύθηκε.
- Ο τύπος της ακτής που προσβλήθηκε.
- Η εποχή του έτους.
- Οι μετεωρολογικές συνθήκες.
- Η δυνατότητα προσπέλασης και το φορτίο ρύπου που είναι σε θέση να αφομοιώσει η περιοχή που έχει προσβληθεί από πετρέλαιο.
- Η ύπαρξη διαθέσιμου προσωπικού και υλικών.

Οποιαδήποτε μέθοδος καθαρισμού και εάν επιλεγεί για μία συγκεκριμένη περιοχή και προκείμενου να υπάρξει το επιθυμητό αποτέλεσμα, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένοι σημαντικοί παράγοντες, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους αναφέρονται στη συνέχεια.

- Σειρά εργασιών και ο παράγοντος χρόνος: το πετρέλαιο που έχει προσβάλλει ένα συγκεκριμένο τμήμα της ακτής είναι δυνατό να επικαθίσει στην παραλία και να παραμείνει εκεί ή ένα μέρος του να επιπλέει κοντά στην ακτή. Επίσης οι ποσότητες του πετρελαίου μπορεί να ποικίλουν από ένα μεγάλο παχύ στρώμα μέχρι κομμάτια πετρελαίου διασπαρμένα. Συνεπώς οι προσπάθειες πρέπει να ακολουθούν μία από την παρακάτω σειρά εργασιών:

α). περισυλλογή μεγάλων ποσοτήτων πετρελαίου και ιδιαίτερα εκείνων που εξακολουθούν να επιπλέουν. Υπόψη ότι αν σε πρώτη φάση δεν γίνει αυτή η περισυλλογή, τότε ο άνεμος, τα κύματα, τα ρεύματα και η κίνηση της παλίρροιας θα μετατοπίσουν την κηλίδα σε άλλο μέρος της ακτής, το οποίο δεν είχε προσβληθεί ή είναι περισσότερο ευαίσθητο.

β). περισυλλογή του πετρελαίου που επικάθισε στην παραλία.

γ). περισυλλογή μικρών διάσπαρτων πετρελαιοκηλίδων. Αν το πετρέλαιο προσβάλλει την ακτή και αποφασισθεί ο καθαρισμός της, οι σχετικές εργασίες πρέπει να αρχίσουν έγκαιρα, αφού οποιαδήποτε καθυστέρηση θα έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του πετρελαίου στην άμμο, τα βράχια ή την βλάστηση και αύξηση της ποσότητας του, που θα διεισδύσει βαθύτερα στο υλικό της παραλίας και επομένως θα είναι δυσκολότερη και δαπανηρότερη η περισυλλογή του.

### 2.3.1 Μέθοδοι καθαρισμού ακτών

Με βάση την πείρα που αποκτήθηκε από την αντιμετώπιση περιστατικών ρύπανσης κατά το παρελθόν, έχουν αναπτυχθεί ορισμένες βασικές μέθοδοι και τεχνικές για τον καθαρισμό των ακτών που περιλαμβάνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Περισυλλογή του πετρελαίου και των υλικών που προσβλήθηκαν από αυτό (χειρονακτικά και μηχανικά).
- Έκπλυση του πετρελαίου (με νερό, μερικές μη Μεσογειακές χώρες χρησιμοποιούν σε ορισμένες περιπτώσεις και dispersants).
- Καύση του πετρελαίου και των υλικών που έχουν προσβληθεί από πετρέλαιο.
- Αποικοδόμηση του πετρελαίου με την επίδραση φυσικών φαινομένων.

#### *1. Χειρωνακτική περισυλλογή των υλικών που προσβλήθηκαν με πετρέλαιο.*

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε τύπο ακτογραμμής για την περισυλλογή πετρελαίου και των υλικών που προσβλήθηκαν από αυτό, ειδικά όταν η προσβολή δεν είναι μεγάλης έκτασης. Είναι η μόνη εφαρμόσιμη μέθοδος καθαρισμού ακτών που δεν είναι προσπελάσιμες ή παρουσιάζουν οικολογική ευαισθησία. Η μέθοδος αυτή απαιτεί την χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού ατόμων και για αυτό είναι δαπανηρή.

#### *2. Μηχανική περισυλλογή των υλικών που προσβλήθηκαν με πετρέλαιο.*

Διάφοροι τύποι χωματουργικών μηχανημάτων είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία (π.χ. ερπυστριοφόρα οχήματα, οχήματα με ρόδες, φορτωτές κ.λπ.) για την απομάκρυνση, από την παραλία, πετρελαίου και των υλικών που προσβλήθηκαν από αυτό (άμμος, βότσαλα, χαλίκια, πέτρες). Η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο επιλεκτική από την χειρωνακτική. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ακτές που είναι προσπελάσιμες από την ξηρά και μπορούν να αντέξουν την κίνηση βαρέων οχημάτων. Η μηχανική περισυλλογή μπορεί να συνδυαστεί με την χειρωνακτική περισυλλογή υλικών που έχουν προσβληθεί από πετρέλαιο.

#### *3. Χρησιμοποίηση βυτιοφόρων*

Η μέθοδος αυτή, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα σοβαρά περιστατικά ρύπανσης, συνίσταται στην αφαίρεση του πετρελαίου που είναι συσσωρευμένο σε εσοχές της ακτής και επιπλέει κοντά στην ακτογραμμή.

#### *4. Χρήση μηχανημάτων καθαρισμού ακτών*

Τα μηχανήματα καθαρισμού ακτών έχουν κατασκευασθεί ειδικά για τον καθαρισμό της άμμου και των χαλικιών από κομμάτια σταθεροποιημένου πετρελαίου.

Χρησιμοποιούνται επίσης και για τον καθαρισμό των ακτών από απορρίμματα. Τα μηχανήματα καθαρισμού ακτών μπορεί να είναι αυτοκινούμενα ή ρυμουλκούμενα από τρακτέρ. Η πλέον συνηθισμένη αρχή λειτουργίας τους είναι εκείνη κατά την οποία το στρώμα της άμμου που προσβλήθηκε από πετρέλαιο κοσκινίζεται και επιστρέφεται στην ακτή, ενώ τα κομμάτια της πίσσας και τα σκουπίδια οδηγούνται σε ρυμουλκούμενη ή ενσωματωμένη δεξαμενή απόθεσης σκουπιδιών.

#### 5. *Αμμοβολή*

Η χρήση του εξοπλισμού αμμοβολής πρέπει να περιορίζεται σε τεχνικές κατασκευές, στις οποίες απαιτείται να γίνει τέλειος καθαρισμός. Περιστασιακά όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες πέτρες ή βράχια, που δεν είναι οικολογικά ευαίσθητα. Το πετρέλαιο που παραμένει, η άμμος και το υλικό που αποξέστηκε από τις επιφάνειες στις οποίες έγινε αμμοβολή πρέπει να συλλέγεται και να μεταφέρεται στο χώρο διάθεσης.

#### 6. *Πλύση με χαμηλή πίεση*

Η πλύση με νερό (θάλασσας) χαμηλής πίεσης μπορεί να γίνει για την αφαίρεση ελαφρού και όχι πολύ παχύρρευστου πετρελαίου από κάθε μορφή ακτής. Δεν επηρεάζει σημαντικά το υπόστρωμα και ως εκ τούτο είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε πολύ ευαίσθητες περιοχές. Το πετρέλαιο που απομακρύνεται με τη μέθοδο αυτή μπορεί να προσβάλλει και άλλο τμήμα της ακτής, γι' αυτό πρέπει να εγκλωβίζεται με φράγματα ή να διοχετεύεται σε λακκούβες συγκέντρωσης και να συλλέγεται με συσκευές περισυλλογής, αντλίες, ή άλλες αναρροφητικές μονάδες.

#### 7. *Πλύση με υψηλή πίεση*

Το πετρέλαιο που έχει προσκολληθεί σε ανώμαλες επιφάνειες μπορεί να απομακρυνθεί κατά τρόπο αποτελεσματικό, όταν εκτοξευτεί σε αυτό ψυχρό ή ζεστό νερό με πίεση. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε βραχώδεις ακτές εκεί που υπάρχουν μεγάλες πέτρες και τεχνικές κατασκευές. Το πετρέλαιο που αφαιρείται ενδέχεται να καταλήξει στη θάλασσα και να προσβάλει κάποιο άλλο τμήμα της ακτής. Γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθούν φράγματα ή συσκευές περισυλλογής, προκειμένου να περιορισθεί η εξάπλωση του πετρελαίου και να καταστεί δυνατή η αναρρόφηση του ή να γίνει χρήση απορροφητικών υλικών.

#### 8. *Καθαρισμός με ατμό*

Τα πολύ παχύρρευστα πετρέλαια που υπέστησαν την επίδραση των καιρικών συνθηκών είναι δυνατόν να αφαιρεθούν από βράχια, μεγάλες πέτρες και τεχνικές κατασκευές με χρήση ατμού. Ο ατμός αυξάνει την θερμοκρασία του πετρελαίου και μειώνει το ιξώδες του με αποτέλεσμα να γίνεται λεπτόρρευστο. Με αυτή τη μέθοδο είναι πολύ πιθανό να καταστραφεί κάθε ζωντανός οργανισμός που ζει στην επιφάνεια που ρυπάνθηκε. Για αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο όταν είναι απόλυτα αναγκαίο να αφαιρεθεί το πετρέλαιο και αφού γίνει εκτίμηση των πιθανών επιπτώσεων στο περιβάλλον. Η χρησιμοποίηση της μεθόδου αυτής ενδείκνυται μόνο σε τεχνικές κατασκευές.

#### 9. *Καύση*

Αν και φαίνεται σαν μία λογική λύση για την περισυλλογή πετρελαίου από τις ακτές, η μέθοδος αυτή πολύ σπάνια χρησιμοποιείται. Εκτός από το γεγονός ότι είναι πολύ

επιβλαβής για τη χλωρίδα και πανίδα, δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική δεδομένου ότι το πετρέλαιο ψύχεται από το υπόστρωμα της παραλίας και δεν καίγεται πλήρως. Η ατελής καύση έχει σαν αποτέλεσμα την εκτεταμένη ατμοσφαιρική ρύπανση από την οποία είναι πολύ πιθανό να προσβληθούν γειτονικές περιοχές.

#### *10. Μετατόπιση υλικών που προσβλήθηκαν από πετρέλαιο στη θάλασσα*

Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό ακτών με βότσαλα ή χαλίκια που δεν έχουν ρυπανθεί σοβαρά από πετρέλαιο, καθώς επίσης και σε ακτές με μεγάλες πέτρες. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική πριν ή κατά τη διάρκεια του χειμώνα όταν αναμένεται αρκετός κυματισμός. Το στρώμα του υλικού που προσβλήθηκε από πετρέλαιο, μετατοπίζεται στην άκρη της θάλασσας όπου με την επίδραση των κυμάτων και την κίνηση του υλικού, το πετρέλαιο ελευθερώνεται. Το υλικό που έχει μετατοπιστεί στη θάλασσα επιστρέφει στην ακτή υπό την επίδραση του κυματισμού και της παλίρροιας.

#### *11. Ανάμειξη με το υπόστρωμα*

Αν προσβληθεί ελαφρά μια ακτή με άμμο ή χαλίκια, η οποία δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον από πλευράς αναψυχής, το πετρέλαιο αφήνεται να αποικοδομηθεί με την επίδραση των φυσικών φαινομένων. Με τη μέθοδο αυτή δεν επιδιώκεται η αφαίρεση του πετρελαίου από την παραλία, αλλά μόνο η αύξηση του ρυθμού της φυσικής αποικοδόμησης. Στη περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται άροτρο ρυμουλκούμενο από τρακτέρ για την ομοιόμορφη ανάμειξη του ανώτερου υποστρώματος της άμμου ή των χαλικιών που προσβλήθηκαν, με το καθαρό υπόστρωμα.

#### *12. Αποφυγή επέμβασης*

Σε ορισμένες περιπτώσεις η μόνη λύση για την αντιμετώπιση πετρελαίου που έχει επικαθίσει στην ακτή είναι να το αφήσουμε να αποικοδομηθεί χωρίς να γίνει καμιά επέμβαση. Η μέθοδος της φυσικής αποικοδόμησης του πετρελαίου δικαιολογείται στην περίπτωση που η οικολογική ευαισθησία της περιοχής είναι πολύ υψηλή και η χρησιμοποίηση οποιασδήποτε άλλης μεθόδου καθαρισμού θα προκαλέσει μεγαλύτερη ζημιά από αυτή που θα προκαλέσει το ίδιο το πετρέλαιο. Επίσης δικαιολογείται αν η περιοχή που προσβλήθηκε δεν έχει καμία οικονομική σημασία. Μερικές φορές όταν η περιοχή που προσβλήθηκε δεν είναι προσπελάσιμη από ξηράς ή από θάλασσα, το πετρέλαιο αφήνεται να αποικοδομηθεί με την επίδραση φυσικών φαινομένων. Η χρησιμοποίηση αυτής της μεθόδου μπορεί να εφαρμοστεί σε παραλίες υψηλού ενδιαφέροντος πριν ή κατά την διάρκεια του χειμώνα, όταν είναι σχεδόν βέβαιο ότι τα κύματα και η ενεργεία της παλίρροιας θα απομακρύνουν το εγκλωβισμένο πετρέλαιο πριν αρχίσει π.χ. η τουριστική περίοδος. [3]

### **2.4 Βιοεξγύανση εδαφών με τη μέθοδο του Landfarming**

Μία από τις πιο επιτυχημένες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί, είναι η τεχνική του Landfarming. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις, και ειδικά για την εφαρμογή σε ρυπασμένο από πετρελαιοειδή παράκτιο περιβάλλον, καθώς παρουσιάζει ορισμένα καθοριστικά πλεονεκτήματα –π.χ. απλότητα χρήσης, αλλά το

πιο σημαντικό είναι ότι συνδυάζει σχετικά χαμηλό κόστος με υψηλή απόδοση στην απορρύπανση.

