

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Πτυχιακή εργασία

<< Εκτίμηση της βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου με
εμπλουτισμό επιφυτικών θαλάσσιων μικροοργανισμών
του *Posidonia oceanica* >>

Κάιζερ Χρυσοβαλάντω

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

**<< Εκτίμηση της βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου με
εμπλουτισμό επιφυτικών θαλάσσιων μικροοργανισμών
του *Posidonia oceanica* >>**

Κάιζερ Χρυσοβαλάντω

Σύμβουλος καθηγητής ή καθηγήτρια
Δρ. Μάρλεν Βάσκες

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Χρυσοβαλάντω Κάιζερ, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Μάρλεν Βάσκες για την επιλογή του θέματος, την εξαιρετική συνεργασία, τη συμπαράσταση, τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για την επίβλεψη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης και...

- Στον καθηγητή Νικόλαο Καλογεράκη και την ομάδα του από το Πολυτεχνείο Κρήτης για τη συνεισφορά του στον πειραματικό σχεδιασμό και παραχώρηση του αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μάζας (GC-MS) για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μέσω του προγράμματος ERASMUS training (M. Βασκες) και placement (X. Μοδέστου).
- Στη Χριστίνα Μοδέστου, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση των πειραμάτων αυτών καθώς και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Στην Ιωάννα Σταυρινίδου για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη συγγραφή της πτυχιακής διατριβής.
- Στο Δρ. Κώστα Ανδρέου για τη συνεργασία που είχαμε και την πολύτιμη συνεισφορά του στην ανάλυση με αέριο χρωματογράφο (GC) στα εργαστήρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για τη στήριξη και συμπαράσταση σε όλη την ακαδημαϊκή μου πορεία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η ικανότητα της θαλάσσιας μικροβιακής κοινότητας που απομονώθηκε από το φυτό *Posidonia oceanica* (*P.oceanica*) για την βιοδιάσπαση συγκεκριμένων κλασμάτων του αργού πετρελαίου. Στόχος ήταν η απομόνωση των μικροοργανισμών από φυλλώδη ιστό και νεκρό φυλλώδη ιστό (matte) του φυτού *P. oceanica*.

Η διερεύνηση της ικανότητας βιοαποικοδόμησης διαφορετικών κλασμάτων αργού πετρελαίου (κορεσμένοι και αρωματικοί υδρογονάνθρακες) των απομονωθέντων μικροοργανισμών με την ταυτοποίηση 29 διαφορετικών υδρογονανθράκων.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει πειράματα βιοαποικοδόμησης κλασμάτων αργού πετρελαίου. Με το πέρας των 28 ημερών επώασης, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης και εκχύλιση στερεάς φάσης. Τέλος πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των δειγμάτων με αέριο χρωματογράφο (GC) και αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC-MS) για την ποσοτικοποίηση του ποσοστού απομάκρυνσης των κορεσμένων καθώς και αρωματικών υδρογονανθράκων. Σημειώνεται ότι έγινε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 29 διαφορετικών υδρογονανθράκων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η βιοαποικοδόμηση, αναπτύχθηκε σε συνεργασία με το καθηγητή Νικόλαο Καλογεράκη και την ομάδα του από το Πολυτεχνείο Κρήτης, η οποία βασίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο (40 CFR Ch. I, Pt 300, App. C) δοκιμής της αποτελεσματικότητας των παραγόντων βιοεξυγίανσης της Environmental Protection Agency (EPA). Ο σκοπός για τον οποίο σχεδιάστηκε το πρωτόκολλο, είναι για να καθορίσει την ικανότητα ενός προϊόντος να βιοαποικοδομήσει το πετρέλαιο ποσοτικοποιώντας αλλαγές στη σύνθεση του πετρελαίου ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργαστηριακή μελέτη, διεξάχθηκε το συμπέρασμα ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το φυτό *P.oceanica* έχουν την ικανότητα να βιοδιασπούν τους κορεσμένους και αρωματικούς υδρογονάνθρακες του αργού πετρελαίου συγκρίνοντας τα δείγματα με το πείραμα ελέγχου (χωρίς μικροοργανισμούς). Η μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση των κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων πραγματοποιήθηκε από τα φύλλα του φυτού *P.oceanica*, με βάση τον αέριο χρωματογράφο και φασματογράφο μάζας.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη εργασία, θα πρότεινα τη χρήση λιπόφιλων λιπασμάτων καθώς και επιφανειοδραστικών ουσιών στα δείγματα για μελλοντική έρευνα. Η σύζευξη των λιπόφιλων λιπασμάτων και των επιφανειοδραστικών ουσιών έχουν την ικανότητα να διασπείρουν το αργό πετρέλαιο, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τη διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου και έτσι οι μικροοργανισμοί μπορούν να δράσουν πιο εύκολα και να το βιοδιασπάσουν. Επίσης σημαντικό θα ήταν να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να διασπούν τους συγκεκριμένους υδρογονάνθρακες εφόσον έχει ήδη πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA των δειγμάτων.

Λέξεις κλειδιά: [αργό πετρέλαιο, μικροβιακή κοινότητα, *Posidonia oceanica*, βιοαποικοδόμηση, αέρια χρωματογραφία φασματογράφου μάζας]

ABSTRACT

The current thesis examined the ability of marine microbial community isolated from *Posidonia oceanica* (*P.oceanica*) seagrass to biodegrade certain fractions of crude oil. The main objective of this thesis was the isolation of microorganisms from leaf tissue and dead leaf tissue (matte) of *P.oceanica* seagrass.

It was also investigated the ability of biodegradation of different fractions of crude oil (saturated and aromatic hydrocarbons) by isolated microorganisms with the identification 29 different hydrocarbons.

The experimental procedure includes experiments for the biodegradation of crude oil fractions. At the end of 28 days of incubation, a liquid-liquid phase extraction and solid phase extraction were applied. Finally, the samples were analyzed using the gas chromatograph (GC) and Gas Chromatograph-mass Spectrophotometer (GC-MS) in order to quantify the isolation percentage of saturated and aromatic hydrocarbons. It is notable that 29 different hydrocarbons were identified and quantified.

The methodology that was used to examine the biodegradation was developed by the collaboration with professor Nikolao Kalogeraki and his team of the Technical University of Crete, based on a modified protocol (40 CFR Ch.I, Pt 300,App.C) of the Environmental Protection Agency (EPA) for the effectiveness of bioremediation by various agents. The purpose, for which this protocol was designed, was to determine the ability of an agent to biodegrade oil by quantitating changes in the oil composition as a result of biodegradation.

By completing the current experimental procedure, the main finding of this study was the ability of the marine microbial community isolated from *P. oceanica* to biodegrade the saturated and aromatic hydrocarbons of crude oil comparing the samples with the control experiment (no microorganisms). The biggest biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons was occurred by the leaves of *P.oceanica*, based on Gas Chromatograph-Mass Spectrophotometer.

Future research based on the results of this is suggested with direction in the use of fertilizers and lipophilic surfactants substances in samples containing crude oil. The lipophilic fertilizers and surfactants conjugation has the ability to disperse crude oil, increasing in this way the water-oil interface, enhancing their activity and leading to the effective biodegradation of crude oil. Also, it is remarkable the identification of microorganisms that have the ability to degrade certain hydrocarbons because their DNA extraction has been done.

Keywords: [crude oil, microbial community, *Posidonia oceanica*, biodegradation, gas chromatography mass spectrometer]

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	vii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiv
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Error! Bookmark not defined.
1.1 Θαλάσσια ρύπανση-κύριες αιτίες ρύπανσης	1
1.2 Θαλάσσια επιβάρυνση από πετρελαιοειδή.....	2
1.3 Πετρέλαιο και περιβάλλον.....	3
1.3.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου.....	4
1.3.2 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες αργού πετρελαίου.....	6
1.3.3 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων.....	7
1.3.3.1 Ατύχημα πετρελαιοφόρου Exxon Valdez.....	7
1.3.3.2 Ατύχημα που προκλήθηκε από έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon.....	8
1.3.4 Συνέπειες πετρελαικής ρύπανσης.....	8
1.4 Τρόποι αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων.....	10
1.4.1 Φυσικές μέθοδοι.....	10
1.4.2 Μη χημικές μέθοδοι.....	11
1.4.3 Χημικές μέθοδοι.....	12
1.4.4 Η τεχνική της βιοεξυγίανσης ως μέθοδος αντιμετώπισης.....	12
1.5 Εισαγωγή πετρελαίου στο περιβάλλον-Συμπεριφορά-Διεργασίες	13
1.5.1 Διεργασίες γήρανσης	13

1.5.2	Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου.....	15
1.5.2.1	Μηχανισμοί βιοαποικοδόμησης πετρελαίου.....	15
1.5.2.2	Βιοαποικοδόμηση συστατικών πετρελαίου.....	16
1.5.2.3	Παράγοντες που επιδρούν στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου.....	17
1.5.2.4	Εφαρμογή βιοδεικτών και εκτίμηση του βαθμού βιοαποικοδόμησης	18
1.6	<i>Posidonia oceanica</i>	19
1.7	Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων.....	19
1.8	Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.....	39
2	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	40
2.1	Περιοχή μελέτης.....	40
2.2	Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Posidonia Oceanica</i>	41
2.3	Έλεγχος για βιοαποικοδόμηση αργού πετρελαίου.....	43
2.3.1	Προετοιμασία θαλασσινού νερού.....	43
2.3.2	Προετοιμασία πετρελαίου.....	43
2.3.3	Δομή πειράματος	44
2.4	Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE-Liquid Liquid Extraction).....	45
2.5	Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction).....	48
2.6	Ανάλυση GC-MS.....	50
2.6.α	Αέριος χρωματογράφος (GC).....	50
2.6.β	Φασματογράφος Μάζας (MS).....	51
2.7	Διαδικασία ανάλυσης στο GC/MS.....	51
2.8	Μέθοδος CTAB.....	56
3	ΑΝΑΛΥΣΗ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	57
3.1	Μετρήσεις συγκέντρωσης DNA δειγμάτων από το φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου.....	57

3.2 Συγκεντρώσεις κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες.....	59
3.3 Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος matte και πειράματος ελέγχου στη πρώτη δειγματοληψία για κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	78
3.4 Χρωματογραφήματα αρωματικών υδρογονανθράκων που αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο μετά τις 28 ημέρες επώασης.....	80
3.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων με παρόμοιες έρευνες.....	90
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	94
5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	20
Πίνακας 2: Πληροφορίες δειγματοληψίας.....	41
Πίνακας 3: Εσωτερικά πρότυπα για κάθε αναλυτή στόχο.....	53
Πίνακας 4: Συνθήκες λειτουργίας του GC/MS.....	54
Πίνακας 5: Αναλυτές και συστατικά αναφοράς	55
Πίνακας 6: Συγκέντρωση DNA (ng/ul) δειγμάτων από τη πρώτη δειγματοληψία.....	57
Πίνακας 7: Συγκέντρωση DNA (ng/ul) δειγμάτων από την πρώτη δειγματοληψία.....	58
Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	59
Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία.....	61
Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	63
Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	64
Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	67
Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία.....	68
Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	69
Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	70
Πίνακας 16: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση κορεσμένων υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	71