Η τεχνική Landfarming, επίσης αναφέρεται και ως επεξεργασία εδάφους, πρόκειται για μία τεχνολογία που εφαρμόζεται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους(ex-situ) και επιτυγχάνει την μείωση των συγκεντρώσεων των ρυπαντών μέσω της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης[12].

Συνήθως, περιλαμβάνει την ανάμειξη και ανάδευση του ρυπασμένου χώματος με καθαρό ώστε να διατηρούνται αερόβιες συνθήκες, και την τόνωση/ενίσχυση της μικροβιακής δραστηριότητας μέσω του αερισμού, της προσθήκης θρεπτικών συστατικών και υγρασίας. Η ενισχυμένη μικροβιακή δραστηριότητα επιτυγχάνει την αποδόμηση απορροφημένων συστατικών του πετρελαίου με τη μικροβιακή αναπνοή. Επιπροσθέτως, δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στον έλεγχο ορισμένων παραμέτρων του εδάφους(υγρασία, συχνότητα αερισμού, pH) ώστε να εξασφαλίζεται ο βέλτιστος ρυθμός βιοαποικοδόμησης. [12,13]

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται εδώ και αρκετές δεκαετίες για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων με συστήματα βιολογικής επεξεργασίας, ενώ η εφαρμογή της στην ελεγχόμενη αποδόμηση των οργανικών ρύπων του εδάφους και των υπογείων υδάτων είναι πολύ πρόσφατη.

Κατά την τελευταία δεκαπενταετία, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την απορρύπανση εδαφών από πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (poly-aromatic hydrocarbons, PAH), πτητικές οργανικές ουσίες (όπως το πολύ γνωστό BTEX5), χλωριούχους οργανικούς ρύπους (όπως ο τετραχλωράνθρακας, οι πενταχλωροφαινόλες-PCP και τα επίσης γνωστά PCBs6) και άλλες οργανικές ενώσεις.

Η βιολογική αποδόμηση των οργανικών ενώσεων γίνεται μέσω της δράσης μικροοργανισμών ( βακτηριδίων, μυκήτων, κ.λ.π.) οι οποίοι αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τον άνθρακα ή/και την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τον μεταβολισμό ( αποσύνθεση ) των οργανικών ουσιών.

Οι μικροοργανισμοί αποσυνθέτουν τις οργανικές ενώσεις χρησιμοποιώντας ως καταλύτες κατάλληλα ένζυμα ( πρωτεΐνες ) τα οποία παράγουν οι ίδιοι. Το τελικό προϊόν της αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών μέσω των μικροοργανισμών είναι ανόργανες ουσίες ( διοξείδιο του άνθρακα και νερό) που συνήθως θεωρούνται λιγότερο επιβλαβείς ενώσεις από τις αρχικές, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ατελούς αποσύνθεσης παράγονται και άλλες απλές ενώσεις, όπως μεθάνιο, υδρόθειο, νιτρικά και θειικά άλατα.

Για να συντελεσθεί η αποσύνθεση των οργανικών ουσιών μέσω των μικροοργανισμών απαιτούνται οι εξής προϋποθέσεις:

1. Η παρουσία κατάλληλων μικροοργανισμών, δηλαδή μικροοργανισμών που παράγουν ένζυμα κατάλληλα για τον μεταβολισμό της συγκεκριμένης οργανικής ουσίας.
2. Η παρουσία οργανικών ουσιών οι οποίες με την αποσύνθεσή τους θα παράσχουν την απαιτούμενη ενέργεια στους μικροοργανισμούς για να αναπτυχθούν.
3. Η παρουσία θρεπτικών ουσιών ( nutrients ) , όπως το άζωτο, ο φώσφορος, το κάλιο, το θείο, κ.λ.π. που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



4. Η παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων ( electron acceptors ), δηλαδή ατόμων ή ριζών τα οποία δέχονται τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν κατά την οξείδωση των οργανικών ουσιών.

5. Η παρουσία κατάλληλων συνθηκών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα: κατάλληλη *υγρασία, θερμοκρασία και pH και η απουσία ορισμένων χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις που είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς* και τους καταστρέφουν.

Συνεπώς οι τεχνολογίες βιολογικής αποκατάστασης έχουν σκοπό να εξασφαλίσουν και να ενισχύσουν με ελεγχόμενο τρόπο τις ανωτέρω απαιτήσεις ώστε να συντελεσθεί η αποσύνθεση των οργανικών ουσιών που αποτελούν το ρυπαντικό φορτίο του εδάφους, των ακτών ή των υπογείων νερών.

Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη αφενός μεν η κατανόηση της λειτουργίας των μηχανισμών βιολογικής αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών, αφετέρου δε η ανάπτυξη της σχετικής τεχνολογίας ώστε με τεχνικές επεμβάσεις να διατηρούνται οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των μικροοργανισμών.

#### 2.4.1 Μικροοργανισμοί και οργανικές ενώσεις

Εφόσον πληρούνται οι προϋποθέσεις που περιγράφηκαν παραπάνω αναπτύσσονται μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να διασπάσουν τις περισσότερες οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στη φύση ή κατασκευάζονται από τον άνθρωπο. Η διάσπαση των οργανικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς γίνεται με βάση τις εξής αρχές:

α) Σε περίπτωση παρουσίας πολλών οργανικών ενώσεων, αρχικώς διασπώνται οι απλούστερες ενώσεις επειδή είναι ευχερέστερη η ανάπτυξη μικροοργανισμών που παράγουν ένζυμα για τη διάσπαση των απλών ενώσεων.

β) Για τη διάσπαση των σύνθετων οργανικών ουσιών που κατασκευάζονται από τον άνθρωπο, απλώς απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ώστε αφενός μεν να διασπασθούν προηγουμένως οι απλούστερες ενώσεις, αφετέρου δε να συμβεί προσαρμογή των μικροοργανισμών ( acclimation), δηλαδή να παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα που διασπούν τις πλέον σύνθετες ενώσεις.

γ) Η αποσύνθεση των οργανικών ουσιών γίνεται σε διαδοχικές φάσεις με τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών. Έτσι μία ομάδα μικροοργανισμών διασπά την αρχική οργανική ένωση σε μία απλούστερη, η οποία στη συνέχεια διασπάται εκ νέου από άλλους μικροοργανισμούς και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου τελικώς παραχθούν πολύ απλές ενώσεις ( CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, κ.λ.π.)

Ο ρυθμός της βιολογικής διάσπασης των οργανικών ουσιών εξαρτάται από το είδος των βακτηριδίων που προκαλούν την αποδόμηση και τις συνθήκες του περιβάλλοντος που συχνά αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την δράση των μικροοργανισμών.

Αρκετές συνήθειες διασπάσεις ακολουθούν τον γνωστό εκθετικό νόμο των πυρηνικών διασπάσεων ( Monod kinetics) κατά τον οποίο ο ρυθμός διάσπασης είναι ανάλογος του διαθέσιμου για διάσπαση αριθμού μορίων. Κατά τον νόμο αυτό, η συγκέντρωση ( C) της οργανικής ουσίας την χρονική στιγμή (t) είναι :

$$C = C_0 \cdot e^{\lambda \cdot t}$$

Όπου (Co) είναι η αρχική συγκέντρωση ( για  $t=0$ ) και ( $\lambda$ ) είναι η σταθερά της διάσπασης.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω και δοθέντος αρκετού χρόνου ( και προφανώς με τις κατάλληλες λοιπές συνθήκες) θα αναπτυχθούν μικροοργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν και τις πλέον σταθερές συνθετικές οργανικές ενώσεις.

### **Θρεπτικές ουσίες (Nutrients)**

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών απαιτεί την παρουσία θρεπτικών ουσιών οι οποίες αποτελούν συστατικά των κυττάρων, όπως το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), το θείο (S) και λοιπά ιχνοστοιχεία. Τα στοιχεία αυτά συνήθως υπάρχουν στα εδαφικά υλικά. Σε περίπτωση έλλειψης θα πρέπει να προστίθενται οι κατάλληλες ουσίες ώστε να μην διακόπτεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Μια ικανοποιητική αναλογία άνθρακα (C), αζώτου (N), φωσφόρου(P)στο έδαφος για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι : 100:10:1.

### **Δέκτες ηλεκτρονίων**

Κατά τον βιολογικό μεταβολισμό οι διασπώμενες οργανικές ενώσεις χάνουν ηλεκτρόνια τα οποία μεταφέρονται σε κάποιον δέκτη ηλεκτρονίων. Κατά την αερόβια διάσπαση, ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο. Έτσι π.χ. η αερόβια αποσύνθεση (οξείδωση) του βενζολίου παρουσιάζεται από τη σχέση :  $C_6H_6 + 7,5 O_2 = > 6CO_2 + 3H_2O$ . Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο, δηλαδή υπό αναερόβιες συνθήκες, η νιτρική ρίζα, ιόντα σιδήρου, ιόντα μαγγανίου και η θειική ρίζα μπορούν να δράσουν σαν δέκτες ηλεκτρονίων, εάν βέβαια στο σύστημα έχουν αναπτυχθεί μικροοργανισμοί που δύναται να παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα. Όπως φαίνεται από την ανωτέρω χημική αντίδραση, η αερόβια οξείδωση των οργανικών ενώσεων αφαιρεί οξυγόνο από το σύστημα. Εάν το οξυγόνο δεν αναπληρωθεί ( μηχανική ανάμιξη, τεχνητός αερισμός, κ.λ.π.) τελικώς το σύστημα θα μετατραπεί σε αναερόβιο, θα αναπτυχθούν αναερόβιοι μικροοργανισμοί και η αποσύνθεση θα δώσει και μεθάνιο ( $CH_4$ ) αντί του διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ ). Η αερόβια οξείδωση δίνει τα πλέον αβλαβή προϊόντα και συνεπώς είναι προτιμητέα. Έτσι στα συστήματα απορρύπανσης, μέσω της βιολογικής αποσύνθεσης θα πρέπει να γίνεται κατάλληλος μηχανικός αερισμός ώστε η συγκέντρωση του οξυγόνου να διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα.

### **Υγρασία**

Η παρουσία της υγρασίας είναι απαραίτητη για τη δράση των μικροοργανισμών. Το ιδανικό ποσοστό υγρασίας στο έδαφος είναι 15-30%. Εάν η υγρασία μειωθεί κάτω από το 15% η δράση των μικροοργανισμών αναστέλλεται. Επίσης εάν η υγρασία αυξηθεί πάνω από το 30% ( όπου ο βαθμός κορεσμού του εδάφους είναι σχεδόν 100%) δεν γίνεται ικανοποιητικός αερισμός του εδάφους και το διαθέσιμο οξυγόνο μειώνεται.

### **Θερμοκρασία**

Ο ρυθμός ανάπτυξης και δράσης των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Σε χαμηλές θερμοκρασίες ( 5-10°C) οι μικροοργανισμοί αδρανοποιούνται, χωρίς όμως να καταστρέφονται, ενώ στις υψηλές, άνω των 60°C, καταστρέφονται. Η κατάλληλη τιμή για την επώαση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών κυμαίνεται μεταξύ των 20-30°C.

### ***pH***

Οι βέλτιστες τιμές του pH για την δράση των μικροοργανισμών είναι 5,5-8,5. Συνεπώς η ρύθμιση του pH του εδάφους είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της βιολογικής αποσύνθεσης των οργανικών ρύπων.

### ***Τοξικότητα***

Ορισμένες χημικές ενώσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς. Στη δικιά μας περίπτωση, όπου το πείραμα διεξάγεται στο έδαφος και συγκεκριμένα στην ακτή, θα πρέπει να ελέγχεται η τοξικότητα των χημικών ουσιών που περιέχονται σε αυτό για διάφορους τύπους μικροοργανισμών. Η διαδικασία αυτή γίνεται με ειδικές δοκιμές (toxicity assays) κατά τις οποίες ένα πρότυπο σύστημα μικροοργανισμών εκτίθεται σε δείγμα του εδάφους και παρακολουθούνται οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών για ενδείξεις τοξικότητας. Στις περιπτώσεις αυξημένης τοξικότητας μπορεί να γίνει ανάμειξη του εδάφους με άλλα "καθαρά" εδαφικά υλικά ή να γίνει έκπλυση του εδάφους, ώστε να μειωθούν οι συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η βιοεξυγίανση, είναι μία πολύ αποτελεσματική μέθοδος για την εξουδετέρωση των οργανικών ρύπων. Βεβαίως θα πρέπει να τονίσουμε και πάλι ότι η δράση των μικροοργανισμών που διασπούν τους οργανικούς ρύπους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σημαντικότεροι των οποίων αναφέρθηκαν παραπάνω. Αν και η βιοεξυγίανση υπό αναερόβιες συνθήκες είναι δυνατή, θα πρέπει να προτιμάται η αερόβια επειδή καταλήγει σε περισσότερο αβλαβή προϊόντα.

Η μέθοδος είναι αποτελεσματική για την απορρύπανση εδαφών πάνω από τη στάθμη του υπόγειου ορίζοντα (στη μερικώς κορεσμένη ζώνη), επειδή στα κορεσμένα εδάφη δεν είναι ευχερής ο αερισμός και συνεπώς ευνοούνται συνθήκες αναερόβιας αποσύνθεσης. Επίσης η μέθοδος είναι αποτελεσματική σε σχετικώς χονδρόκοκκα εδάφη επειδή και πάλι σε αυτά είναι ευχερής ο αερισμός ( $k > 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec}$ )

## **2.4.2 Σχεδιαστικά στοιχεία της μεθόδου**

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

- Την «διαμόρφωση» του χώρου: εκρίζωση και εκκαθάριση από αντικείμενα ή οτιδήποτε άλλο πρόκειται να παρεμποδίσει την διαδικασία αποκατάστασης.
- Τον σχεδιασμό για τον έλεγχο της σκόνης, η οποία δημιουργείται κατά τη διαδικασία της μηχανικής ανάδευσης του χώματος, αλλά και των πιο ελαφριών συστατικών του πετρελαίου τα οποία εξατμίζονται και έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ο σχεδιασμός αυτός προϋποθέτει τη δέσμευση των σωματιδίων και των VOCs πριν ανέλθουν στην ατμόσφαιρα και τη μεταφορά τους σε κατάλληλη μονάδα επεξεργασίας πριν τη τελική απελευθέρωσή τους.
- Την τοποθέτηση μη διαπερατής μεμβράνης (μεμβράνη υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου με πάχος ) για την προστασία του υδροφορέα, καθώς υπάρχει η πιθανότητα να εισχωρήσουν σε αυτόν τοξικά υγρά [14].

- Το παραπάνω θα πρέπει να συνδυάζεται με σύστημα συλλογής ομβρίων και διασταλλαγμάτων (τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια σε μονάδα επεξεργασίας λυμάτων).
- Στην περίπτωση που η προς επεξεργασία έκταση βρίσκεται σε περιοχή με μεγάλο ετήσιο ύψος βροχής (π.χ. ), τότε συνήθως είναι απαραίτητη η τοποθέτηση μιας στέγης πάνω από την έκταση, π.χ. ένα πλαστικό τούνελ ή κατασκευή δομής θερμοκηπίου (παράδειγμα της μορφής του οποίου δίνεται στο εικόνα 2(παρακάτω), ώστε να μην μεταβάλλεται σημαντικά η περιεχόμενη στο χώμα υγρασία.
- Είναι άκρως απαραίτητο, η δημιουργία ενός συστήματος παρακολούθησης της κατάστασης του υδροφορέα, καθώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος ρύπανσης του, λόγω διάτρησης της αδιαπέρατης μεμβράνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός ή δύο πηγαδιών παρακολούθησης(μέσω των οποίων γίνεται μέτρηση για τον εντοπισμό πιθανής παρουσίας ρυπαντών σε διαφορετικά βάθη.

### ***Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου***

Η μέθοδος αυτή της απορρύπανσης του εδάφους, παρόλα τα θετικά στοιχεία, τα οποία συντελούν στην απομάκρυνση των πετρελαιοειδών από τις ρυπασμένες ακτές, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα τα οποία θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη πριν την τελική επιλογή της τεχνικής.

Ξεκινώντας πρώτα από τα ***πλεονεκτήματα***, διακρίνουμε τα εξής:

- Η τεχνική παρουσιάζει μια ευκολία όσον αφορά το σχεδιαστικό κομμάτι.
- Ο χρόνος που απαιτείται για την αποκατάσταση του πεδίου είναι σχετικά μικρός, υπολογίζεται στους 6 με 24 μήνες κάτω από ιδανικές συνθήκες,
- Το κόστος είναι μικρό και όσον τα λειτουργικά έξοδα και τα επενδυτικά.
- Και τέλος, είναι μία μέθοδος με ελάχιστες επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Στα ***μειονεκτήματα*** τώρα έχουμε:

- Είναι πολύ δύσκολη η επίτευξη της μείωσης της συγκεντρώσεως των ρύπων άνω του 95% και συγκεντρώσεων συστατικών του πετρελαίου κάτω του 0,1 ppm.
- Όταν το έδαφος περιέχει πολλούς οργανικούς ρύπους, είναι πιθανόν οι πλέον τοξικοί να διασπώνται δυσκολότερα, και συνεπώς η εξυγίανση του εδάφους από τους ρύπους αυτούς να καθυστερήσει, λόγω ευχερέστερης διάσπασης των άλλων οργανικών ουσιών ( οι οποίες όμως έχουν μικρότερο ενδιαφέρον από πλευράς ρυπαντικού φορτίου).
- Η μέθοδος είναι ευαίσθητη σε πολλούς παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να ελέγχονται και να ρυθμίζονται διαρκώς ώστε να επιτυγχάνονται βέλτιστοι ρυθμοί δράσης των μικροοργανισμών και συνεπώς βέλτιστη αποδόμηση των ρύπων.
- Η μέθοδος είναι πρόσφορη για την αποδόμηση οργανικών κυρίως ρύπων, αν και ενίοτε χρησιμοποιείται για την αποδόμηση και διάσπαση ανόργανων ουσιών. [3],[7],[10]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Υλικά και Μέθοδοι – Δοκιμή Αποτελεσματικότητας των Παραγόντων Βιοδιέγερσης/Βιοεξυγίανσης

#### 3.1 Περίληψη της Μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των παραγόντων βιοεξυγίανσης βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης της EPA (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C). Το πρωτόκολλο δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης σχεδιάστηκε για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοδιασπάσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας τις αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης. Το πρωτόκολλο εξετάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα και ποσοτικοποιεί την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων και των πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την εκχύλιση της φάσης του πετρελαίου στο διχλωρομεθάνιο (DCM), με μια επόμενη ανταλλαγή διαλύτη σε εξάνιο. Για να ολοκληρωθούν αποτελεσματικά οι στόχοι του πρωτοκόλλου δοκιμής, είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθεί η συγκέντρωση των διάφορων αναλυτών στο πετρέλαιο σε έναν μη-βιοδιασπάσιμο δείκτη, είτε C2-ή C3-φθενανθρένιο, C2-χρυσένιο, ή χοπάνιο. Η μέθοδος δοκιμής στοχεύει τα σχετικά εύκολα να διασπαστούν κανονικά αλκάνια και τα ανθεκτικότερα και τοξικά PAHs. Κανονικοποιεί τις συγκεντρώσεις τους σε C2-ή C3- φθενανθρένιο, C2- χρυσένιο, ή C30 17α(H), 21β (H)- χοπάνιο σε μια βάση βάρους πετρελαίου (mg δείκτη/kg πετρελαίου, mg αναλύτη στόχου/kg πετρελαίου). Η αναλυτική τεχνική χρησιμοποιεί έναν αέριο χρωματογράφο/φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης (GC/MS) λόγω του υψηλού βαθμού χημικού διαχωρισμού και φασματικής ανάλυσης. Το GC/MS έχει χρησιμοποιηθεί από καιρό για να μελετήσει τη γήρανση και τη τύχη των διαρροών πετρελαίου στο περιβάλλον. Για τις ποσοτικές αναλύσεις, το όργανο λειτουργεί στον selective ion detection (SIM) με ρυθμό ανίχνευσης μεγαλύτερο από 1,5 ανιχνεύσεις ανά δευτερόλεπτο για να μεγιστοποιηθεί το εύρος της γραμμικής ποσοτικοποίησης και η ακρίβεια του οργάνου. Η μέθοδος προετοιμασίας των δειγμάτων δεν αποκλείει την ανάλυση των επιλεγμένων δειγμάτων από το GC/MS σε full scanning τρόπο λειτουργίας για να αξιολογηθούν ποιοτικά οι αλλαγές στο πετρέλαιο που δεν ελήφθησαν από την προσέγγιση SIM. Εκτελείται ταυτόχρονα με τη χημική ανάλυση που περιγράφεται ανωτέρω και μικροβιολογική ανάλυση. Η μικροβιολογική ανάλυση εκτελείται για να καθοριστεί και να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών πληθυσμών. Κάτω από αυτήν την διαδικασία, οι μικροβιακές απαριθμήσεις των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων εκτελούνται σε κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιώντας έναν microtiter Most Probable Number (MPN) προσδιορισμό [4].

### **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ:**

1. ογκομετρικοί κύλινδροι
2. απιονισμένο νερό
3. χαρτί ζύγισης
4. 250-ml βιοπολυριτικές κωνικές φιάλες με βιδωτό καπάκι
5. Πιπέτες των 2ml, 10 ml, 25 ml
6. Falcons των 25ml
7. Pans(αλουμινένια κεσεδάκια)
8. Σωλήνες αραίωσης και καπάκια
9. Αποστειρωτικός κλίβανος
10. Επωαστικός θάλαμος
11. Ζυγαριά ακριβείας 0.1mg
12. Άγαρ marine broth
13. Bushnell-Hass medium
14. Microtitier MPN plates(96-well)
15. loops
16. Τριβλία
17. Βαφή INT

### **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ:**

1. Πιπέτες Pasteur
2. Σφαιρικές φιάλες
3. Υαλοβάμβακας

4. Υποδοχείς
5. Εκχυλιστήρες SOXHLET
6. Ογκομετρικές φιάλες
7. Ξηραντήρας
8. Vials 2, 5, 20, 40 ml
9. Στήλες SPE(Solid Phase Extraction)
10. Μηχάνημα Αζώτου (Nitrogen flow)
11. GC/MS όργανο

### 3.2 Προετοιμασία Πετρελαίου

Ένα μετρίου βάρους αργό πετρέλαιο, (ελαφρύ αργό πετρέλαιο από το Καζακστάν), γηραίνεται τεχνητά με θέρμανση στους 210 °C, σύμφωνα με τη μέθοδο ASTM D86 για να αφαιρεθεί το ελαφρύ κλάσμα των υδρογονανθράκων πριν από το ξεκίνημα του πειράματος. Αυτό έγινε ώστε να προσομοιάσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν σε μία ρυπασμένη ακτή, καθώς από το πετρέλαιο που τη ρυπαίνει, έχουν εξατμιστεί τα ελαφριά συστατικά μέσα σε λίγο μόνο χρόνο (από τη στιγμή της εμφάνισης της πετρελαιοκηλίδας). Αν και η εξαέρωση αυτή εξαρτάται από τη σύνθεση του πετρελαίου, έχει υπολογιστεί ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, μέχρι και 50% των πιο τοξικών, ελαφριών συστατικών του, να εξατμιστεί μέσα στις πρώτες 12 ώρες από τη διαρροή[U.S. EPA, 1999].

Πυκνότητα πετρελαίου:

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

### 3.3 Προετοιμασία άμμου

Όλα τα προϊόντα εξετάζονται σε καθαρή φυσική άμμο. Καθαρή φυσική άμμος σημαίνει ότι η πηγή αυτής της άμμου δεν θα πρέπει να έχει ρυπανθεί βαριά με βιομηχανικά ή άλλου είδους απόβλητα. Για παράδειγμα η ποσότητα της άμμου που θα συλλεχθεί δεν θα πρέπει να βρίσκεται πλησίον κάποιου εμπορικού λιμένα ή δίπλα σε κανάλια απόρριψης βιομηχανικών/δημοτικών αποβλήτων. Έτσι η άμμος συλλέχθηκε από την περιοχή του Αγ. Ονούφριου, προς τα τέλη του Απρίλη.

Αμέσως μετά τη μεταφορά της στο χώρο των εργαστηρίων, η άμμος κοσκινίζεται χειροκίνητα περνώντας από κόσκινο του οποίου οι οπές έχουν διάμετρο 2mm. Η διαδικασία αυτή έγινε για την απομάκρυνση τυχόν μεγαλύτερων σωματιδίων αλλά και για τον καθαρισμό της από μικροσωματίδια σκουπιδιών και φυκιών. Η άμμος εν



τέλει τοποθετείται σε pyrex μεγέθους 20cm × 20cm × 6cm και 1 kgf περίπου σε ποσότητα.

Για την ρύπανση της άμμου χρησιμοποιήθηκαν 5gr Crude Oil ανά 1 kgf άμμου ( $5 \times 10^3$  ppm). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε ένα rewet, με θαλασσινό νερό, της τάξεως των 15%.

### 3.4 Δομή του Πειράματος

Η διαδικασία αποτελείται από μια πειραματική διάταξη ταψιών ( Pyrex ) και από ένα συγκεκριμένο σύνολο μικροβιολογικών και χημικών αναλύσεων που εκτελούνται στα μεμονωμένα δείγματα των προϊόντων που δοκιμάζονται. Τα ακόλουθα ταψιά για κάθε δοκιμή προετοιμάζονται και τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο την ημέρα 0 για να απεικονίσουν το ακόλουθο πειραματικό σχέδιο:

|         | Δευτέρα | Τρίτη | Τετάρτη | Πέμπτη | Παρασκευή | Σάββατο | Κυριακή |
|---------|---------|-------|---------|--------|-----------|---------|---------|
| Μάιος   | 25      | 26    | 27      | 28     | 29        | 30      | 1       |
|         | 2       | 3     | 4       | 5      | 6         | 7       | 8       |
|         | 9       | 10    | 11      | 12     | 13        | 14      | 15      |
|         | 16      | 17    | 18      | 19     | 20        | 21      | 22      |
|         | 23      | 24    | 25      | 26     | 27        | 28      | 29      |
| Ιούνιος | 30      | 31    | 1       | 2      | 3         | 4       | 5       |
|         | 6       | 7     | 8       | 9      | 10        | 11      | 12      |
|         | 13      | 14    | 15      | 16     | 17        | 18      | 19      |
|         | 20      | 21    | 22      | 23     | 24        | 25      | 26      |
| Ιούλιος | 27      | 28    | 29      | 30     | 1         | 2       | 3       |
|         | 4       | 5     | 6       | 7      | 8         | 9       | 10      |
|         | 11      | 12    | 13      | 14     | 15        | 16      | 17      |
|         | 18      | 19    | 20      | 21     | 22        | 23      | 24      |
|         | 25      | 26    | 27      | 28     | 29        | 30      | 31      |
|         |         |       |         |        |           |         |         |

Πίνακας: Πρόγραμμα πειράματος

|    |                                |
|----|--------------------------------|
| 0  | chemical, microbiological, DNA |
| 7  | chemical, microbiological, DNA |
| 15 | chemical, microbiological, DNA |
| 21 | microbiological, DNA           |
| 30 | chemical, microbiological, DNA |
| 38 | microbiological, DNA           |
| 45 | chemical, microbiological, DNA |

### 3.4.1 Μικροβιολογική Ανάλυση

Για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των υπό μελέτη μικροβιακών καλλιεργειών, εκτελούνται μικροβιακές απαριθμήσεις των ετερότροφων θαλάσσιων μικροοργανισμών (CFUs) και των βιοαποδομητών υδρογονανθράκων σε κάθε γεγονός δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας έναν microtiter MPN προσδιορισμό. Αυτός χρησιμοποιείται ως δείκτης της σχετικής αλλαγής στη βιομάζα. Αυτή η δοκιμή στηρίζεται στη χρήση της απόκρισης ανάπτυξης ως ένδειξη ενισχυμένης δραστηριότητας σε σύγκριση με έναν έλεγχο (μάρτυρα) "καμίας προσθήκης".

|                                                        |            | DAYS |   |    |    | microbiological analyses |    |    |   |
|--------------------------------------------------------|------------|------|---|----|----|--------------------------|----|----|---|
|                                                        | treatments | 0    | 7 | 15 | 21 | 30                       | 38 | 45 |   |
| CONTROL                                                | 1          | 1    | 2 | 2  | 2  | 2                        | 2  | 2  | 2 |
| KNO <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (NPK) | 1          | 2    | 2 | 2  | 2  | 2                        | 2  | 2  | 2 |
| ULR                                                    | 1          | 2    | 2 | 2  | 2  | 2                        | 2  | 2  | 2 |

Πίνακας: Μικροβιακές αναλύσεις

### 3.4.2 Αντιδραστήρια και Θρεπτικά Καλλιέργειας

#### Προετοιμασία Θρεπτικού Μέσου

Τα θρεπτικά για τις μικροβιακές απαριθμήσεις προετοιμάζονται προσεκτικά σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αποστειρώνονται ακολουθώντας συγκεκριμένες μεθόδους.