Πίνακας 17: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση κορεσμένων υδρογονανθράκων για τα δείγματα matte και φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία.....	72
Πίνακας 18: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	72
Πίνακας 19: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην δεύτερη δειγματοληψία.....	73
Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχονται στα δείγματα.....	86
Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχονται στα δείγματα.....	87
Πίνακας 22: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων.....	88
Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	100
Πίνακας 24: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	101
Πίνακας 25: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	103
Πίνακας 26: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	104
Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία.....	106
Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	107
Πίνακας 29: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	108
Πίνακας 30: Συγκέντρωση (mg) αργού πετρελαίου για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	109

Πίνακας 31: Συγκέντρωση (mg) αργού πετρελαίου για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες	109
Πίνακας 32: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	110
Πίνακας 33: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία.....	111
Πίνακας 34: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία.....	112
Πίνακας 35: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην δεύτερη δειγματοληψία.....	114
Πίνακας 36: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην πρώτη δειγματοληψία.....	115
Πίνακας 37: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία.....	117
Πίνακας 38: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	118
Πίνακας 39: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Σχεδιάγραμμα 1: Πετρελαιοκηλίδες επτά τόνων και άνω που σημειώθηκαν ανά δεκαετία.....	2
Εικόνα 1: Περιοχές στις οποίες συνέβηκαν οι 20 μεγαλύτερες διαρροές.....	3
Εικόνα 2: Μοριακοί τύπο υδρογονανθράκων. Αλκάνια (a,b,c), κυκλοαλκάνια (d), αρωματικοί υδρογονάνθρακες (e).....	5
Εικόνα 3: Σύγκρουση πετρελαιοφόρου Exxon Valdez στον πορθμό Prince William στην περιοχή της Αλάσκας το 1989.....	8
Εικόνα 4: Έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon.....	8
Εικόνα 5: Διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη γήρανση.....	15
Εικόνα 6: Περιοχές δειγματοληψίας.....	40
Εικόνα 7: Τα 4 μέρη του φυτού <i>Posidonia Oceanica</i> φύλλα (A), matte (B), ρίζωμα (Γ), ρίζα (Δ).....	42
Εικόνα 8: Τα ποτήρια ζέσεως με τα μέρη του φυτού στη συσκευή ανακίνησης.....	43
Εικόνα 9: Προετοιμασία κωνικών φιάλων με τις ανάλογες ποσότητες αργού πετρελαίου και της κοινότητας μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από την <i>Posidonia Oceanica</i>	44
Εικόνα 10: Διαχωρισμός οργανικής και υδάτινης φάσης των δειγμάτων μετά από 28 μέρες επώασης.....	46
Εικόνα 11: Συλλογή της οργανικής φάσης σε κωνικές φιάλες.....	46
Εικόνα 12: Τοποθέτηση των κωνικών φιάλων στο υδατόλουτρο 60 ⁰ C ούτως ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και να παραμείνει το αργό πετρέλαιο στην κωνική.....	47
Εικόνα 13: Διάλυση του εξατμισμένου δείγματος σε διχλωρομεθάνιο και μεταφορά του σε φιαλίδιο 4ml.....	47
Εικόνα 14: Μεταφορά δείγματος στο φουσίγγιο.....	49
Εικόνα 15: Διαδικασία για προσθήκη εξανίου.....	49

Εικόνα 16: Μεταφορά διγλωρομεθανίου.....	50
Σχεδιάγραμμα 2: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης κορεσμένων υδρογονανθράκων στη πρώτη δειγματοληψία.....	74
Σχεδιάγραμμα 3: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης κορεσμένων υδρογονανθράκων στην δεύτερη δειγματοληψία.....	75
Σχεδιάγραμμα 4: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων στην πρώτη δειγματοληψία.....	76
Σχεδιάγραμμα 5: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων στην δεύτερη δειγματοληψία.....	77
Σχεδιάγραμμα 6: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων.....	89
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	78
Εικόνα 18: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	79
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	79
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του πειράματος ελέγχου στη δεύτερη δειγματοληψία.....	80
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στη πρώτη δειγματοληψία	81
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα του δείγματος φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία.....	82
Εικόνα 23: Χρωματογράφημα του δείγματος matte στη πρώτη δειγματοληψία.....	83
Εικόνα 24: Χρωματογράφημα του δείγματος φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία.....	84
Εικόνα 25: Χρωματογράφημα του δείγματος matte στη δεύτερη δειγματοληψία.....	85
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα δείγματος matte 3 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες	121
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	121

Εικόνα 28: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	122
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 3 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	122
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	123
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες	123
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα δείγματος matte 3 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	124
Εικόνα 33: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	124
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	125
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 3 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	125
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες.....	126
Εικόνα 37: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	126
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	127
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	127
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	128
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	128

Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	129
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	129
Εικόνα 44: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	130
Εικόνα 45: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	130
Εικόνα 46: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	131

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Θαλάσσια ρύπανση-κύριες αιτίες ρύπανσης

Το πρόβλημα της θαλάσσιας ρύπανσης, άρχισε να εμφανίζεται με το τέλος του ΄Β παγκόσμιου πολέμου. Το 1970 στο πλαίσιο της Ομάδας Ειδικών των Ηνωμένων Εθνών για τις Επιστημονικές Πλευρές της Θαλάσσιας Ρύπανσης (GESAMP), θεσπίστηκε ο ορισμός της θαλάσσιας ρύπανσης. Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, ως ρύπανση της θάλασσας (marine pollution) θεωρείται η «άμεση ή έμμεση εισαγωγή από τον άνθρωπο ουσιών ή ενέργειας στο θαλάσσιο περιβάλλον περιλαμβανομένων και των εκβολών περιοχών με αποτέλεσμα βλάβη στους ζώντες πόρους, κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, εμπόδια στις θαλάσσιες δραστηριότητες περιλαμβανόμενης της αλιείας χειροτέρευση του θαλάσσιου νερού και μείωση των δυνατοτήτων χρήσης του για ψυχαγωγικούς σκοπούς» (Βλάχος, Γ. Π. 2007).

Η υποβάθμιση των θαλάσσιων περιοχών είναι ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα που ταλανίζουν τον πλανήτη μας ιδιαίτερα τις κλειστές θάλασσες (Μεσόγειος θάλασσα) στην οποία υπάρχει περιορισμένη ανανέωση του νερού και έτσι η ρύπανση είναι εντονότερη, σ' αντίθεση με τις ανοικτές θάλασσες όπως είναι η βόρεια και η νορβηγική θάλασσα (Βλάχος, Γ. Π. 2007).

Οι παράγοντες που οδήγησαν στην ταχεία επιδείνωση αυτού φαινομένου είναι οι εξής:

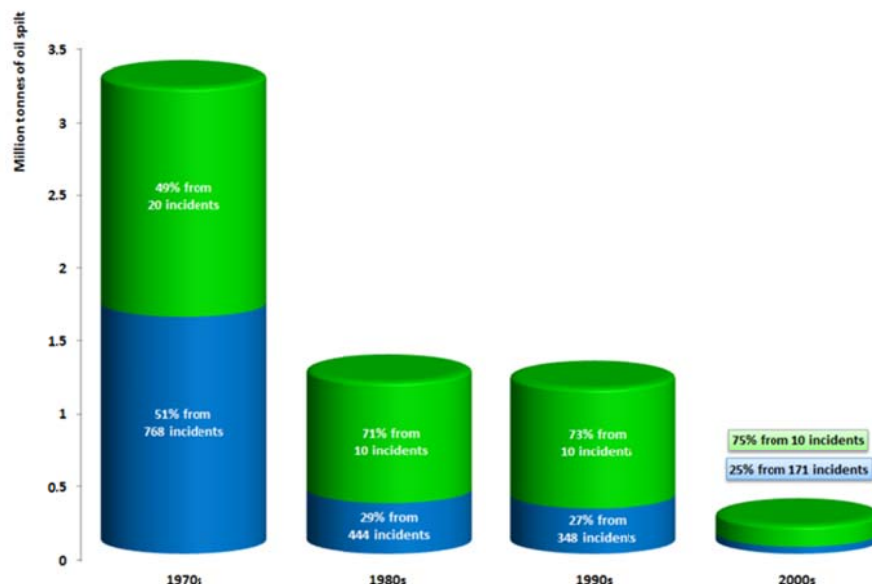
- Μεταφορά επικίνδυνων φορτίων (χημικές-ραδιενεργές ουσίες)
- Εκμετάλλευση φυσικών πόρων για παραγωγή ενέργειας
- Ρήξη στερεών αποβλήτων από διάφορες βιομηχανίες
- Έντονη αστικοποίηση
- Κατάληψη περιορισμένων γεωγραφικών περιοχών από βιομηχανικές δραστηριότητες
- Κατασκευαστική δραστηριότητα στη θάλασσα (τούνελ, γέφυρες)
- Διακίνηση πετρελαιοειδών (Βλάχος, Γ. Π. 2007)

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, επικεντρώνεται στη ρύπανση της θάλασσας από την εκμετάλλευση καθώς και τη μεταφορά των πετρελαιοειδών τα οποία αναλύονται με περισσότερη λεπτομέρεια στη συνέχεια.

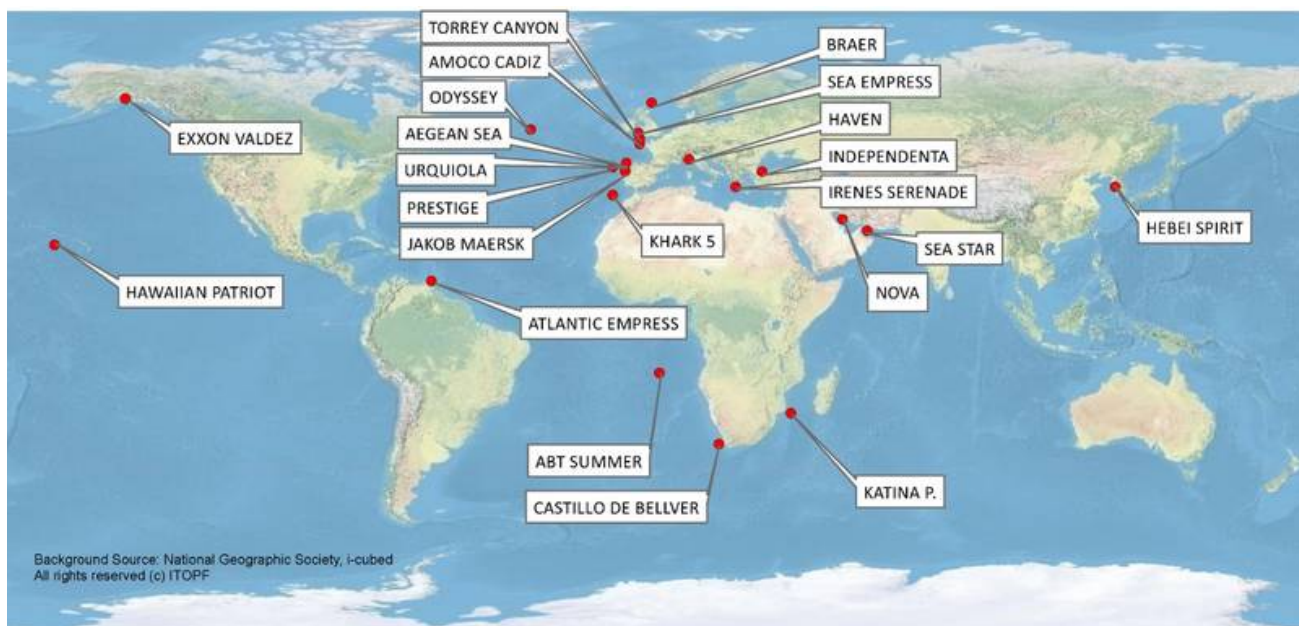
1.2 Θαλάσσια επιβάρυνση από πετρελαιοειδή

Η αυξημένη χρήση υδρογονανθράκων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών οδηγεί στη μεταφορά τεράστιων ποσοτήτων τόνων πετρελαίου ανά έτος, διαμέσου της θάλασσας. Η διακίνηση αυτή εγκυμονεί διαρροή πετρελαίου στη θάλασσα.