#### Προετοιμασία Τριβλίων με marine agar

Ζυγίζουμε 11,2 g marine άγαρ και τα βάζουμε σε μια ογκομετρική φιάλη των 250 ml και προσθέτουμε 200ml απιονισμένο νερό.

Αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί το άγαρ και στη συνέχεια το τοποθετούμε στον αποστειρωτικό κλίβανο.

Αφού το βγάλουμε από τον αποστειρωτικό κλίβανο, το αφήνουμε να κρυώσει λίγο και μέσα στον απαγωγό ρίχνουμε στα τριβλία τα οποία τοποθετούμε στη συνέχεια στο ψυγείο.

#### Προετοιμασία Bushnell-Haas (B-H) Θρεπτικού.

1. Ζυγίζονται τα ακόλουθα συστατικά που πρόκειται να διαλυθούν σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού.

*Φωσφορικό Κάλιο, μονοβασικό KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -- 1 g*

*Φωσφορικό Κάλιο, διβασικό K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -- 1 g*

*Νιτρική Αμμώνια NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> -- 1 g*

*Θεικό Μαγνήσιο, Επταένδρο MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0.2 g*

*Χλωριούχο Ασβέστιο CaCl<sub>2</sub> – 0.02 g Τριχλωριούχος Σίδηρος FeCl<sub>3</sub> -- 0.05 g*

*Χλωριούχο Νάτριο NaCl – 35 g*

2. Φτιάχνονται διαλύματα των 100 ml ξεχωριστά για το κάθε συστατικό εκτός από το χλωριούχο νάτριο (400 ml) τα οποία και αποστειρώνονται.
3. Έπειτα κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες αναμειγνύονται για να παράξουν το τελικό Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικό.
4. Ρυθμίζεται το pH στο 7 με αποστειρωμένο διάλυμα NaOH 0.1M.

- Αν διαθέτουμε έτοιμο εμπορικό θρεπτικό μέσο ζυγίζουμε 3,27g Bushnell-Hass medium και τα βάζουμε σε μια ογκομετρική φιάλη του 1 L προσθέτοντας 1 L απιονισμένο νερό. Αναδεύουμε και στη συνέχεια το τοποθετούμε στον αποστειρωτικό κλίβανο.

Αφού το βγάλουμε από τον αποστειρωτικό κλίβανο, το αφήνουμε να κρυώσει λίγο και το τοποθετούμε στο ψυγείο.

### Μικροβιακή Απαρίθμηση

Πρότυπες τεχνικές για την εκτέλεση των πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) μικροβιακών απαριθμήσεων περιγράφονται κατωτέρω.

#### 3.4.3 Αραιώσεις

Αναδεύουμε σε ογκομετρικές φιάλες 5g δείγματος ρυπασμένης άμμου και 50ml BH-Medium για 30 min. Στη συνέχεια αφαιρείται 1 ml ύδατος από κάθε φιάλη και προστίθεται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα αραιώσης που περιέχει 9 ml αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού (αραίωση 1:10) όπως περιγράφεται από τους Wrenn and Venosa [5]. Χρησιμοποιώντας τεχνική αποστείρωσης, αναμειγνύονται και εκτελούνται τμηματικές αραιώσεις (1 ml της προηγούμενης αραιώσης σε 9 ml αποστειρωμένου Bushnell-Haas (B-H) θρεπτικού) μέχρι την  $10^{-9}$  αραιώση.

#### 3.4.4 Εμβολιασμός των 96 microtiter well MPN plates (μικροβιακοί αποδομητές πετρελαίου)

1. Χρησιμοποιώντας τεχνική αποστείρωσης, 180 µl of B-H broth προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
2. 5 µl πετρελαίου προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι.
3. 20 µl δείγματος από κάθε διάλυση προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι στη σωστή σειρά ξεκινώντας από το πιο πυκνό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές για κάθε διάλυση. Οι δυο τελευταίες στήλες είναι έλεγχοι (μάρτυρες) (δεν προστίθεται καθόλου δείγμα).
4. Τα πλακίδια επωάζονται στους 20 °C.
5. Μετά από 14 μέρες επώασης, προστίθενται 50 µl p-iodotetrazolium violet dye (30 mg/10mL απιονισμένου νερού) αφού πρώτα αποστειρωθεί σε κάθε πηγαδάκι για να προσδιοριστεί η μικροβιακή ανάπτυξη.
6. Μετά από μία μέρα επώασης προσδιορίζεται η αλλαγή χρώματος στα πηγαδάκια. Η εμφάνιση κόκκινου ή ροζ χρώματος πιστοποιεί θετική ένδειξη.

7. Καταγράφεται ο αριθμός των θετικών πηγαδιών και σε τη διάλυση αυτά αντιστοιχούν.

8. Εισάγονται τα δεδομένα σε πρόγραμμα.

### 3.5 Χημική Ανάλυση της Σύστασης του Πετρελαίου

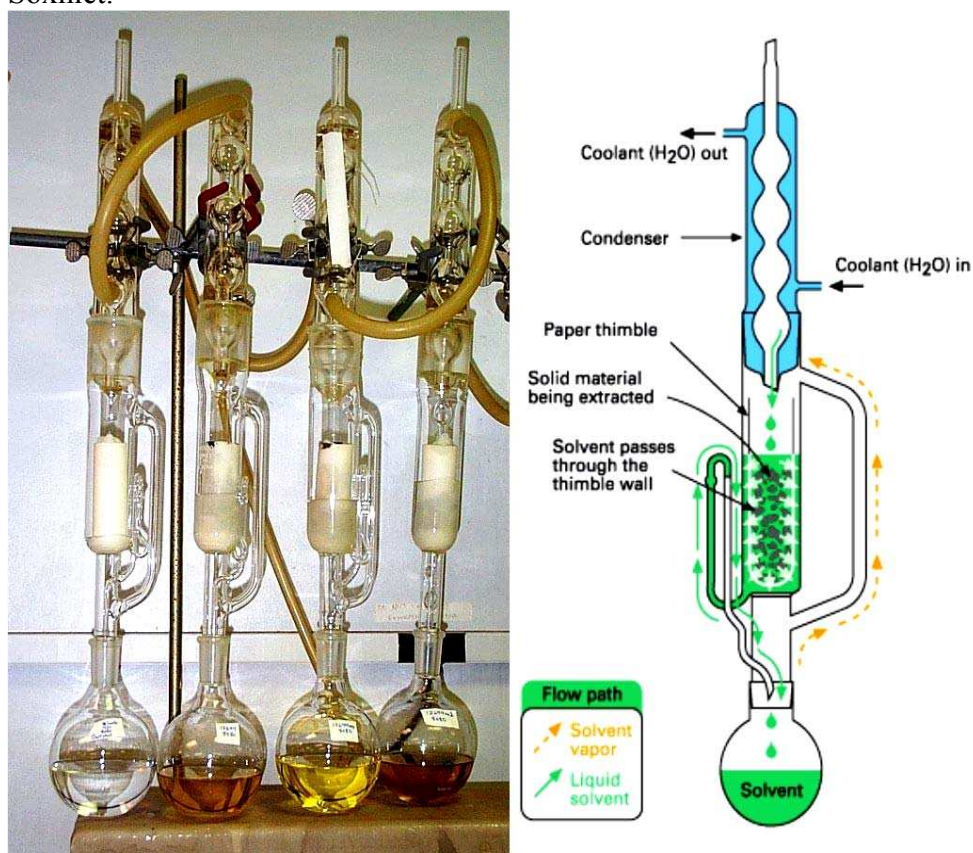
#### Προετοιμασία Δείγματος

##### 3.5.1 Εκχύλιση δειγμάτων με συσκευή Soxhlet.

Η εκχύλιση είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους διαχωρισμού. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση είναι η εκχύλιση διαλύματος ουσιών με ένα υγρό. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στο πετρέλαιο και σε δείγματα πετρωμάτων.

Η πλέον διαδεδομένη εργαστηριακή τεχνική είναι η εκχύλιση των δειγμάτων σε συσκευή Soxhlet (Εικόνα 4.2), χρησιμοποιώντας διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο.

Στον υποδοχέα του δείγματος τοποθετούμε υαλοβάμβακα και ζυγίζουμε. Έπειτα τοποθετούμε το δείγμα ρυπασμένης άμμου (10g ή 15g αφού πρώτα έχει ξηραθεί με αντίστοιχη ποσότητα  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και ξαναζυγίζουμε. Στη συνέχεια καλύπτουμε το δείγμα με υαλοβάμβακα, και τοποθετείται τον υποδοχέα μέσα στον εκχυλιστήρα Soxhlet.



Εικόνα 2: Συσκευή εκχύλισης Soxhlet

Στην συνέχεια τοποθετούνται περίπου 300ml DCM(από απόσταξη) στη σφαιρική φιάλη των 500ml. Στην ίδια φιάλη αφού έχει προζυγιστεί τοποθετούνται και 5-10 σφαιρίδια βρασμού ώστε να εξασφαλίζεται ομαλός βρασμός. Η φιάλη τοποθετείται στη θερμαντική συσκευή και προσαρμόζονται σε αυτή ο εκχυλιστήρας Soxhlet και ο ψυκτήρας. Στην συνέχεια αρχίζει η θέρμανση ενώ διοχετεύεται και νερό στον ψυκτήρα. Η διαδικασία της εκχύλισης διαρκεί 24h.

Με την ολοκλήρωση της, αφήνεται το εκχύλισμα να κρυώσει και κατόπιν μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) όπου εξατμίζεται ο διαλύτης. Συλλέγεται το απόσταγμα από τον συμπυκνωτή και στη συνέχεια μεταφέρεται για περίπου 24h στον ξηραντήρα, και έπειτα ζυγίζεται και μεταφέρεται σε φιαλίδια. Τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θερμαντική συσκευή και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Το φιαλίδιο ξαναζυγίζεται και προσδιορίζεται το βάρος των υδρογονανθράκων από τη διαφορά των δύο ζυγίσεων.

### 3.5.2 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) –Κλασματοποίηση Πετρελαίου

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

1. Αφού προσαρμόσουμε την διάταξη SPE κάνουμε ένα **preconditioning** της στήλης με 6 ml εξανίου
2. παίρνουμε το δείγμα και το βάζουμε μονομιάς με μια πιπέτα στην στήλη. Προσθέτουμε 4 ml εξανίου με μια πιπέτα σε κάθε στήλη για να πάρουμε το 1<sup>ο</sup> κλάσμα που είναι τα κορεσμένα (αλκάνια) FI.
3. Στη συνέχεια περνάμε από τη στήλη 4 ml DCM για να ανακτήσουμε το κλάσμα των αρωματικών υδρογονανθράκων (FII).
4. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μεταφέρουμε σε προζυγισμένα φιαλίδια τα 2 κλάσματα για ξήρανση σε ρεύμα αζώτου και τα τοποθετούμε για περίπου 24 ώρες στο ξηραντήρα. Την επόμενη ημέρα ζυγίζονται και πάλι.
5. Ξεπλύνουμε την συσκευή με τον τελευταίο διαλύτη που χρησιμοποιήσαμε.