Σύμφωνα με έρευνες, η ποσότητα του πετρελαίου που διέρρευσε στη θάλασσα, οφείλεται σε πολύ μεγάλες πετρελαιοκηλίδες. Τη δεκαετία του 1990, καταμετρήθηκαν 358 διαρροές των επτά τόνων και άνω η κάθε μια, συνολικά 1.133.000 τόνοι πετρελαίου με το 73% να χύνεται σε δέκα επεισόδια (σχεδιάγραμμα 1). Στη δεκαετία του 2000, καταμετρήθηκαν 181 διαρροές στις οποίες διέρρευσαν επτά τόνοι και άνω από τη κάθε μια, συνολικά 196.000 τόνοι πετρελαίου με το 75% να διαρρέει σε δέκα επεισόδια (σχεδιάγραμμα 1). Τέλος, κατά την εξαετή περίοδο 2010-2015 υπήρξαν 42 διαρροές πετρελαίου των επτά τόνων και άνω στη κάθε μια, συνολικά 33.000 τόνοι πετρελαίου με το 86% να χύνεται μέσα σε δέκα επεισόδια (ITOPF 2015) . Οι περιοχές στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι πιο μεγάλες διαρροές, παρουσιάζονται στην εικόνα 1. Επομένως, η ποσότητα διαρροών πετρελαίου στη θάλασσα μέσα στις δεκαετίες, είναι αξιοσημείωτη.



Σχεδιάγραμμα 1: Πετρελαιοκηλίδες επτά τόνων και άνω που σημειώθηκαν ανά δεκαετία (ITOPF 2015)



Εικόνα 1: Στο χάρτη φαίνονται οι περιοχές όπου συνέβηκαν οι 20 μεγαλύτερες διαρροές (ITOPF 2015)

1.3 Πετρέλαιο και περιβάλλον

Το ακατέργαστο πετρέλαιο ή διαφορετικά αργό πετρέλαιο ήταν γνωστό από προχριστιανικούς χρόνους από τους Κινέζους. Η σύγχρονη βιομηχανία πετρελαίου ξεκίνησε από τη Ρουμανία και η πρώτη γεώτρηση, πραγματοποιήθηκε το 1859 στην Πενσυλβανία από τον συνταγματάρχη Edwin A Drake. Η κύρια πρώιμη χρήση του πετρελαίου ήταν για να αντικαταστήσει το ακριβό έλαιο που προερχόταν από το λίπος των φαλαινών για φωτισμό. Σήμερα έχει διαφοροποιηθεί δραματικά ο ρόλος του, εφόσον χρησιμοποιείται ως καύσιμο και ως πηγή χημικών ουσιών στην παγκόσμια αγορά (Hassanshahian & Cappello 2013).

Το αργό πετρέλαιο, ορίζεται ως μια τοξική και επικίνδυνη ουσία, η οποία μετά από μια διαρροή στον ωκεανό εξαπλώνεται στην επιφάνεια του νερού λόγω άνωσης, σχηματίζοντας ένα λεπτό φιλμ μεταβλητού πάχους ως συνάρτηση της συγκέντρωσης και του συντελεστή διάχυσης ο οποίος εκφράζει την ικανότητα των ατόμων προς τη διάχυση. Στη συνέχεια, μια διαδικασία χημικού μετασχηματισμού και γαλακτωματοποίησης των πετροχημικών ουσιών ξεκινά στην επιφάνεια της θάλασσας. Ακολούθως, μέρος της

πετρελαιοκηλίδας παραμένει στη θάλασσα ενώ τα πτητικά συστατικά που περιέχονται, εξατμίζονται στην ατμόσφαιρα. Το ελαιώδες φιλμ, είναι δυνατό να αλλάξει την ένταση του ηλιακού φωτός και των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που εισχωρούν στη θάλασσα καθώς επίσης, μειώνει σε μεγάλο βαθμό τα τριχοειδή κύματα τα οποία έχουν μήκη κύματος μερικών χιλιοστών σε ταχύτητες ανέμου λίγο περισσότερο από 50 cm/s. Αυτό έχει ως τελικό αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι ισορροπίες των θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Redondo & Platonov 2009).

Σύμφωνα με τα πιο πάνω, καλείται επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη τεχνολογιών με στόχο την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων. Μια μη δαπανηρή αλλά και φιλική, βιολογική διεργασία προς το περιβάλλον, είναι η βιοεξυγίανση, μέσω της οποίας διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν να διασπάσουν τις πολύπλοκες ενώσεις του πετρελαίου σε απλούστερες και ακίνδυνες τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον ίδιο τον άνθρωπο. Η διεργασία της βιοεξυγίανσης μέσω θαλάσσιων μικροοργανισμών, αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό σημείο μελέτης στην παρούσα εργασία.

1.3.1 Χημική σύσταση αργού πετρελαίου

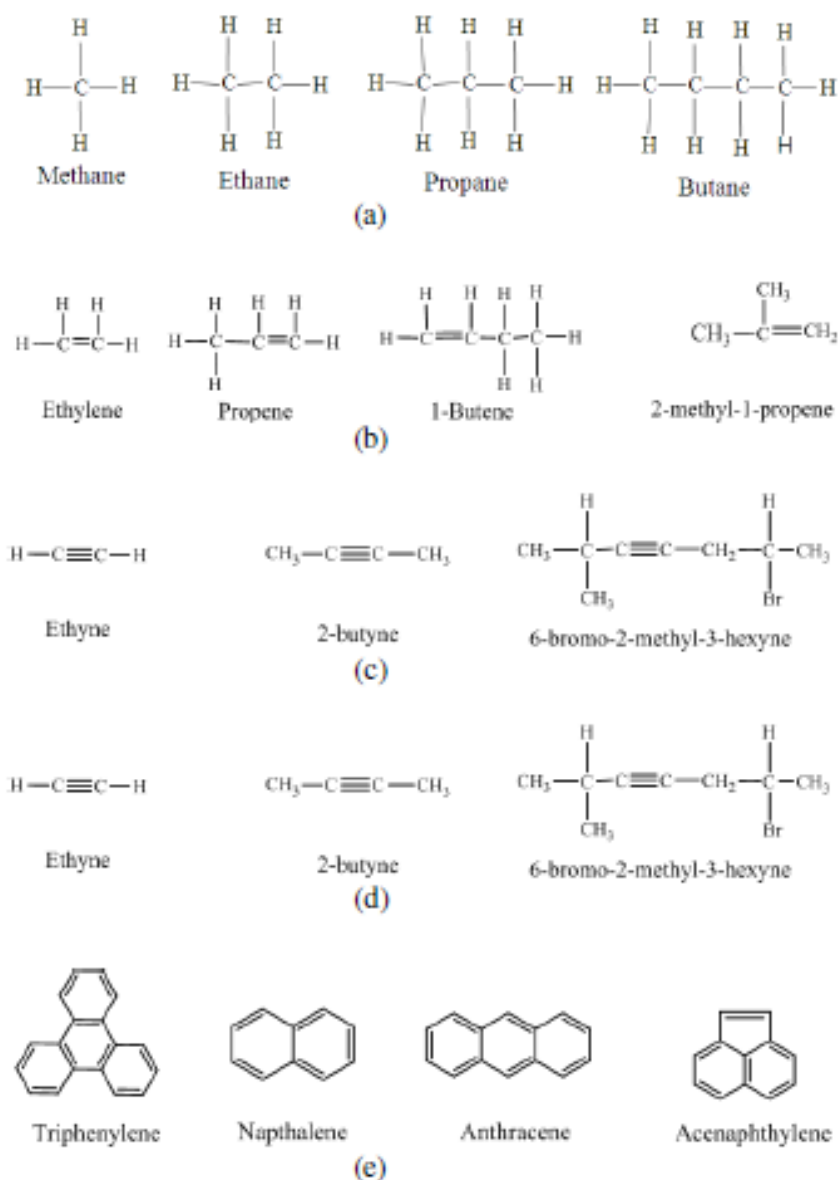
Το πετρέλαιο, αποτελείται από ποικιλία υδρογονανθράκων δηλαδή ενώσεις που περιέχουν άνθρακα (83-87%) και υδρογόνο (10-14%), αλλά σε μικρές συγκεντρώσεις διαθέτει μη υδρογονανθρακικές ενώσεις όπως αζωτούχες (0.1-2%), θειούχες (0.5-6%), οξυγονούχες (0.1-1.5%) και ενώσεις μετάλλων (<0.1%). Οι υδρογονάνθρακες με ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα βρίσκονται στην αέρια μορφή, από πέντε μέχρι δεκαέξι στην υγρή μορφή και πάνω από δεκαεπτά συναντώνται στη στερεή μορφή. Η ευθεία, διακλαδωμένη αλυσίδα και οι δομές δακτυλίου είναι οι τρεις μοριακές δομές των υδρογονανθράκων. Οι κατηγορίες των υδρογονανθράκων αναλύονται στη συνέχεια (Κωνσταντίνος 2008) .

Οι **κορεσμένοι υδρογονάνθρακες** περιλαμβάνουν τις παραφίνες ή αλκάνια και τα κυκλοαλκάνια ή διαφορετικά ναφθένια τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 2.

- Αλκάνια: Έχουν μοριακό τύπο C_nH_{2n+2} (αλειφατικά) όπως το προπάνιο και το μεθάνιο και οι μικροοργανισμοί μπορούν να τα διασπάσουν εύκολα.
- Κυκλοαλκάνια: Έχουν μοριακό τύπο C_nH_{2n} (αλκυκλικά), συντελούν στο 30-60% του συνολικού πετρελαίου και η βιοαποικοδόμηση τους είναι σχετικά δύσκολη (Κωνσταντίνος 2008).

Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (εικόνα 2) αποτελούνται από μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις όπως βενζόλιο τολουόλιο και από πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PAHs) όπως ναφθαλίνη ανθρακένιο κ.α. Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, θεωρούνται πιθανές καρκινογενείς ουσίες για αυτό και χρήζουν ιδιαίτερης περιβαλλοντικής σημασίας (Κωνσταντίνος 2008).

Τα ασφαλτένια και οι ρητίνες αποτελούν υποκατηγορία των αρωματικών ενώσεων. Ένα μέσο αργό πετρέλαιο αποτελείται από 30% αλκάνια, 50% κυκλοαλκάνια, 15% αρωματικά και 5% ενώσεις θείου, αζώτου και οξυγόνου (Κωνσταντίνος 2008) .