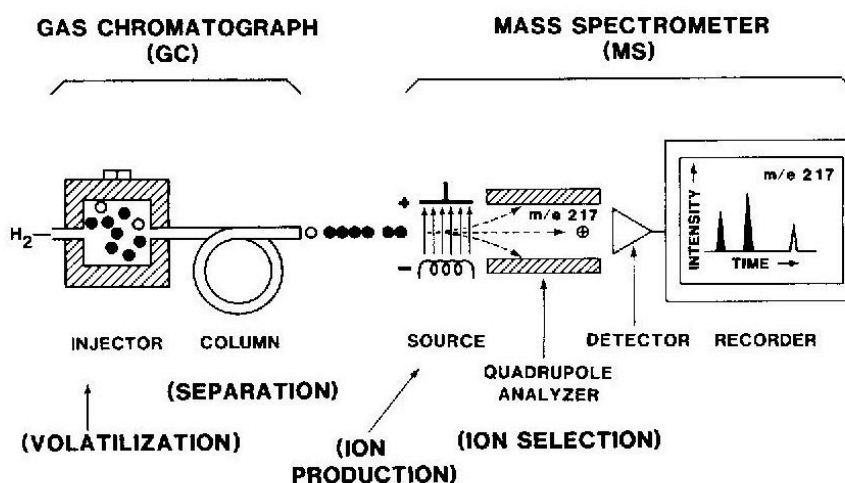




Εικόνα 3: Στήλες SPE

### 3.5.3 GC/MS Ανάλυση

Στο σύστημα ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας (Εικόνα 4), ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και ο φασματογράφος μάζας για την ανίχνευση, ταυτοποίηση αλλά και ποσοτικοποίησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται διασπώντας τις ενώσεις σε ηλεκτρικά φορτισμένα μέρη, ιόντα. Η πορεία διάσπασης κάθε μιας ένωσης εξαρτάται από την χημική της δομή και παρέχει ένα και μοναδικό αποτύπωμα (ίχνος) που είναι χαρακτηριστικό για αυτή.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος ανάλυσης, που περιλαμβάνει αέριο χρωματογράφο άμεσα συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας (GC-MS).[11]

## Διαδικασία Ανάλυσης στο GC/MS

Αμέσως πριν από την έγχυση, ένα εσωτερικό πρότυπο (internal standard) διάλυμα τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων προστίθεται στα εκχυλίσματα των δειγμάτων. Τα δείγματα ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου για τα αλειφατικά και τα αρωματικά κλάσματα των εκχυλισμάτων πετρελαίου προκειμένου να παρασχεθούν ικανοποιητικές πληροφορίες ότι το πετρέλαιο αποδομείται. Για να διασφαλιστεί ότι η παρατηρηθείσα πτώση στους αναλύτες στόχους προκαλείται από βιοαποικοδόμηση παρά από φυσική απώλεια από την κακομεταχείριση ή την ανεπαρκή εκχύλιση, είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθούν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στόχων μέσω εσωτερικών δεικτών "conserved internal marker". Εσωτερικοί δείκτες που έχουν βρεθεί χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση είναι C<sub>2</sub>- ή C<sub>3</sub>-φθενανθρένιο, C<sub>2</sub>-χρυσένιο και C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-χοπάνιο. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί το ο σχετικός συντελεστής απόκρισης (relative response factor - RRF) για τους αναλύτες στόχους. Για να υπολογιστούν οι "κανικοποιημένες συγκεντρώσεις," η συγκέντρωση του αναλύτη στόχου σε έναν δεδομένο χρόνο δειγματοληψίας διαιρείται απλά με την επιλεγμένη διατηρημένη συγκέντρωση αναλύτη στην ίδια χρονική στιγμή. Η GC/MS ανάλυση διεξάγεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία:

1. Ένα (1) ml από το διάλυμα εξανίου C<sub>6</sub> (από τη προετοιμασία δείγματος παραπάνω) τοποθετείται σε 1.5-mL φιαλίδιο για το πρώτο κλάσμα FI (αλκάνια).
2. Ένα (1) ml από το διάλυμα DCM τοποθετείται σε 1,5 ml φιαλίδιο για το δεύτερο κλάσμα FI (αρωματικοί υδρογονάνθρακες).
3. Σε αυτό το διάλυμα 5 μl από το διάλυμα 200 ppm των εσωτερικών προτύπων προστίθεται και το δείγμα είναι έτοιμο για ένεση στο GC. Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 1 ppm. Αυτό το διάλυμα περιέχει 4 δευτεριωμένα συστατικά: d8-naphthalene, d10-anthracene, d12-chrysene και d12- perylene.
4. Ένα τυφλό οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονται πριν από την ανάλυση των αγνώστων αναλυτών. Τα εσωτερικά πρότυπα συνδυάζονται με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων και εκχύνονται μαζί σε κάθε ανάλυση για να ελεγχθεί η απόδοση του οργάνου κατά τη διάρκεια κάθε σειράς αναλύσεων.
5. Οι απαραίτητες πληροφορίες (όνομα, ποσότητα, συνθήκες, κ.λ.π.) σε σχέση με το δείγμα που εισάγεται κάθε φορά προς ανάλυση περιγράφονται στο acquisition form του προγράμματος του αέριου χρωματογράφου
6. Το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 1 ppm αντί 40 ppm. Έτσι αποκτάται μια καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων για κάθε συστατικό όπως φαίνεται στον πίνακα 4.5 πριν την ανάλυση των δειγμάτων στα 1ppb έως, 20 ppm. Η βαθμονόμηση των 5 σημείων πρέπει να διεξαχθεί σε πρότυπο μείγμα συστατικών για να προσδιοριστούν τα RRFs για κάθε αναλύτη. Το πρότυπο μείγμα (εκτός του βιοδείκτη) για την καμπύλη βαθμονόμησης αποκτήθηκε από την Absolute Standards, Inc. Οι βιοδείκτες C<sub>30</sub>17β(H),21α(H)-hopane και C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopane που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την Chiron.
7. Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:



$RF = (Ax \times Cis) / (Cx \times Ais)$  όπου:

$RRF$  = Σχετικός συντελεστής απόκρισης

$Ax$  = Το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συστατικό που μετράται (αναλύτη)

$Ais$  = Το εμβαδόν της κορυφής του χαρακτηριστικού ιόντος για το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο

$Cx$  = Συγκέντρωση του συστατικού που μετράται (ng/μl)

$Cis$  = Συγκέντρωση του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου (1 ng/μl). (Αυτή η συγκέντρωση είναι σταθερή στην εξίσωση για την καμπύλη βαθμονόμησης.)

Αναγνωρίζεται κάθε αναλύτης βασιζόμενοι στη integrated abundance από το πρωτεύον χαρακτηριστικό ιόν.

Ποσοτικοποιείται ο κάθε αναλύτης χρησιμοποιώντας την τεχνική εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αυτό που έχει χρόνο έκλουσης κοντά στον δοσμένο αναλύτη [4].

**Πίνακας 3.1: Ταξινόμηση Αναλυτών σύμφωνα με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης**

|                       |                             |                             |                           |                                                   |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|
| Εσωτερικό             | D <sub>8</sub> -naphthalene | d <sub>10</sub> -anthracene | d <sub>12</sub> -chrysene | d <sub>12</sub> -perylene                         |
| Αλκάνια               | nC10-nC15                   | nC16-nC23                   | nC24-nC29                 | nC30-nC35                                         |
|                       |                             | Pristane                    |                           | C3017 <sub>β</sub> (H),21 <sub>α</sub> (H)-hopane |
|                       |                             | Phytane                     |                           |                                                   |
|                       |                             | 5 $\alpha$ -androstane      |                           |                                                   |
| Αρωματικές<br>Ενώσεις | Naphthalene                 | Dibenzothiophene            | Fluoranthene              | Benzo(b)fluoranthene                              |
|                       |                             | Fluorene                    | Pyrene                    | Benzo(k)fluoranthene                              |
|                       |                             | Anthracene                  | Chrysene                  | Benzo(e)pyrene                                    |
|                       |                             | Phenanthrene                |                           | Benzo(a)pyrene                                    |
|                       |                             |                             |                           | Perylene                                          |
|                       |                             |                             |                           | Indeno(g,h,i)pyrene                               |
|                       |                             |                             |                           | Dibenzo(a,h)anthracene                            |
|                       |                             |                             |                           | Benzo(1,2,3-cd)perylene                           |

**Πίνακας 3.2: Προτερόντα ιόντα για τον κάθε αναλύτη στόχο κατά την ανάλυση στο GC/MS**

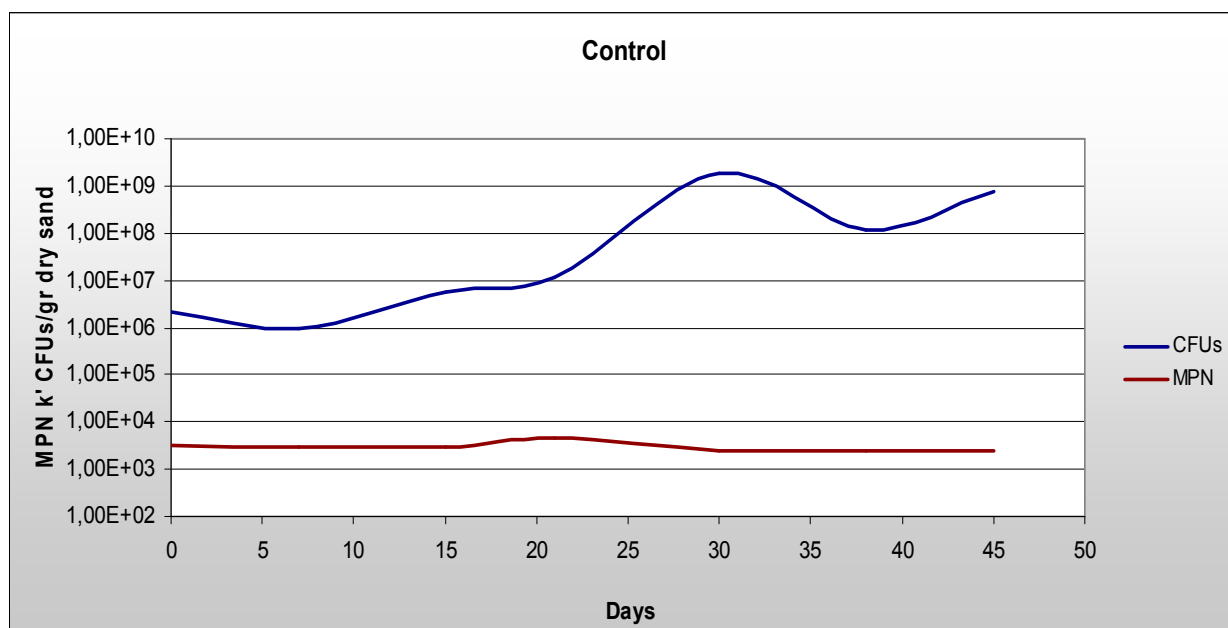
| <b>Συστατικό</b>                              | <b>Ιόν</b> |
|-----------------------------------------------|------------|
| n-alkanes (C <sub>10</sub> -C <sub>35</sub> ) | 85         |
| Pristane                                      | 85         |
| Phytane                                       |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

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Επεξεργασία μετρήσεων – Παρουσίαση αποτελεσμάτων

#### 4.1 Μικροβιακές αναλύσεις

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

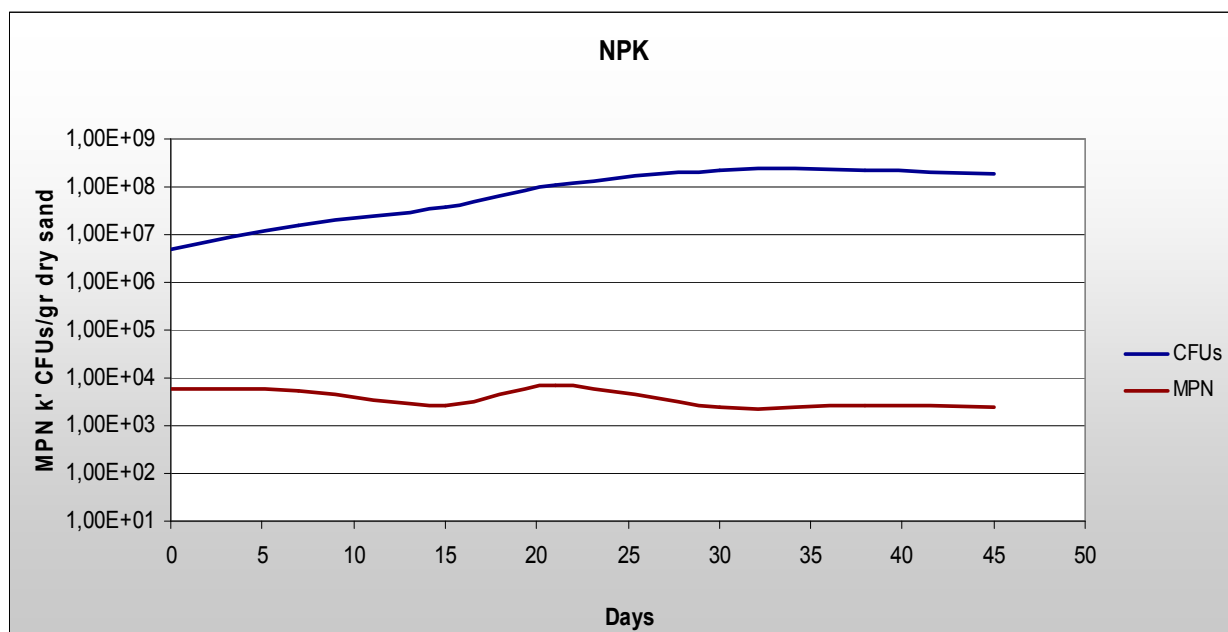


Γράφημα 1: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με τον χρόνο – για το Control

Το συγκεκριμένο δείγμα περιέχει τη ρυπασμένη άμμο με τους ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμούς χωρίς όμως την προσθήκη θρεπτικών ουσιών. Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι επιτυγχάνεται μικροβιακή ανάπτυξη χωρίς όμως να αναπτύσσονται μεταξύ των άλλων και βιοαποδομητές του πετρελαίου.

Η μικρή πτώση στα CFUs που παρατηρείται στην αρχή είναι απόλυτα φυσιολογική, αφού οι μικροοργανισμοί χρειάζονται ένα μικρό διάστημα προσαρμογής. Στη συνέχεια πολ/σιάζονται κανονικά, ενώ μειώνεται δύο φορές ο ρυθμός ανάπτυξής τους (στις 22 και στις 40 ημέρες) πράγμα που οφείλεται στα χαμηλά ποσοστά υγρασίας στα δείγματά μας.

Από τη MPN μέθοδο παρατηρούμε μία μικρή ανάπτυξη και σχεδόν καμία αλλαγή κάτι το αναμενόμενο αφού όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο είναι, πρώτον μία μέθοδος στατιστική, εμπεριέχει δηλαδή ποσοστά λάθους και δεύτερον και σημαντικότερο, καταγράφει μόνον τους αποδομητές των υδρογονανθράκων και όχι το σύνολο των μικροοργανισμών.

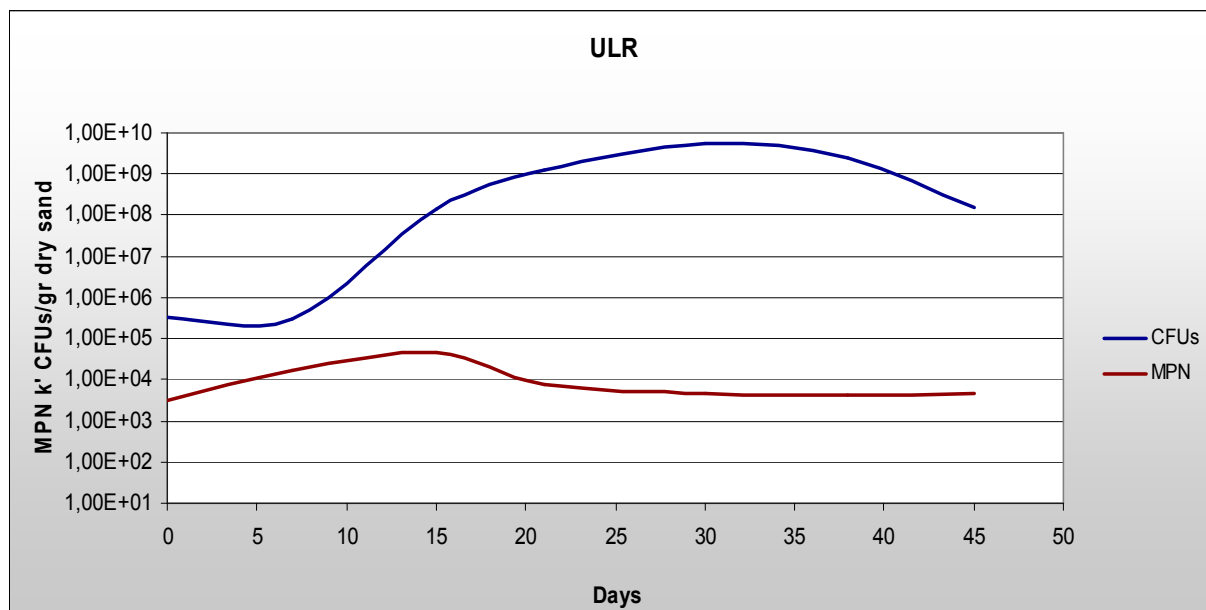


Γράφημα 2: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το NPK

Στο παρόν δείγμα, NPK ( στο οποίο έχει γίνει προσθήκη φωσφόρου, αζώτου και καλίου) παρατηρούμε από την καμπύλη των CFUs μία πιο άμεση απόκριση των μικροοργανισμών χωρίς να υπάρχει ελάττωση του πληθυσμού τους ή περίοδος προσαρμογής και αυτό οφείλεται καθαρά στην ύπαρξη των θρεπτικών.

Δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο βέβαια και για την καμπύλη των MPN αφού δείχνει μία μικρή ελάττωση των μικροοργανισμών στο διάστημα μεταξύ των 6 – 15 ημερών που μάλλον οφείλεται στη μείωση της υγρασίας στο δείγμα μας. Στη συνέχεια, αν και τα ποσοστά της υγρασίας επανήλθαν στα φυσιολογικά τους όρια δεν παρατηρούμε καμία ιδιαίτερη ανάπτυξη των βιοαποδομητών μικροοργανισμών. Οπότε καταλήγουμε και πάλι στο συμπέρασμα πως μία στατιστική μέθοδος δεν είναι και τόσο αξιόπιστη.

Υπάρχει δε και η πιθανότητα τα ποσοστά των μικροοργανισμών, με την MPN μέθοδο, να παραμένουν σταθερά, μετά το πέρας των 30 ημερών, διότι μέχρι εκείνο το διάστημα έχει αποδομηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό του πετρελαίου.

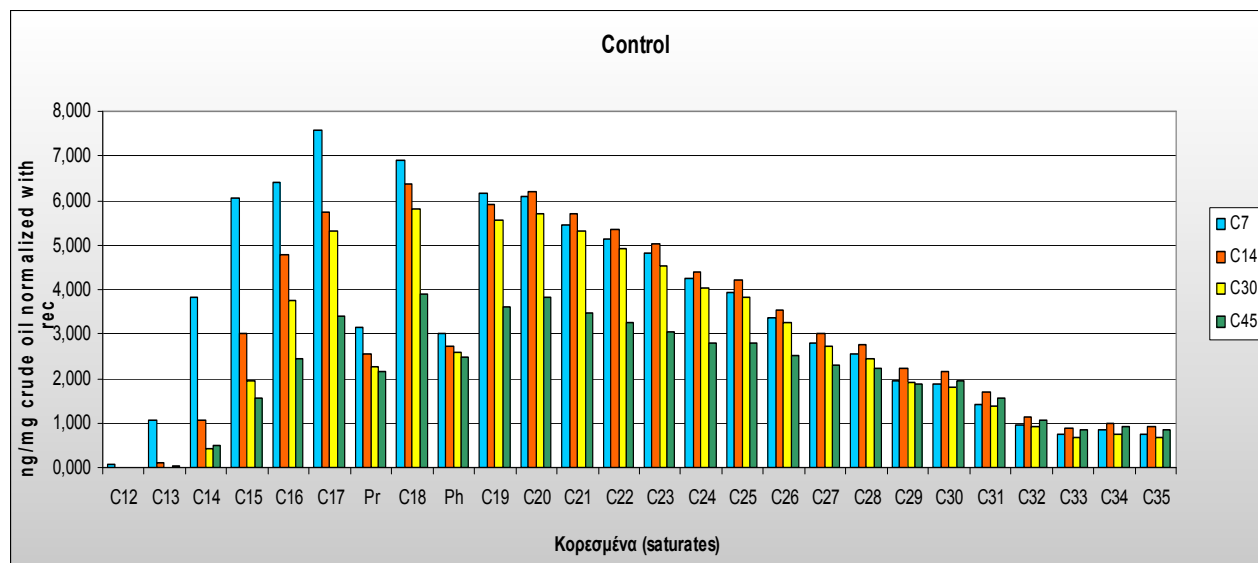


Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό γράφημα CFU & MPN/gr ξηρής άμμου με το χρόνο – για το ULR

Στο δείγμα του ULR ( όπου έχει γίνει προσθήκη ουρικού οξέος, λεκιθίνης και ραμνολιπιδίων) παρατηρείται η πιο φυσιολογική ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε σχέση με τα προηγούμενα δείγματα, αφού και οι δύο καμπύλες παρουσιάζουν το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης τις ίδιες ημέρες, ενώ μετά την πάροδο των 15 ημερών, όπου έχει αποδομηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό των υδρογονανθράκων η καμπύλη των MPN σταθεροποιείται ενώ των CFUs παρουσιάζει την αναμενόμενη συμπεριφορά.

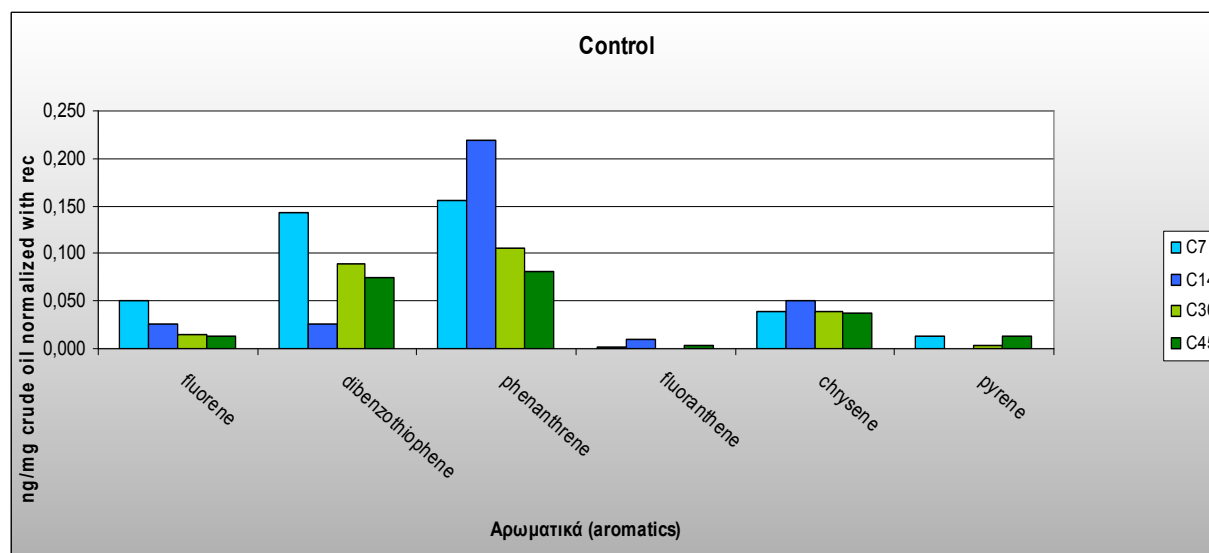
#### 4.2 Χημικές Αναλύσεις

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



Γράφημα 4: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το δείγμα ελέγχου (Control) με το χρόνο (μέρες).

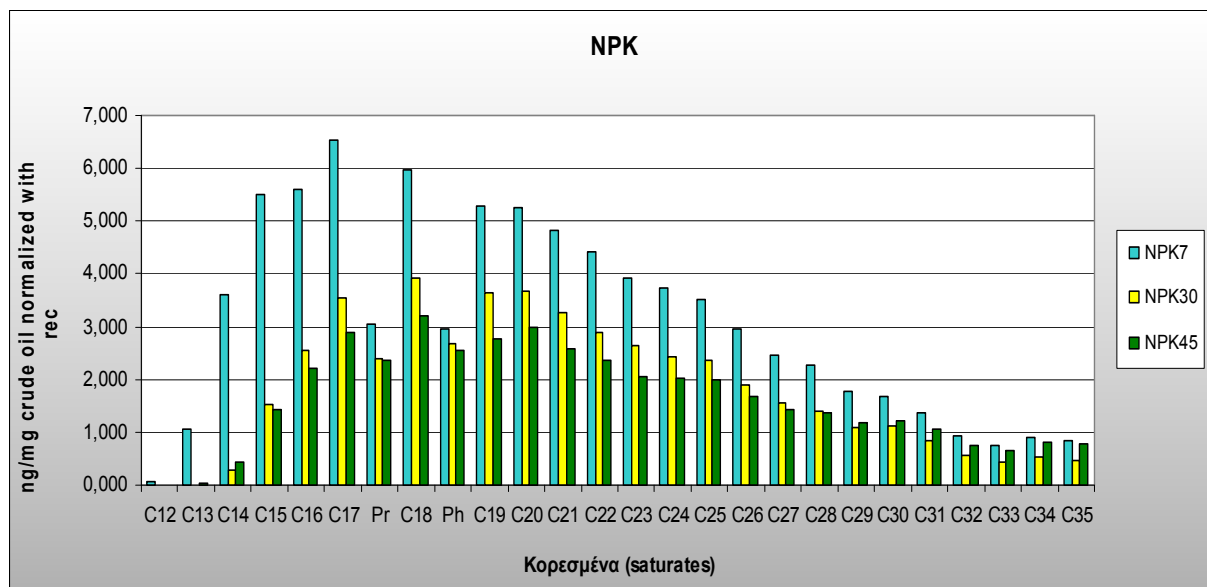
Στο παραπάνω γράφημα, γίνεται επαλήθευση των ενδείξεων που υπήρχαν από τα γραφήματα των MPN, CFU, για το δείγμα αυτό. Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου (η μεγαλύτερη ποσότητα του), από το γράφημα λαμβάνει χώρα μετά τις 30 μέρες, με τις ποσότητες όλων των κορεσμένων (εκτός από το πρυστάνιο και το φυτάνιο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



Γράφημα 5: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το δείγμα ελέγχου (Control) με τον χρόνο.

Η πορεία της ποσότητας των αρωματικών, με την πάροδο του χρόνου, είναι η αναμενόμενη και αποτυπώνεται στο παραπάνω γράφημα. Κρίνοντας κυρίως από τα λιγότερο ελαφριά, (π.χ. fluorene, fluoranthene), στην ποσότητα τους επέρχεται σημαντική μείωση, φθάνοντας σε πολύ μικρές τιμές (κοντά στο μηδέν ή κάτω από το

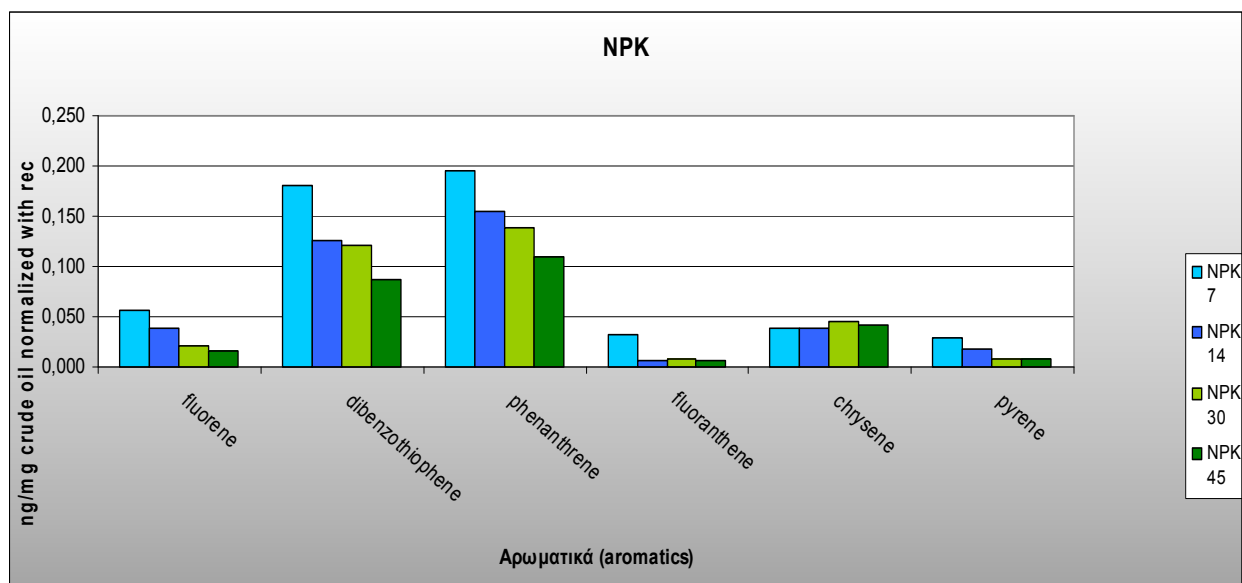
όριο ανίχνευσης). Σε κάποια συστατικά, παρατηρείται η ποσότητα των 30 ή 45 ημερών να βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο(σχεδόν) με τις τιμές των 0 ή 15 ημερών, κυρίως στα βαριά συστατικά. Παρόλα αυτά, οι ποσότητες αυτές είναι τόσο μικρές που δε θεωρούνται πλήρως αξιόπιστες.