Εικόνα 2: Μοριακοί τύποι υδρογονανθράκων. Αλκάνια (a,b,c), κυκλοαλκάνια (d), αρωματικοί υδρογονάνθρακες (e) (Dave & Ghaly 2011)

1.3.2 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες αργού πετρελαίου

Η κατανόηση των ιδιοτήτων του πετρελαίου καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική για τον καθορισμό της πετρελαιοκηλίδας καθώς και του τρόπου αντιμετώπισης της.

Οι πιο σημαντικές φυσικές ιδιότητες είναι:

1. Η πυκνότητα, στην οποία συνήθως γίνεται χρήση της ειδικής πυκνότητας και δηλώνει την πορεία κατάληξης του πετρελαίου στο νερό. Η τιμή της για το αργό πετρέλαιο κυμαίνεται από 0.73 έως 1.04 gr/cm³. Επίσης, όταν υπάρχει μεγάλη περιεκτικότητα μικρής πυκνότητας υδρογονάνθρακες (παραφινικούς) το πετρέλαιο είναι χαμηλής πυκνότητας. Αντίθετα όταν υπάρχει μεγάλη περιεκτικότητα σε μεγάλης πυκνότητας υδρογονάνθρακες (ναφθενικούς/αρωματικούς) η πυκνότητα του πετρελαίου είναι υψηλή.
2. Το χρώμα του πετρελαίου, εξαρτάται από το είδος των υδρογονανθράκων και τη γενική σύσταση του πετρελαίου. Ποικίλει από ανοικτό κίτρινο έως μαύρο (ασφαλτενικά πετρέλαια), πράσινο (παραφινικό) ακόμα και μπλε (ναφθενικό).
3. Η επιφανειακή τάση η οποία καθορίζει την ικανότητα του πετρελαίου να εξαπλώνεται εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την επιφανειακή τάση με επακόλουθο το πετρέλαιο να εξαπλώνεται πιο γρήγορα.
4. Το ιξώδες, δείχνει το ρυθμό εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας καθώς και την πιθανότητα διείσδυσης του πετρελαίου στο έδαφος και στα παράκτια υποστρώματα. Εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την περιεκτικότητα του πετρελαίου σε ελαφρά κλάσματα.
5. Το σημείο ροής είναι η κατάλληλη θερμοκρασία στην οποία το πετρέλαιο σταματά να ρέει και παίρνει μορφή ημιστερεού. Το σημείο ροής για το αργό πετρέλαιο έχει τιμή από -57 °C έως 32 °C (ITOPF 2011).

Οι σημαντικότερες χημικές ιδιότητες είναι οι ακόλουθες:

1. Η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από τη χημική σύνθεση του πετρελαίου. Γενικά η διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό είναι εξαιρετικά χαμηλή και για το αργό πετρέλαιο είναι 30 mg/L. Είναι σημαντικός παράγοντας για τις διεργασίες βιοεξυγίανσης.

2. Σημείο ανάφλεξης, είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία είναι εφικτή η ανάφλεξη πετρελαίου και αέρα. Το πετρέλαιο έχει χαμηλό σημείο ανάφλεξης, επομένως είναι ιδιαίτερα εύφλεκτο.

Σημαντικές ιδιότητες επιπρόσθετα, αποτελούν η πίεση ατμών η οποία φανερώνει σε ορισμένη θερμοκρασία την ευκολία με την οποία εξατμίζεται ένα υγρό ή εξαχνώνεται ένα στερεό, το σημείο τήξης το οποίο ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία αλλάζει φάση μια ουσία μεταβαίνοντας από την στερεή στην υγρή κατάσταση και το σημείο ζέσεως το οποίο είναι η θερμοκρασία στην οποία βράζει μια καθαρή ουσία (ITOPF 2011).

1.3.3 Περιστατικά πετρελαιοκηλίδων

Είναι αναμφισβήτητο, ότι τα ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων μεγάλης κλίμακας αποφέρουν ανεπανόρθωτες ζημιές στο θαλάσσιο περιβάλλον και έχουν θέσει σε μεγάλο κίνδυνο την ανθρώπινη ζωή. Στη συνέχεια αναφέρονται τα κυριότερα περιστατικά πετρελαιοκηλίδων και οι επιπτώσεις τους.

1.3.3.1 Ατύχημα πετρελαιοφόρου Exxon Valdez

Το Μάρτιο του 1989, στην περιοχή της Αλάσκας των ΗΠΑ σημειώθηκε το ατύχημα του πετρελαιοφόρου Exxon Valdez το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 3, που απελευθέρωσε στη θάλασσα 38000 τόνους αργού πετρελαίου. Το ατύχημα, προκλήθηκε από τον καπετάνιο Joseph J. Hazelwood ο οποίος τη νύχτα της καταστροφής ήταν υπό την επιρροή αλκοόλ και έτσι χτύπησε τον ύφαλο Blight στον πορθμό Prince William. Η διαρροή σταμάτησε μετά από λίγες μέρες, δυστυχώς όμως η ανάκαμψη δεν μπορεί να έχει μια ημερομηνία λήξης.

Η πετρελαιοκηλίδα κάλυψε περισσότερα από 1,300 μίλια της ακτής και 11,000 τετραγωνικά μέτρα της θάλασσας. Το ατύχημα, ήταν η αιτία θανάτου 140 φαλακρών αετών, 302 φωκιών των λιμανιών, 2800 θαλάσσιων βιδρών και 250000 θαλασσοπουλιών. Επιπρόσθετα ο κλάδος της αλιείας είχε τεράστιες κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις, διαταράχθηκαν οι ισορροπίες του θαλάσσιου οικοσυστήματος και επηρεάστηκε η ανθρώπινη υγεία (Garshelis & Johnson 2013).



Εικόνα 3: Σύγκρουση πετρελαιοφόρου Exxon Valdez στον πορθμό Prince William στην περιοχή της Αλάσκας το 1989 (Enviroaedia n.d.)

1.3.3.2 Ατύχημα που προκλήθηκε από έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon

Τον Απρίλιο του 2010, στον κόλπο του Μεξικού σε απόσταση περίπου 500 ναυτικά μίλια νοτιοδυτικά του ποταμού Μισισσιπή, πραγματοποιήθηκε έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon (εικόνα 4). Εκτιμάται ότι απελευθερώθηκαν στο περιβάλλον 780 εκατομμύρια λίτρα πετρελαίου. Επίσης, αναφέρεται ότι αρχικά καλύφθηκαν από πετρέλαιο 1773 χιλιόμετρα από την ακτή ενώ σε περίοδο ενός και δύο χρόνων παρέμειναν 847 και 687 χιλιόμετρα αντίστοιχα καλυμμένα με πετρέλαιο (Atlas et al. 2015).



Εικόνα 4: Έκρηξη στην πλατφόρμα Deepwater Horizon (Anon n.d.)

1.3.4 Συνέπειες πετρελαϊκής ρύπανσης

Τα διάφορα ατυχήματα πετρελαιοκηλίδων, δεν επιφέρουν μόνο αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον αλλά και στον ίδιο τον άνθρωπο. Βέβαια το μέγεθος της καταστροφής εξαρτάται από την περιοχή όπου θα εκδηλωθεί το ατύχημα, δηλαδή πόσο ευαίσθητη είναι με βάση τη

διδυτική ικανότητα του πετρελαίου στο υπόστρωμα της. Επίσης εξαρτάται από την ποσότητα πετρελαίου που θα χυθεί και από τον τύπο του πετρελαίου αν είναι δηλαδή ελαφρύ ή βαρύ κλάσμα πετρελαίου. Επιπρόσθετα, εξαρτάται και από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν γιατί αν είναι έντονες και υπάρχουν σφοδροί άνεμοι, μεγάλα κύματα κ.α. επηρεάζονται οι φυσικές διεργασίες γήρανσης του πετρελαίου και μετέπειτα οι διαδικασίες βιοεξυγίανσης. Οι συνέπειες των πετρελαιοκηλίδων, αναλύονται πιο κάτω.

Επιπτώσεις στην πανίδα: Το φτέρωμα ή το δέρμα των ζώων καλύπτεται από πετρέλαιο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η θερμοκρασία σώματος τους, να καταστρέφεται στη συνέχεια ο λιπώδης ιστός και τέλος απώλεια βάρους λόγω της προσπάθειας τους να διατηρήσουν την θερμοκρασία τους. Τα φτερά των πτηνών που καλύπτονται από πετρέλαιο, βιώνουν την αφυδάτωση και την έλλειψη τροφής εφόσον είναι ανίκανα να πετάξουν ή να κολυμπήσουν.

Επιπτώσεις στη χλωρίδα: Το πετρέλαιο προσκολλάται στα φύλλα των φυτικών ειδών με αποτέλεσμα τη νέκρωση του φυτικού οργανισμού αφού δεν μπορεί να φωτοσυνθέσει. Επιπλέον, επηρεάζεται το ριζικό σύστημα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί εδάφους και περιορίζεται το ποσοστό εκμεταλλεύσιμου εδάφους από τους ανθρώπους.

Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία: Οι επικίνδυνες τοξικές ουσίες του πετρελαίου, είναι δυνατόν να εισχωρήσουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του δέρματος, της αναπνοής και των βλεννογόνων αδένων. Αν υπάρχει χρόνια έκθεση στις συγκεκριμένες ουσίες, προκαλούνται διάφορα νευρολογικά συμπτώματα, πονοκέφαλοι, ναυτία, ζάλη, υπνηλία, εμετό, δύσπνοια, κοιλιακοί πόνοι ακόμη και καρκίνο του δέρματος. Οι άμεσες επιπτώσεις που προκαλούνται είναι πονοκέφαλοι, ερεθισμοί στα μάτια, δύσπνοια, δερματίτιδα, ρινική και λαρυγγική κοιλότητα.

Κοινωνικές επιπτώσεις: Όταν εμφανίζονται πετρελαιοκηλίδες στη θάλασσα, τότε υποβαθμίζεται η αισθητική της συγκεκριμένης θαλάσσιας περιοχής, καθώς επίσης κρίνεται και ακατάλληλη για κολύμπι, αθλητικές δραστηριότητες και ψάρεμα.

Οικονομικές επιπτώσεις: Η εμφάνιση της πετρελαιοκηλίδας σε περιοχές στις οποίες υποστηρίζουν την οικονομία τους στην αλιεία, τις ιχθυοκαλλιέργειες ή τον τουρισμό

επηρεάζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό οικονομικά. Η περιοχή πλήττεται οικονομικά λόγω μείωσης του πληθυσμού των ψαριών, αλιεύματα κακής ποιότητας και τέλος μειώνεται η αισθητική και η ποιότητα των ακτών. Αναμφίβολα, οι κρατικοί φορείς θα πρέπει να καταθέσουν επιπλέον χρηματικά ποσά για τον καθαρισμό της πετρελαιοκηλίδας και της αποκατάστασης του περιβάλλοντος (Μητροπούλου 2014).

1.4 Τρόποι αντιμετώπισης πετρελαιοκηλίδων

Τα διάφορα περιστατικά πετρελαιοκηλίδων χρήζουν άμεσης αντιμετώπισης γιατί επιφέρουν δυσμενείς επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη οντότητα όπως προαναφέρθηκε. Η αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων, επηρεάζεται από τον τύπο του πετρελαίου, τα χαρακτηριστικά της γύρω περιοχής, και τα περιστασιακά από τις πολιτικές εκτιμήσεις. Ωστόσο έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες οι οποίες αναφέρονται στη συνέχεια.

1.4.1 Φυσικές μέθοδοι

Η φυσική βιοεξυγίανση ή αλλιώς φυσική αποκατάσταση είναι η διαδικασία κατά την οποία το πετρέλαιο αφήνεται να απομακρυνθεί ή να αποικοδομηθεί χωρίς την προσθήκη οποιασδήποτε ουσίας αλλά ούτε τη λήψη κάποιου μέτρου, η φύση δρα χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση. Το πετρέλαιο αφήνεται να απομακρυνθεί φυσικά μέσω της εξάτμισης, της οξειδωσης και της βιοαποικοδόμησης. Οι ελαφρύτερες ενώσεις του πετρελαίου εξατμίζονται στο 50% στις πρώτες 12 ώρες της διαρροής ενώ η διαδικασία της οξειδωσης εμφανίζεται όταν το οξυγόνο έρθει σε επαφή με τις χημικές ενώσεις του πετρελαίου. Η οξειδωση μετατρέπει τις χημικές ενώσεις του πετρελαίου σε απλούστερες με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολο να βιοδιασπαστούν. Τέλος, η βιοαποικοδόμηση λαμβάνει χώρα όταν βακτήρια που ζουν στο νερό έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν το πετρέλαιο, το οποίο τους παρέχει ενέργεια για βιολογικές ανάγκες. Συγκεκριμένα, αυτό συμβαίνει όταν οι πετρελαιοκηλίδες είναι σε μακρινές τοποθεσίες, όταν τα φυσικά ποσοστά απομάκρυνσης πραγματοποιούνται με επιταχυνόμενο ρυθμό και όταν οι πετρελαιοκηλίδες είναι σε περιβαλλοντικά ευαίσθητη περιοχή στην οποία η παρέμβαση από τον άνθρωπο θα προκαλέσει περισσότερη ζημιά (EPA 1999).

1.4.2 Μη χημικές μέθοδοι

Στις Ηνωμένες Πολιτείες για τον καθαρισμό των πετρελαιοκηλίδων στο θαλάσσιο περιβάλλον, έχουν ως πρωταρχική επιλογή τις μη χημικές μεθόδους οι οποίες συγκρατούν και πραγματοποιούν την αποκατάσταση του πετρελαίου που διέρρευσε. Πιο κάτω αναλύονται οι μη χημικές μέθοδοι:

Φράγματα (Booming and skimming): Το πετρέλαιο που επιπλέει συγκρατείται από πλωτούς φραγμούς και στη συνέχεια γίνεται ανάκτηση του μέσω εξαφριστών. Η μέθοδος αυτή έχει ελάχιστη περιβαλλοντική επίδραση.

Υλικό απορροφητικότητας: Το πετρέλαιο απομακρύνεται μέσω υδροφοβικών υλικών και έτσι με την προϋπόθεση ότι η κυκλοφορία πληρωμάτων καθώς και η παραγωγή αποβλήτων ελέγχεται, τότε η μέθοδος αυτή έχει μειωμένη περιβαλλοντική επίπτωση.

Πλύση: Πραγματοποιείται έκπλυση χαμηλής πίεσης με κρύο νερό σε έκπλυση υψηλής πίεσης με καυτό νερό στο πετρέλαιο που βρίσκεται κατά μήκος της ακτής και έτσι συλλέγεται. Η έκπλυση με υψηλή πίεση και καυτό νερό πρέπει οπωσδήποτε να αποφεύγεται σε υγροβιότοπους και βιότοπους οι οποίοι είναι ευαίσθητοι.

Μετακίνηση και κατακάθιση ιζήματος: Μετακίνηση του πετρελαίου σε άλλο σημείο της παραλίας ή επιφανειακή κατεργασία του εδάφους και ανάμιξη πετρελαίου με αποτέλεσμα τη διείσδυση του βαθιά στα ιζήματα των ακτών. Με τον τρόπο αυτό το ρυπασμένο ίζημα διασπείρεται και επιταχύνεται η φυσική αποκατάσταση του.

Επί τόπου καύση: Για την εφαρμογή της επί τόπου καύσης πρέπει το πετρέλαιο να βρίσκεται πάνω σε καύσιμο υπόστρωμα όπως βλάστηση, συντρίμμια. Η μέθοδος αυτή προκαλεί σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφή της βλάστησης καθώς και της βιοποικιλότητας.

Μηχανική απομάκρυνση: Με τη βοήθεια μηχανικού εξοπλισμού, συλλέγεται το πετρέλαιο, και η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τη αφαίρεση μικρής ποσότητας. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή δεν είναι ενδεικτική για καθαρισμό σε ευαίσθητες περιοχές ή σε περιοχές με διάβρωση (Response & Division 1994).

1.4.3 Χημικές μέθοδοι

Χρησιμοποιούνται ως πρώτη επιλογή αντιμετώπισης από πολλές χώρες και ιδιαίτερα οι χημικές ενώσεις διασποράς. Οι διάφορες χημικές μέθοδοι αναλύονται πιο κάτω:

- Χημικές ενώσεις διασποράς: Είναι παράγοντες διασποράς που διαθέτουν επιφανειοδραστικά ενεργές ουσίες οι οποίες αφαιρούν το πετρέλαιο από την επιφάνεια ύδατος και το διασπείρουν στην υδάτινη στήλη πριν καταφέρει να ρυπαίνει την ακτή. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτή η διάλυση του πετρελαίου σε κατώτατες συγκεντρώσεις και επιταχύνεται η βιοαποικοδόμηση του.
- Απογαλοκτωματοποιητής: Μετατρέπει το πετρέλαιο σε γαλάκτωμα με αποτέλεσμα να ενισχύεται η φυσική διασπορά και έπειτα η βιοαποικοδόμηση του.
- Στερεοποιητής: Χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες που επιταχύνουν τον πολυμερισμό του πετρελαίου ούτως ώστε να προσφέρουν σταθερότητα στο πετρέλαιο για να μειώσουν τη διάδοση και να αυξήσουν τη φυσική αποκατάσταση του.
- Χημικές ενώσεις λεπτών υμένων: οι παράγοντες που σχηματίζουν υμένια αποτρέπουν την προσκόλληση του πετρελαίου στα υποστρώματα των ακτών και με έκπλυση με πίεση πραγματοποιείται αφαίρεση του πετρελαίου που παραμένει στις επιφάνειες (Response & Division 1994).

1.4.4 Η τεχνική της βιοεξυγίανσης ως μέθοδος αντιμετώπισης

Η βιοεξυγίανση μετά από την επιτυχή εφαρμογή της στο ατύχημα του Exxon Valdez το 1989 αποτελεί πλέον το επόμενο στάδιο επεξεργασίας για τον καθαρισμό του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον (Zhu et al. 2004). Η βιοεξυγίανση ορίζεται ως « η ενέργεια προσθήκης υλικών στα ρυπασμένα περιβάλλοντα ούτως ώστε να προκληθεί επιτάχυνση των φυσικών διαδικασιών βιοαποικοδόμησης » (Oil & May 1991). Η τεχνική αυτή βασίζεται στο ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πετρελαίου βιοαποικοδομείται. Η διατήρηση των συνθηκών που ευνοούν τους ρυθμούς ενισχυμένης βιοαποικοδόμησης, οδηγεί στην επιτυχία της βιοεξυγίανσης. Οι δύο κύριες προσεγγίσεις στη βιοεξυγίανση των πετρελαιοκηλίδων είναι οι εξής:

- Βιοενίσχυση (bioaugmentation): Προστίθενται βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν το πετρέλαιο με σκοπό την ενίσχυση του υπάρχον μικροβιακού πληθυσμού. η αύξηση της μικροβιακής κοινότητας, επιταχύνει το ρυθμό βιοδιάσπασης.
- Βιοδιέγερση (biostimulation): Με την προσθήκη διάφορων θρεπτικών συστατικών όπως άζωτο, φωσφόρος, άνθρακας καθώς και με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών όπως για παράδειγμα προσθήκη οξυγόνου από την ανάπτυξη των φυτών, οι μικροβιακοί αποικοδομητές του πετρελαίου, αναπτύσσονται.

Σύμφωνα με μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η βιοδιέγερση είναι αποτελεσματικότερη για το λόγο ότι η προσθήκη μικροοργανισμών δεν θα ενισχύσει τη διάσπαση του πετρελαίου σε μεγαλύτερο βαθμό από την απλή προσθήκη θρεπτικών (Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L, King, D.W., and Holder 1996). Η τεχνική της βιοεξυγίανσης παρότι είναι μια οικονομική μέθοδος είναι και φιλική προς το περιβάλλον εφόσον το πετρέλαιο αποικοδομείται σε ανόργανα προϊόντα όπως διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Επιπλέον είναι μια φυσική διεργασία, η οποία γίνεται ευκολότερα αποδεκτή από την κοινωνία και η εφαρμογή της πραγματοποιείται επιτόπου χωρίς τη μετακίνηση του ρύπου. Τα μειονεκτήματα της είναι ότι αρχικά αποτελεί μια πολύ αργή διαδικασία που χρειάζεται εβδομάδες έως μήνες να εφαρμοστεί, και δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοιχτή θάλασσα λόγω μεγάλης διάχυσης (Swannell et al. 1996).

1.5 Εισαγωγή πετρελαίου στο περιβάλλον-Συμπεριφορά-Διεργασίες

1.5.1 Διεργασίες γήρανσης

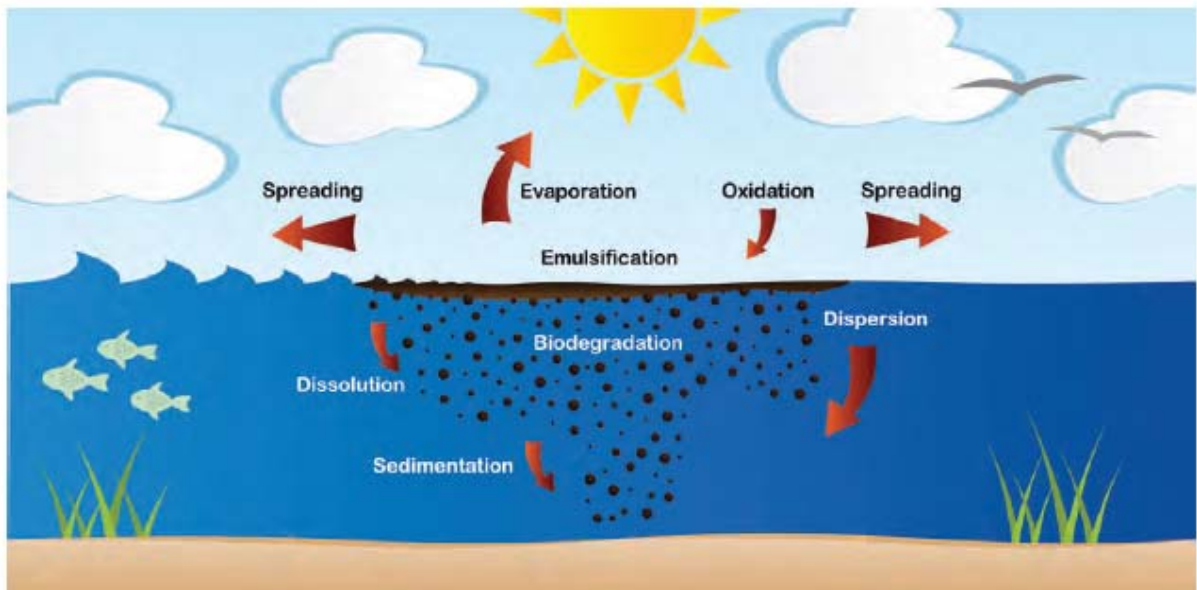
Καθώς το πετρέλαιο εισάγεται στο περιβάλλον, βιώνει διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές αλλαγές, τις λεγόμενες διεργασίες γήρανσης. Οι διεργασίες αυτές αλλάζουν τη σύνθεση του πετρελαίου καθώς επίσης και τις ιδιότητες του με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι τεχνικές αντιμετώπισης των πετρελαιοκηλίδων. Οι διεργασίες γήρανσης περιγράφονται πιο κάτω και απεικονίζονται επίσης στην εικόνα 5.