Γράφημα 6: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το NPK με τον χρόνο (μέρες).

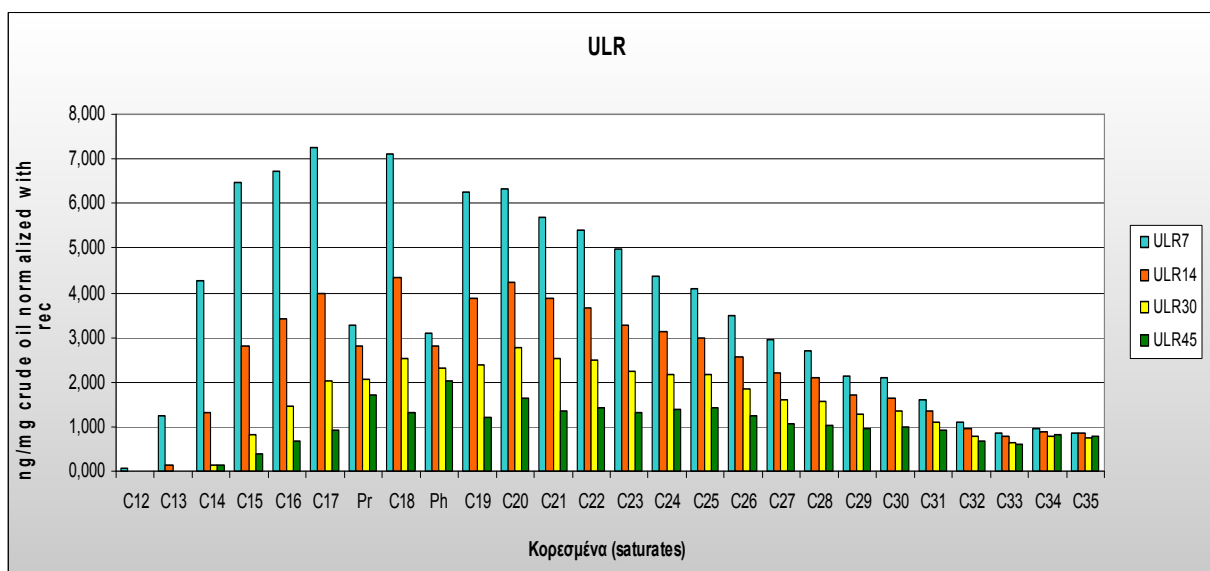
Εξετάζοντας το γράφημα αυτό, για το δείγμα NPK, παρατηρούμε πως η βιοαποδόμηση των κορεσμένων λαμβάνει χώρα στο διάστημα των 7 πρώτων ημερών καθώς ήδη οι ποσότητες των συστατικών των 14 ημερών είναι πολύ χαμηλές και αφαιρέθηκαν από το γράφημα σκοπίμως. Πράγμα που όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στο συγκεντρωτικό διάγραμμα των CFUs-MPN/Days οφείλεται στην μείωση των ποσοστών της υγρασίας. Στη συνέχεια, στις μετρήσεις των 30 και των 45 ημερών η αποδόμηση συνεχίζεται με χαμηλότερους ρυθμούς αφού το μεγαλύτερο μέρος των υδρογονανθράκων έχει αποδομηθεί.





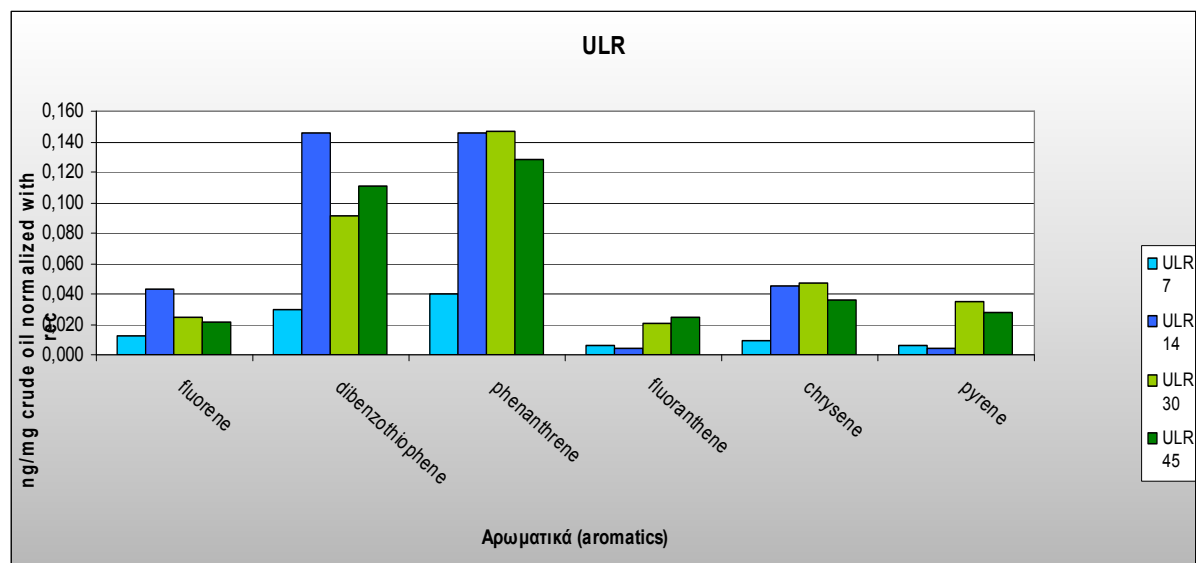
Γράφημα 7: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το NPK με τον χρόνο (μέρες).

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



Γράφημα 8: Συσχέτιση συγκέντρωσης των κορεσμένων για το ULR με τον χρόνο (μέρες).

Εξετάζοντας το παραπάνω γράφημα, είναι κατανοητό πως η βιοαποδόμηση συμβαίνει στο χρονικό διάστημα 7 – 14 ημερών. Οι ποσότητες που αντιστοιχούν στην 14η μέρα είναι ήδη πολύ χαμηλές, με τις αντίστοιχες των 45 ημερών να πλησιάζουν το 0.

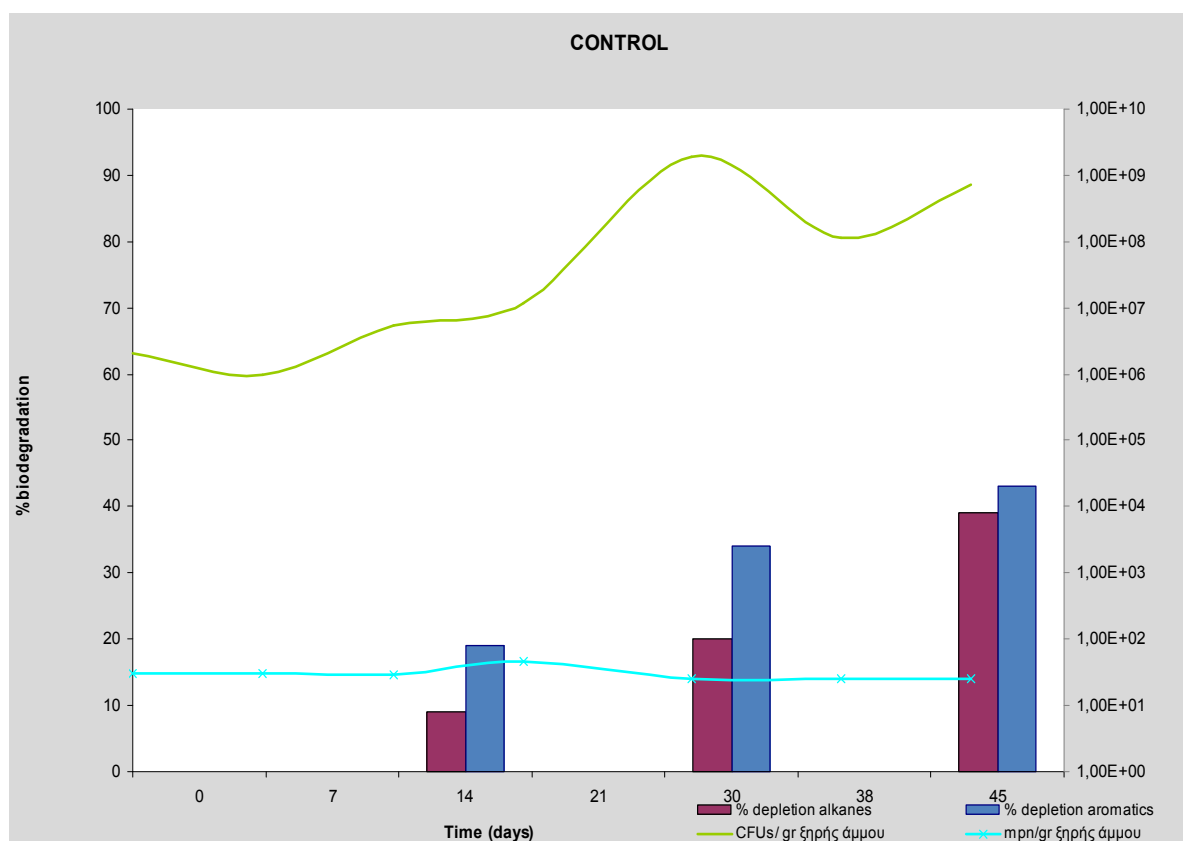


Γράφημα 9: Συσχέτιση συγκέντρωσης των αρωματικών για το ULR με τον χρόνο (μέρες).

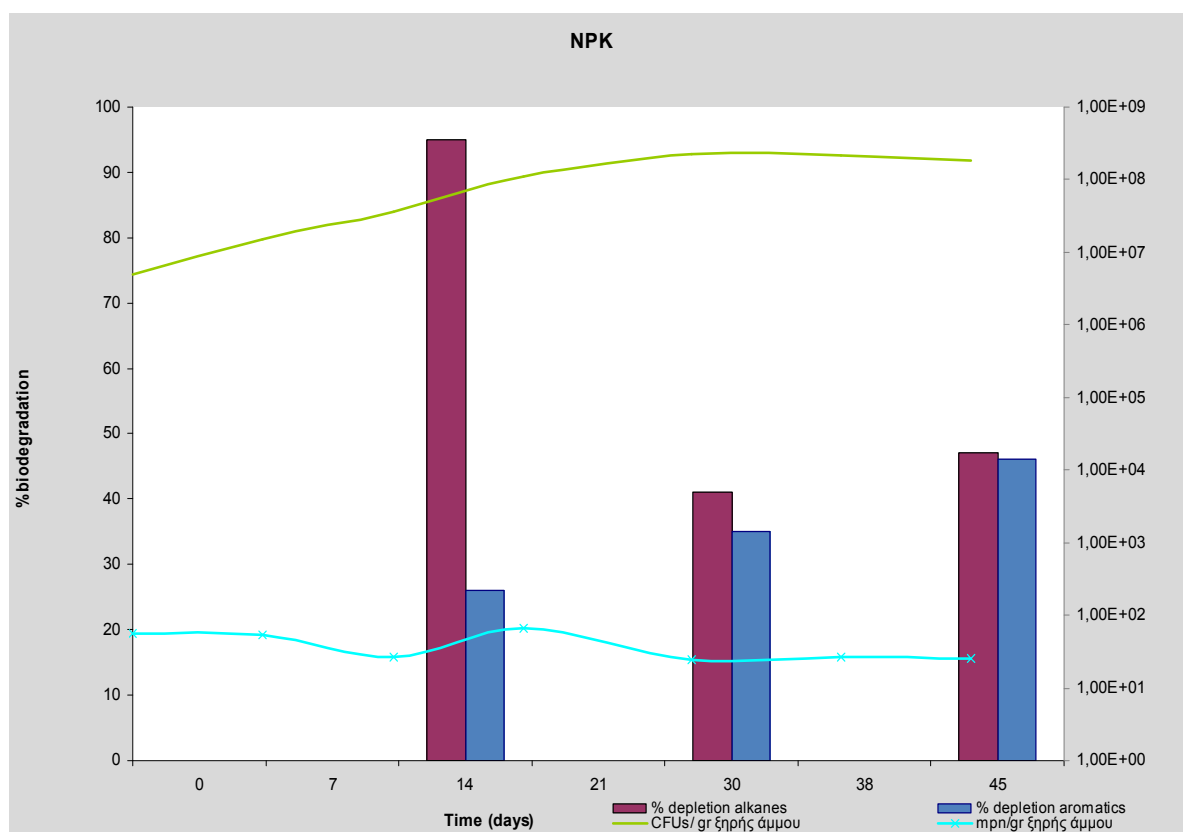
Η πορεία της ποσότητας των αρωματικών, στα λιγότερο ελαφριά, (π.χ. fluorene, dibenzothiophene, εκτός του fluoranthene) με την πάροδο του χρόνου, είναι η αναμενόμενη. Ορισμένες τιμές δεν είναι οι αναμενόμενες, καθώς εμφανίζονται των 30 ημερών να είναι μεγαλύτερες των 7 ή 14. Οι τιμές αυτές δε θεωρούνται αξιόπιστες και μπορεί να προήλθαν από πειραματικό σφάλμα.