1. Εξάπλωση (spreading): Το πετρέλαιο, μετά την εισαγωγή του στη θάλασσα, αρχίζει να εξαπλώνεται λόγω της επίδρασης του ανέμου και των κυμάτων. Οι παράγοντες

από τους οποίους εξαρτάται η εξάπλωση μιας πετρελαιοκηλίδας είναι το ιξώδες, η θερμοκρασία, η τριβή, και τα θαλάσσια ρεύματα.

2. Εξάτμιση (evaporation): Σε χρονικό διάστημα 24 ωρών από τη στιγμή της διαρροής, εξατμίζονται τα ελαφριά συστατικά του πετρελαίου. Συγκεκριμένα, τα αλκάνια που είναι μικρότερα από C15 και οι πτητικές οργανικές ενώσεις όπως το βενζόλιο και συστατικά που έχουν σημείο βρασμού μικρότερο από 200°C.
3. Διάλυση (dissolution): Η διάλυση είναι μια διεργασία δευτερεύουσας σημασίας εφόσον τα συστατικά του πετρελαίου δύσκολα διαλύονται στο θαλασσινό νερό. Τα συστατικά τα οποία διαλύονται, διαφεύγουν μέσω της εξάτμισης. Ακόμη όσο η ποσότητα άλατος αυξάνεται η διεργασία της διάλυσης μειώνεται.
4. Διασπορά (dispersion): Στην επιφάνεια της θάλασσας επικρατεί ισχυρός κυματισμός με τον οποίο η κηλίδα διασπάται σε σταγονίδια διαφόρων μεγεθών. Έτσι, αυξάνεται η επιφάνεια του πετρελαίου ώστε να επιταχύνονται οι διεργασίες διαλυτοποίησης, ιζηματοποίησης, και βιοαποικοδόμησης που οδηγούν στην αύξηση του ρυθμού αποκατάστασης του πετρελαίου. Η διασπορά εξαρτάται από τις συνθήκες περιβάλλοντος, τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου και από το ιξώδες.
5. Γαλακτωματοποίηση (emulsification): Λόγω της επίδρασης των κυμάτων, το πετρέλαιο υπόκειται σε ανάδευση με αποτέλεσμα σταγονίδια θαλασσινού νερού να παραμένουν εντός της οργανικής φάσης. Τα γαλακτώματα που σχηματίζονται, εμποδίζουν τις διαδικασίες καθαρισμού του πετρελαίου καθώς επίσης και οι φυσικές διαδικασίες αποκατάστασης μειώνονται.
6. Φώτο-Οξειδωση (photo-oxidation): Με την παρουσία οξυγόνου, η ηλιακή ακτινοβολία έχει την ικανότητα να μετασχηματίσει διάφορες σύνθετες ενώσεις του πετρελαίου σε απλούστερες. Η διεργασία της οξειδωσης αυξάνει τη διαλυτότητα του πετρελαίου στο νερό λόγω των πολικών ενώσεων που σχηματίζονται (κετόνες, αλδεΐδες).
7. Κατακρήμνιση/Καταβύθιση (sedimentation/sinking): Όταν οι πιο πάνω διεργασίες πραγματοποιηθούν σε καθαρό ή ελαφρά αλμυρό νερό, μετά από την επίδραση τους, παρατηρείται βύθιση της πετρελαιοκηλίδας. Όταν οι διεργασίες διεξάγονται σε θαλασσινό νερό, η πετρελαιοκηλίδα βυθίζεται μόνο με την προσκόλληση διαφόρων σωματιδίων στην επιφάνεια της (αύξηση του βάρους της) λόγω της μεγάλης πυκνότητας του θαλασσινού νερού.

8. Βιοδιάσπαση ή βιοαποικοδόμηση (biodegradation): Στο θαλάσσιο περιβάλλον υπάρχουν διάφοροι μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διασπών συγκεκριμένα συστατικά του αργού πετρελαίου, παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι βακτήρια, ζύμες, μύκητες, φύκη και πρωτόζωα. Ο τύπος του πετρελαίου, η θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο αποτελούν σημαντικοί παράγοντες για το ρυθμό αποικοδόμησης (ITOPF 2011).



Εικόνα 5: Διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη γήρανση (ITOPF 2011)

1.5.2 Βιοαποικοδόμηση πετρελαίου

Η βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου αποτελεί την πιο σημαντική διεργασία για την απομάκρυνση της πετρελαιοκηλίδας και την επακόλουθη αποκατάσταση του περιβάλλοντος. Είναι δηλαδή η διάσπαση των οργανικών μορίων σε μικρότερα με τη δράση των μικροοργανισμών.

1.5.2.1 Μηχανισμοί βιοαποικοδόμησης πετρελαίου

Στα διάφορα συστατικά του πετρελαίου, περιέχεται και ο άνθρακας τον οποίο οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη τους. Έτσι μέσω της μεταβολικής δραστηριότητάς τους, πραγματοποιείται και η διεργασία της βιοαποικοδόμησης.

Τα βακτήρια και οι μύκητες είναι οι πιο σημαντικές κατηγορίες μικροοργανισμών με τη δυνατότητα διάσπασης υδρογονανθράκων.

Ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης αρχικά ξεκινά με τη διάσπαση των απλούστερων υδρογονανθράκων, οι οποίοι διασπώνται εύκολα σε αντίθεση με τους σύνθετους υδρογονάνθρακες, οι οποίοι απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν ούτως ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή των κατάλληλων ενζύμων για τη διάσπαση των σύνθετων ενώσεων. Επιπρόσθετα, αξίζει ιδιαίτερης αναφοράς ότι κανένα βακτήριο από μόνο του δεν είναι ικανό να διασπάσει όλα τα συστατικά του πετρελαίου αλλά χρειάζονται συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση. Με αυτό τον τρόπο μια ομάδα μικροοργανισμών διασπά τις πιο σύνθετες ενώσεις σε απλούστερες ή μετατρέπει τις τοξικές ουσίες σε μη τοξικές ή λιγότερο τοξικές και ακολούθως μια άλλη ομάδα μικροοργανισμών τις διασπά σε απλούστερες. Η διαδικασία αυτή είναι λειτουργική σε ικανοποιητικές ποσότητες οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων μέσα στο νερό. Με το πέρας της διαδικασίας οι σύνθετες καθώς και επικίνδυνες ουσίες (μερικές) του πετρελαίου έχουν μετατραπεί σε CO₂, H₂O κ.α (Νικολοπούλου 2005).

1.5.2.2 Βιοαποικοδόμηση συστατικών πετρελαίου

Αναμφίβολα, όσο περισσότεροι δεσμοί και διακλαδώσεις υπάρχουν στα συστατικά του πετρελαίου, με δυσκολία οι μικροοργανισμοί μπορούν να τα διασπάσουν σε αντίθεση με τα πιο ελαφρά συστατικά. Στην περίπτωση της ναφθαλίνης και σε αρωματικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όμως δεν ισχύει γιατί οξειδώνονται από αρκετά κορεσμένα συστατικά. Η σειρά διάσπασης των συστατικών από το πιο εύκολα στο πιο δύσκολα αποικοδομήσιμο είναι n-αλκάνια, διακλαδισμένα αλκάνια, μικρού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις και τα πιο δύσκολα να διασπαστούν είναι τα κυκλικά αλκάνια. Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός βιοδιάσπασης των κορεσμένων υδρογονανθράκων είναι η τελική οξείδωση τους σε αλκοόλη, αλδεύδη ή κάποιο λιπαρό οξύ, ενώ των αρωματικών είναι ο σχηματισμός μιας διόλης ακολούθως η διάσπαση του δακτυλίου και τέλος ο σχηματισμός ενός καρβοξυλικού οξέος.

Οι διαδικασίες συµµεταβολισµού, αποτελούν επίσης σηµαντικό ρόλο στη διάσπαση των συστατικών του πετρελαίου. Δηλαδή, η αποικοδόμηση μιας ένωσης εξαρτάται από την

παρουσία μιας άλλης ένωσης. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι για διαφορετικά είδη πετρελαίου ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης διαφέρει σε μεγάλο βαθμό ακόμα και για τα ίδια τα συστατικά (Νικολοπούλου 2005).

1.5.2.3 Παράγοντες που επιδρούν στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου

Υπάρχουν αρκετοί παράμετροι, οι οποίοι πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη γιατί υπάρχει δυνατότητα να προκαλέσουν σοβαρές επιπτώσεις στη διαδικασία της βιοεξυγίανσης. Οι σημαντικότεροι παράγοντες είναι οι διεργασίες γήρανσης, η θερμοκρασία, το οξυγόνο, η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών, η αλατότητα, η πίεση και το pH.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά αρχικά τις διεργασίες γήρανσης μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου. Για παράδειγμα η διεργασία της εξάτμισης απομακρύνει τα τοξικά συστατικά του πετρελαίου όπως βενζόλιο και n-αλκανίων με αποτέλεσμα να ευνοούνται οι μικροοργανισμοί καθώς και η επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης. Αντίθετα η διεργασία της γαλακτωματοποίησης αναστέλλει την αποδόμηση αφού μειώνει την διεπιφάνεια ύδατος και πετρελαίου στην οποία δρουν οι μικροοργανισμοί.

Επίσης η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει τη δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας καθώς και τα χαρακτηριστικά του πετρελαίου. Όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι χαμηλή, αυξάνεται το ιξώδες του πετρελαίου και μειώνεται εξάτμιση των τοξικότερων υδρογονανθράκων μικρού μοριακού βάρους με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η βιοαποικοδόμηση. Γενικά σε εύρος θερμοκρασίας από 15 έως 20 °C κυριαρχούν οι υψηλότεροι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Η παρουσία οξυγόνου και γενικά οι αερόβιες συνθήκες είναι απαραίτητες για την αποδόμηση του πετρελαίου στο περιβάλλον, εφόσον οι οξυγενάσες αποτελούν τα σημαντικότερα μονοπάτια διάσπασης τόσο των κορεσμένων όσο και των αρωματικών υδρογονανθράκων. Στα κατώτερα στρώματα της θάλασσας το οξυγόνο περιορίζεται σε αντίθεση με τα ανώτερα επίπεδα και την επιφάνεια των ακτών. Τέλος, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου εξαρτάται από τη ροή του νερού, τη δράση του κύματος, το ποσοστό των διαθέσιμων υποστρωμάτων και τη φυσική κατάσταση του πετρελαίου.