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

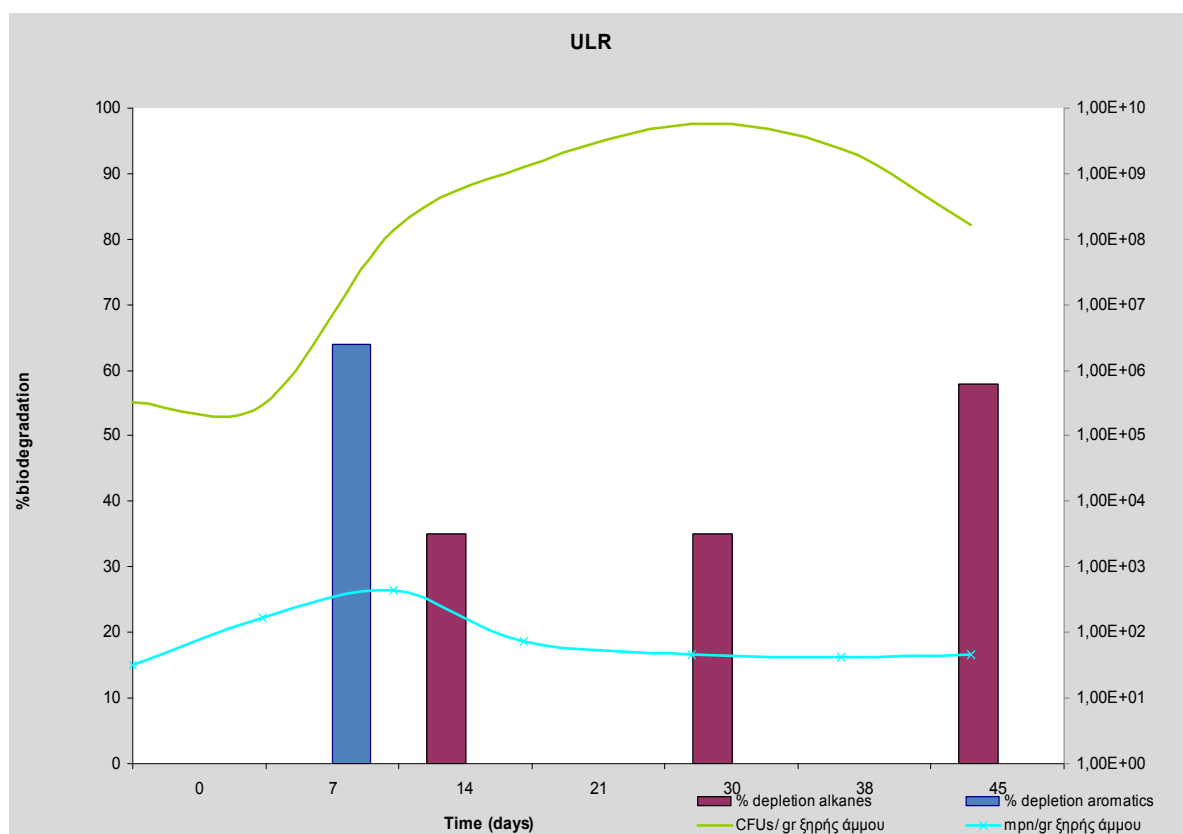
Ακολούθως, παρατίθενται τα γραφήματα που συγκεντρώνουν όλες τις μετρήσεις - αναλύσεις, ώστε να είναι εύκολη η συνολική διάκριση του βαθμού απομάκρυνσης του πετρελαίου, σε άμεση συσχέτιση με την μικροβιακή ανάπτυξη και τον χρόνο.



Γράφημα 10: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το Control



Γράφημα 11: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το NPK



Γράφημα 12: Συγκεντρωτικό διάγραμμα για το ULR

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρώντας τα συγκεντρωτικά διαγράμματα για τα τρία δείγματα τα οποία εξετάζουμε προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα όσον αφορά το βαθμό αποδόμησης των συστατικών του πετρελαίου σε σχέση με τα διαφορετικά θρεπτικά και την αποδόμησή τους σε σχέση με το χρόνο.

Εξετάζοντας το δείγμα Control, όπου δεν έχει γίνει προσθήκη θρεπτικών, παρατηρούμε πως με την πάροδο του χρόνου, σταδιακά, επέρχεται η επιθυμητή αποδόμηση. Βέβαια αυτό συμβαίνει μετά το πέρας των 40 ημερών και η αποδόμηση είτε των αρωματικών, είτε των κορεσμένων υδρογονανθράκων δεν ξεπερνά το 50%.

Στο δεύτερο δείγμα μας τώρα, παρατηρούμε μία πιο άμεση απόκριση των μικροοργανισμών και των αποδομητών, πράγμα που σαφώς οφείλεται στην ύπαρξη των αζώτου, φωσφόρου και καλίου. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος της αποδόμησης, το οποίο αγγίζει στα κορεσμένα το 96% και στα αρωματικά το 40%, λαμβάνει χώρα στο διάστημα μεταξύ των 14-30 ημερών.

Τέλος στο τρίτο δείγμα μας, στο ULR , η απόκριση των μικροοργανισμών στα θρεπτικά του ουρικού οξέος, της λεκιθίνης και των ραμνολιπιδίων βλέπουμε πως είναι εξίσου άμεση με το δεύτερο δείγμα μας. Παρατηρούμε όμως πως το μεγαλύτερο ποσοστό της αποδόμησης λαμβάνει χώρα μεταξύ των 7-14 ημερών.

Συγκρίνοντας λοιπόν, αυτά τα δείγματα, διαπιστώνουμε πως και τα δύο θρεπτικά μέσα έχουν παρόμοια επίδραση στην ενίσχυση της δραστηριότητας των βιοαποδομητών μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, το NPK παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό απομάκρυνσης στις μέρες δειγματοληψιών 14, 30 και 45 πλησιάζοντας το 96% στις πρώτες 14 ημέρες. Ενώ το ULR, εμφανίζει μεγαλύτερο βαθμό αποδόμησης την 7η μέρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βιοαποδόμηση ξεκινά πιο νωρίς σε σχέση με το NPK.

Αφού εξετάσαμε και τα τρία δείγματα, δεδομένης της μορφολογίας της ακτής και του χαμηλού κυματισμού, αφού ο Αγ. Ονούφριος βρίσκεται σε μικρό, κλειστό κόλπο, συμπεραίνουμε πως το πιο αποτελεσματικό θρεπτικό μέσο για το δείγμα της άμμου που εξετάσαμε ήταν το NPK. Παρότι το ULR επιτυγχάνει ταχύτερα την αποδόμηση του πετρελαίου, το NPK επιδρά θετικά στους μικροοργανισμούς ενισχύοντας την ανάπτυξη τους, ναι μεν 7-8 ημέρες αργότερα, αλλά με πολύ μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης. Ο συνδυασμός του νιτρικού και του φωσφορικού καλίου ου χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου και φωσφόρου αντίστοιχα και αποτελούν το συγκεκριμένο θρεπτικό παρουσιάζουν τη δυνατότητα υψηλής απομάκρυνσης των υδρογονανθράκων σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει.

Μελλοντικά επομένως θα ήταν επιθυμητό να εξεταστεί ο συνδυασμός της προσθήκης των θρεπτικών μέσων NPK και ULR έτσι ώστε να επιτύχουμε τα υψηλά ποσοστά βιοαποδόμησης σε μικρότερα χρονικά όρια αφού γνωρίζουμε ότι η έγκαιρη αποκατάσταση της ακτής είναι υψίστης σημασίας.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Πίνακες Μετρήσεων Μικροβιακών Αναλύσεων

#### Control

| moisture percentage | MPN/gr ξηρής άμμου | days | CFU / gr ξηρής άμμου |
|---------------------|--------------------|------|----------------------|
| 76,72%              | 3,08E+01           | 0    | 2,06E+06             |
| 77,23%              | 2,99E+01           | 7    | 9,61E+05             |
| 77,51%              | 2,96E+01           | 14   | 5,49E+06             |
| 77,84%              | 4,56E+01           | 21   | 1,19E+07             |
| 87,79%              | 2,52E+01           | 30   | 1,92E+09             |
| 91,47%              | 2,57E+01           | 38   | 1,13E+08             |
| 90,65%              | 2,49E+01           | 45   | 7,28E+08             |

#### NPK

| moisture percentage | MPN/gr ξηρής άμμου | days | CFU / gr ξηρής άμμου |
|---------------------|--------------------|------|----------------------|
| 76,23%              | 5,68E+01           | 0    | 4,99E+06             |
| 79,36%              | 5,32E+01           | 7    | 1,49E+07             |
| 90,47%              | 2,63E+01           | 14   | 3,68E+07             |
| 93,45%              | 6,73E+01           | 21   | 1,13E+08             |
| 89,63%              | 2,44E+01           | 30   | 2,24E+08             |
| 91,24%              | 2,61E+01           | 38   | 2,18E+08             |
| 89,66%              | 2,52E+01           | 45   | 1,79E+08             |

#### ULR

| moisture percentage | MPN/gr ξηρής άμμου | days | CFU / gr ξηρής άμμου |
|---------------------|--------------------|------|----------------------|
| 76,60%              | 3,12E+01           | 0    | 3,25E+05             |
| 82,65%              | 1,66E+02           | 7    | 2,90E+05             |
| 92,54%              | 4,38E+02           | 14   | 1,37E+08             |
| 93,99%              | 7,38E+01           | 21   | 1,26E+09             |
| 91,17%              | 4,70E+01           | 30   | 5,77E+09             |
| 92,61%              | 4,12E+01           | 38   | 2,41E+09             |
| 90,77%              | 4,61E+01           | 45   | 1,62E+08             |

### Πίνακας SPE μετρήσεων

| Sample | Date            | Woil | Wvial<br>F1 | Wvial<br>F1+S | Wvial<br>F2 | Wvial<br>F2+S | Walkanes | Waromatics |
|--------|-----------------|------|-------------|---------------|-------------|---------------|----------|------------|
|        |                 | mg   | gr          | gr            | gr          | gr            | gr       | gr         |
| CC7    | 14/7/2011       | 7,9  | 2,3671      | 2,3712        | 2,3724      | 2,3731        | 0,0041   | 0,0007     |
| CC15   | 15 Ιουλ<br>2011 | 5,2  | 2,3731      | 2,3766        | 2,3936      | 2,3944        | 0,0035   | 0,0008     |
| CC30   | 18/7/2011       | 5,6  | 2,3873      | 2,3902        | 2,3952      | 2,3958        | 0,0029   | 0,0006     |
| CC45   | 18/7/2011       | 8,7  | 2,3876      | 2,3924        | 2,4249      | 2,4259        | 0,0048   | 0,001      |
| NPK7   | 14/7/2011       | 8,9  | 2,3777      | 2,3824        | 2,3917      | 2,3921        | 0,0047   | 0,0004     |
| NPK15  | 15 Ιουλ<br>2011 | 9,1  | 2,4286      | 2,4333        | 2,4262      | 2,4279        | 0,0047   | 0,0017     |
| NPK30  | 18/7/2011       | 4,8  | 2,3978      | 2,4007        | 2,384       | 2,3846        | 0,0029   | 0,0006     |
| NPK45  | 18/7/2011       | 9,2  | 2,4117      | 2,4174        | 2,4289      | 2,4302        | 0,0057   | 0,0013     |
| ULR7   | 15 Ιουλ<br>2011 | 10   | 2,3881      | 2,3921        | 2,4026      | 2,4034        | 0,004    | 0,0008     |
| ULR15  | 15 Ιουλ<br>2011 | 5,4  | 2,3861      | 2,3889        | 2,3793      | 2,3801        | 0,0028   | 0,0008     |
| ULR30  | 18/7/2011       | 7,4  | 2,4304      | 2,4338        | 2,4239      | 2,4243        | 0,0034   | 0,0004     |
| ULR45  | 18/7/2011       | 6    | 2,3861      | 2,3891        | 2,3923      | 2,3928        | 0,003    | 0,0005     |



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Διεύθυνση Προστασίας Θαλασσίου Περιβάλλοντος του Υπουργείου Εμπορικής Ναυτιλίας, Αιγαίου και Νησιωτικής πολιτικής, εγχειρίδιο "ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΑΣ"
- [2]. ITOPE, (2005), Technical Information Paper: "THE USE OF CHEMICAL DISPERSANTS TO TREAT OIL SPILLS"
- [3]. "Κυριότερες μέθοδοι απορρύπανσης", Χριστούλας, Καββαδάς, Αντωνόπουλος
- [4]. EPA (2003 edition). "Swirling flask dispersant effectiveness test, revised standard dispersant toxicity test and bioremediation agent effectiveness test" 40 CFR Part 300 Appendix C.
- [5]. Wrenn A, Venosa AD. (1996). "Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure" Can. J. Microbiol. 42, 252-258.
- [6]. [www.epa.gov](http://www.epa.gov)
- [7]. Wikipedia(web encyclopedia)/Biostimulation
- [8]. The composition and properties of soil In.: Williams I. Environmental Chemistry. Wiley and Sons Chichester 2001:130 -135
- [9]. Brady NC. The Nature and Properties of soils. McMillan Publishing Co. Inc, New York
- [10]. Gabriel. P.F. "Innovative technologies for contaminated soil remediation: focus on bioremediation" In. Bioremediation: The state of practise in hazardous waste remediation operations: AWMA/HWAC
- [11]. Douglas W. Waples, Geochemistry in Petroleum Exploration
- [12]. Environmental Protection Agency/Landfarming (<http://www.epa.gov/oust/cat/LANDFARM.HTM>)
- [13]. Ν.Καλογεράκης, Χανιά 2010, «Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος»
- [14]. Mphokgo P. Maila1, & Thomas E. Cloete, 2005, "Bioremediation of petroleum hydrocarbons through Landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?"