Στα βαθιά ωκεανικά περιβάλλοντα η πίεση είναι ιδιαίτερα αυξημένη με αποτέλεσμα το πετρέλαιο που καταλήγει στο βάθος της θάλασσας να διασπάται με πολύ αργούς ρυθμούς από τον μικροβιακό πληθυσμό και έτσι να παραμένει στο βυθό για δεκαετίες.

Το επίπεδο της αλατότητας αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που περιορίζει την βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων μέσω των μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, έχουν βέλτιστη αλατότητα ανάπτυξης από 2.5 έως 3.5% και αυξάνονται ελάχιστα ή και καθόλου σε αλατότητα 1.5 με 2%. Σε μέγιστες συγκεντρώσεις αλατότητας ο ρυθμός μεταβολισμού των υδρογονανθράκων μειώνεται εφόσον η μικροβιακή κοινότητα δεν βρίσκεται στη βέλτιστη δυνατή ανάπτυξη.

Το θαλασσινό νερό έχει γενικά ένα ελαφρώς αλκαλικό pH ενώ τα βακτήρια και οι μύκητες αναπτύσσονται σε ουδέτερο pH με τους μύκητες να είναι πιο ανθεκτικοί σε όξινα περιβάλλοντα. Όσο αυξάνεται το pH, αυξάνεται και η αποικοδόμηση του πετρελαίου. Η βέλτιστη όμως βιοαποικοδόμηση εμφανίζεται σε ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες (Leahy & Colwell 1990).

1.5.2.4 Εφαρμογή βιοδεικτών (Biomarkers) και εκτίμηση του βαθμού βιοαποικοδόμησης

Οι διεργασίες γήρανσης έχουν την ικανότητα να μεταβάλουν τις συγκεντρώσεις των συστατικών του πετρελαίου όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Έτσι, οι περιοχές οι οποίες είναι ρυπασμένες με πετρέλαιο χαρακτηρίζονται ως ετερογενείς ως προς τη συγκέντρωση των συστατικών του πετρελαίου. Αυτό έχει ως συνέπεια η αξιολόγηση της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου να αποτελεί έναν πολύ δύσκολο στόχο.

Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται βιοδείκτες, οι οποίοι είναι μη-βιοδιασπώμενα ή αργά βιοδιασπώμενα συστατικά του πετρελαίου ούτως ώστε να εξομαλύνουν την μεταβλητότητα των συγκεντρώσεων των υπόλοιπων συστατικών του πετρελαίου. Η χρησιμότητά τους είναι πολύ σημαντική ιδιαίτερα σε πειραματικό επίπεδο επειδή ορίζουν ότι η διάσπαση των συστατικών του πετρελαίου οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση. Η εκτίμηση του βαθμού βιοαποικοδόμησης πραγματοποιείται μέσω των συγκεντρώσεων των υδρογονανθράκων που αποτελούν στόχο προς τη συγκέντρωση του βιοδείκτη, η οποία είναι σταθερή.

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες βιοδεικτών οι οποίες είναι τα ισοπρενοειδή (πριστάνιο και φυτάνιο), τα στεράνια και τα χοπανοειδή. Ο πιο συνηθισμένος βιοδείκτης που χρησιμοποιείται είναι το χοπάνιο λόγω του έχει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στη βιοαποδόμηση. Τέλος η χρήση του θα πρέπει να γίνεται με προσοχή όταν το πετρέλαιο που χρησιμοποιείται δεν έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τις διεργασίες γήρανσης (ΒΗΘΛΕΕΜ 2009).

1.6 *Posidonia oceanica*

Η *P.oceanica* αποτελεί το κυρίαρχο ενδημικό είδος της θαλάσσιας βλάστησης στη Μεσόγειο θάλασσα. Καλύπτει περιοχές μεγάλης κλίμακας και επεκτείνεται σε βάθος από πέντε μέχρι εξήντα μέτρα. Ανήκει στο βασίλειο Plantae, στο φύλο Tracheophyta, στην οικογένεια Posidoniaceae και στο γένος Ποσειδώνια. Τα Ποσειδώνια έχουν διάρκεια ζωής 4-30 ετών, υψηλή βιομάζα αλλά πολύ χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης. Τα ριζώματα της Ποσειδώνιας ζουν για αρκετές δεκαετίες καθώς και οι κλώνοι της για αιώνες. Ένας 15 μέτρα κλώνος της *P.oceanica* χρειάζεται 350 χρόνια για να αναπτυχθεί (Larkum; Anthony; Orth; Robert J.; Duarte; Carlos 2006).

Είναι αναμφισβήτητο ότι η *P.oceanica* κατατάσσεται στα πιο πολύτιμα θαλάσσια οικοσυστήματα στη γη. Η κλιματική αλλαγή λόγω της ανθρωπογενούς δραστηριότητας στη θάλασσα για την εξόρυξη φυσικών πόρων, αστική ανάπτυξη, εισβολή ξένων ουσιών στη θάλασσα μεταξύ και άλλων έχουν επιφέρει τη μείωση των θαλάσσιων λιβαδιών με αυξανόμενους ρυθμούς. Για τον λόγο αυτό η *P.oceanica* τα τελευταία 20 χρόνια έχει γίνει ένας από τους κύριους στόχους προστασίας και διαχείρισης στη Μεσόγειο θάλασσα και σύμφωνα με τη σύμβαση της Βαρκελώνης (πρωτόκολλο για ειδικά προστατευόμενες περιοχές και τη βιοποικιλότητα στη Μεσόγειο) περιέχεται ένα ειδικό σχέδιο δράσης για την προστασία της Ποσειδώνιας (Telesca et al. 2015).

1.7 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για βιοδιάσπαση υδρογονανθράκων

Μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση 15 άρθρων για βιοδιάσπαση υδρογονανθράκων, στον πίνακα 1 παρουσιάζεται η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, το είδος των μικροοργανισμών, το είδος του υδρογονάνθρακα που χρησιμοποιήθηκε καθώς και τα αποτελέσματα της κάθε διαδικασίας.

Πίνακας 1: Βιβλιογραφική ανασκόπηση

TYPE OF PAHs	COUNTRY	MICROORGANISM TESTED	METHOD/INSTRUMENT USED/ CONDITIONS	RESULTS	BIBLIOGRAPHY
Crude oil in saline waste waters	South western Iranian fields	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> . It is a microorganism with rapid growth and the ability to remove a vast range of pollutants. <i>P. chrysosporium</i> can produce all the three ligninolytic enzymes in special conditions	Infrared spectrophotometry for all oils and greases at 2930 cm ⁻¹ f-test for significant level surfactants, Tween 20 and NAR- 111-2	At a salinity of 30 and 40 g/l, the activity of MnP enzyme showed reduction 99,9%. The biomass was not significantly different at 95% level of significance in all salinities Tween80 and NAR- 111-2 were used as surfactant to enhance availability and	(Behnood et al. 2013)

				<p>biodegradation of crude oil. The maximum removal efficiency after 12 days for the contamination of 600 ppm in the presence of Tween80 at salinities of 0, 20, and 40 g/l respectively equals 63.3%, 64.8%, and 38.7%. The respective values were 82.8%, 75.5%, and 40.3% in the presence of NAR-111-2.</p>	
--	--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Crude oil	Chania, Greece	Effects of lipophilic Fertilizers of natural origin	most probable number (MPN) GC/MS, Selected Ion Monitoring (SIM)	The microbial mass increased from 3.65 to 1.9×10^4 MPN/ml in first 7 days and 8.3×10^5 by day 18. the GC/MS showed that lipophilic nutrients enhance the biodegradation of crude oil. Final removal of C19-C34 n-alkanes was 83%.	(Nikolopoulou & Kalogerakis 2008a)
Soil contaminated with crude oil	Adana, Batman and Adiyaman, Turkey	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Paucimonas lemoignei</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,	Gas chromatography. Spectrophotometric at 620 nm	In raw petroleum medium, 6 bacteria strains that exhibited	(Esin Eraydin Erdoğan 2012)

		<p><i>Escherichia</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacterkoseri</i>,</p> <p><i>Acinetobacter</i> spp., <i>Aeromonas caviae</i>,</p> <p><i>Sphingobacteriummultivorum</i>,</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p> <p><i>Pseudomons aeruginosa</i>,</p> <p><i>Pseudomonas putidabiotype A</i>,</p> <p><i>Citrobacte ramalonaticus</i></p> <p>And <i>Acinetobacter</i></p>		<p>best development processes and had the highest levels of petroleum degradation were determined</p> <p>(<i>P.aeruginosa</i>, <i>P. putida biotype A</i>, <i>C.amalonaticus-GC subgroup A</i>, <i>A.genomospecies</i>).</p>	
<p>natural sandy soil contaminated with weathered crude oil</p>	<p>Onoufrios beach (Chania, Greece)</p>	<p>Nutrients and rhamnolipids</p>	<p>gas chromatography/mass spectrometry.</p> <p>T-RFLP analysis</p>	<p>NPK (inorganic nutrients) and ULR (rhamnolipid) treatments were more effective in terms of hydrocarbon degradation; about 48% and 58%of n-</p>	<p>(Nikolopoulou et al. 2013)</p>

				<p>alkanes were removed after 15 days of the experimental period and 97% and 99% in 30 days. The addition of nutrients to contaminated beach sand significantly enhanced the activity of indigenous microorganisms, as well as the removal of total recoverable petroleum hydrocarbons (TRPH) over a 45-day study period.</p> <p>In control treatments, T-RF richness and</p>	
--	--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

				diversity declined from 25 operational taxonomic units (OTUs) to 19 OTUs recorded at the end of the experiment. In NPK treatments, T-RF diversity varied between 23 and 26. In ULR treatments T-RF richness varied between 24 OTUs (day 0 and 15) and 22 OTUs on day 45.	
Naphthalene, anthracene	Orman Garden, WadiDegla Protectorate and	<i>Aspergillus terreus</i> was superior in ligninolytic enzyme production	he residual level of PAH was determined by HPLC every week for four weeks. Monitored at 254 nm, the mobile phase was set to 45	<i>A. terreus</i> showed a higher activity (98.5%) in degrading	(Mohamed I. A. Ali 2012)

	benzene station soils		min linear gradient of methanol–water (from 40:60 to 80:20 [v/v]) for both separation and analysis of metabolites	naphthalene which possesses two aromatic rings than anthracene (91.0%) comprising three aromatic rings.	
Crude oil	Athens (Greece).	The bacterial consortia used came from sludge from a refinery wastewater treatment facility in Athens (Greece).	liquid–liquid extraction IR spectra were obtained by FT-IR on a Perkin Elmer Spectrum	87.6% extraction efficiency. Relatively high removal of TPH was obtained after a short period of SBR operation indicating the effectiveness of the consortia. Nevertheless, the addition of a supplementary medium containing	(Ruiz et al. 2006)

				glucose or sucrose after the depletion of crude oil, as well as an increase of the temperature to 30 _C may enhance the process.	
c.oil	Chania Greece	Lipophilic fertilizers with biosurfactants and molasses	most probable number(MPN) method for hydrocarbon Degraders. GC/MS instrument.	Microbial mass increased from 2.4x10 to 1.4x10 ⁶ MPN/mL that lipophilic nutrients combined with biosurfactants work very well and enhance the biodegradation of crude oil. The apparent reduction in	(Nikolopoulou & Kalogerakis 2008)

				<p>petroleum hydrocarbons that was achieved with the formulation ULR (uric acid–lecithin–rhamnolipids) and ULRM (uric acid–lecithin–rhamnolipids–molasses) over a period of 18 days is even higher and very encouraging (with final removal of C19–C34 <i>n</i>-alkanes by 96% and 87%, respectively) compared to the UL (uric acid–lecithin) formulation that was</p>	
--	--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

					distinguished among others with a final removal of C19–C34 <i>n</i> -alkanes by 83%	
Crude oil contaminated saline soils	Bhavnagarcoast, Gujarat, India	Achromobacter xylooxidans, a chrysene degrading marine halotolerant Gram negative bacterium, isolated from crude oil polluted Saline sites	Gas Chromatograph–Mass Spectrometer (GC–MS).	Achromobacter xylooxidans, a marine halotolerant bacterium was successfully employed for bioremediation of LMW and HMWPAHs in a cost effective microcosm system constructed in the laboratory. Addition of glucose, Triton X-	(Dave et al. 2014)	

				100 and b-cyclo dextrin in presence of chrysene resulted in enhanced biodegradation of LMW and HMW PAHs up to six rings. Thus, the isolate can efficiently be used for future in situ applications for remediation of PAHs impacted soils.	
dieselfuelhydrocarbons	Red Sea Coast of Saudi Arabia.	Alternaria alternata, Aspergillus terreus, Cladosporium sphaerospermum, Eupenicillium hirayamae and Paecilomyces variotii.	PerkinElmer Mass Spectrometer with a HP-5MS column	Five fungal isolates mentioned above displayed rapid diesel degradation ability, and when used together as a	(Ameen et al. 2015)

				<p>consortium,there was a synergistic effect that enhanced the degradationprocess.</p> <p>Also, Cladosporium strongly degraded diesel with a degradation ration of up to 34% after 5 day treatment.</p>	
<p>Crude petroleum-oil contaminated soil sample was collected from Oil and Natural Gas Commission of India (ONGC) oil Weld, Assam.</p>	<p>petroleum contaminated soil sample from North-East India</p>	<p><i>Bacillus subtilis</i>DM-04 and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>M</p>	<p>The alkane fraction was analyzed by gas chromatography(GC) using a FID detector (Varian Saturn 3800).</p>	<p>Bioaugmentation of TPH contaminated microcosm with <i>P. aeruginosa</i>M and NM consortia and <i>B. subtilis</i>strain showed a significant reduction of TPH levels in treated soil as compared to</p>	<p>(Das & Mukherjee 2007)</p>

				<p>control soil at the end of experiment (120 d). <i>P. aeruginosa</i> strains were more efficient than <i>B. subtilis</i> strain in reducing the TPH content from the medium. The plate count technique indicated expressive growth and biosurfactant production by exogenously seeded bacteria in crude petroleum-oil rich soil. The results showed that <i>B. subtilis</i> DM-04 and <i>P.</i></p>	
--	--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

				<i>aeruginosa</i> and NM strains could be effective for in situ bioremediation.	
Crude oil	Persian Gulf and the Caspian Sea	Acinetobacter, Pseudomonas, Rhodococcus, Halomonas, Marinobacter and Microbacterium Gordonia, Cobetia, Alcanivorax,	Hydrocarbons were analyzed using high-resolution GC-MS. Total DNA of the bacterial strains was extracted using the CTAB method	crude-oil-degrading bacteria from marine environments in Iran have a high level of diversity and variable biodegradation abilities. BS, PG-12 and PG3 degraded almost all n-alkanes in the c.oil. CS-2, PG-26 and PG-24 have low n-alkane degradation abilities.	(Hassanshahian et al. 2012)
crude oil	oil samples collected from two automobile	Mycotyphamicrospora, Penicilliumitalicum,	OD at 540 nm	The active crude oil utilizing fungi in this	(Ekundayo et al. 2012)

	workshops in Akure, Nigeria	Botryiscinerea, Gliocladium deliquescence, Verticillium albo-atrum and Aspergillus niger Neurosporacrassa, A. parasiticus, A. niger and Gonatobotryum apiculatum		study were <i>A. niger</i> (both harvested and non harvested cells) and <i>G. deliquescence</i> (non-harvested cells) and <i>P. italicum</i> (harvested cells). <i>A. niger</i> has best degrading ability than other fungi in non harvested and harvested cell condition.	
diesel, unspent and spent engine oils, kerosene, crude oil and Detarium senegalense seed oil	Detarium senegalense seeds used for this investigation were collected from the local Oyingbo market in the Lagos area of Nigeria.	Aspergillus flavus, A. niger, Mucor, Rhizopus, and Talaromyces	The turbidity was measured using the photoelectric colorimeter.	Aspergillus niger had the highest growth rates on the 10th and 30th days with optical densities 4.0 and 3.75 respectively. There was a marked	(Adekunle & Adebambo 2007)

				<p>decrease in the growth rates of <i>Aspergillusniger</i> and <i>Rhizopus</i> on the 15th, 25th and 35th days respectively i.e. every 10 days.</p> <p><i>Talaromyces</i>, earlier observed to be a slow grower when cultured on agar plates had its maximum growth peak on the 30th day at an optical density of 0.5. On the 40th day, <i>Aspergillusniger</i> had the highest growth peak at 1.9, followed by <i>Rhizopus</i> at an</p>	
--	--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

				optical density of 0.275 which was closely followed by Talaromyces at an optical density of 0.245.	
Kerosene and diesel	Anand, Gujarat, India	P. decumbens PDX7, P. janthinellum SDX7, and A. terreus PKX4	gas chromatography with flame ionized detector (GC-FID, Perkin Elmer-Auto System)	P. decumbens PDX7 showed the highest degradation of aliphatic hydrocarbons and aromatic hydrocarbons up to 97% and 90%, followed by 94% and 85% by P. janthinellum SDX7 and 84% and 70% for A. terreus PKX4 in kerosene	(Khan et al. 2015)

				diesel showed the highest degradation of aliphatic hydrocarbons and aromatic hydrocarbons, up to 80% and 67% by <i>P. decumbens</i> PDX7, 76% and 64% by <i>P. janthinellum</i> SDX7, and 71% and 60% by <i>A. terreus</i> PKX4	
--	--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

<p>pyrene and benzo[a]pyrene</p>	<p>Benzo[a]pyrene (96%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), pyrene (98%) was purchased from Acros (New Jersey, USA)</p>	<p>filamentous fungi</p>	<p>gas chromatography using a mass selective detector operating in single ion monitoring mode</p>	<p><i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBMAI 849 for being able to degrade 85% of pyrene and 61% of benzo[a]pyrene after 4 and 8 days, respectively, and the fungus <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847 for being able to degrade 44% of benzo[a]pyrene after 8 days.</p>	<p>(Taylor & Cunliffe 2015)</p>
----------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

Με βάση τη πιο πάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση επιλέχθηκε η μέθοδος ανάλυσης των δειγμάτων με τη διαδικασία του αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μάζας όπως πραγματοποιήθηκε σχεδόν σε όλες τις δημοσιεύσεις. Για την επεξεργασία των δειγμάτων με το GC-MS, προηγουμένως στα δείγματα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής-υγρής εκχύλισης για την εξαγωγή του αργού πετρελαίου και στη συνέχεια η μέθοδος της στερεής εκχύλισης ούτως ώστε να διαχωριστούν οι κορεσμένοι από τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναλύεται λεπτομερώς στη συνέχεια.

1.8 Στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, στόχοι της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι:

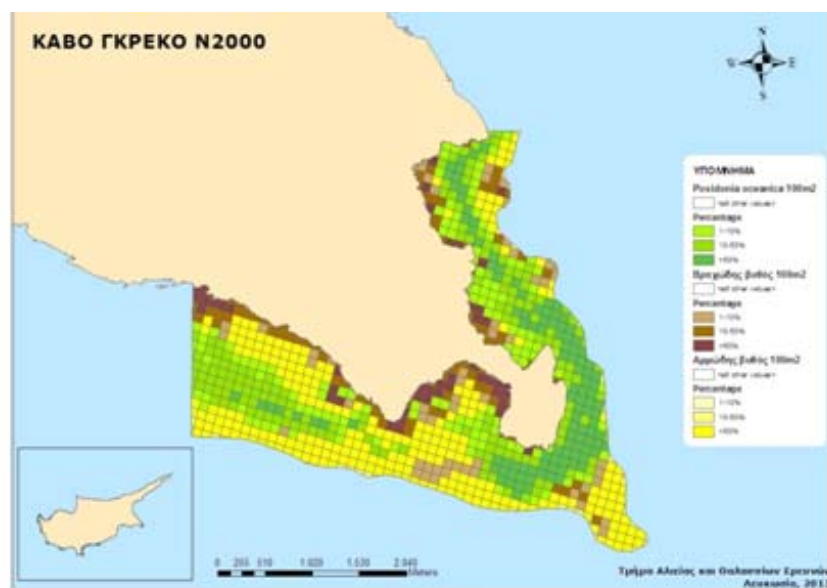
- Η απομόνωση των μικροοργανισμών από φυλλώδη ιστό και νεκρό φυλλώδη ιστό (matte) του φυτού *P. oceanica*.
- Η διερεύνηση της ικανότητας βιοαποικοδόμησης διαφορετικών κλασμάτων αργού πετρελαίου (κορεσμένοι και αρωματικοί υδρογονάνθρακες) των απομονωθέντων μικροοργανισμών με την ταυτοποίηση, 29 διαφορετικών υδρογονανθράκων.

Οι πιο πάνω στόχοι της εργασίας επιλύονται με βάση τη μεθοδολογία που περιγράφεται ακολούθως.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Περιοχή μελέτης

Τα δείγματα της *Posidonia oceanica*, συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές της Κύπρου: από το Κάβο Γκρέκο, και από το παλιό λιμάνι της Λεμεσού. Στην εικόνα 6 φαίνονται οι περιοχές μελέτης ενώ στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι πληροφορίες όσο αφορά τις συντεταγμένες από κάθε σημείο της δειγματοληψίας. Μετά τη διαδικασία συλλογής, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες και τοποθετήθηκαν σε παγωνιέρα μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.



Εικόνα 6: Περιοχές δειγματοληψίας

Πίνακας 2: Πληροφορίες δειγματοληψίας

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Συντεταγμένες
Κάβο Γκρέκο	17/06/2015	1. 34° 57.401'N - 34° 05.208'E 2. 34° 57.761'N - 34° 05.282'E 3. 34° 58.074'N - 34° 04.926'E
Παλιό λιμάνι Λεμεσού	15/07/2015	1. 34° 41.150'N - 33° 05.114'E 2. 34° 41.139'N - 33° 05.114'E 3. 34° 41.163'N - 33° 05.030'E

2.2 Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το φυτό *Posidonia oceanica*

Αρχικά πραγματοποιείται η αποστείρωση του απαγωγού στρωτής ροής αέρα με υπεριώδη ακτινοβολία, 15 λεπτά πριν τη χρήση του. Πέντε γραμμάρια κόβονται από το κάθε μέρος του φυτού, δηλαδή από το ρίζωμα, τη ρίζα, τα φύλλα και το matte με τη βοήθεια αποστειρωμένου ψαλιδιού και λαβίδας. Τα 5g τοποθετούνται σε ποτήρια ζέσεως (εικόνα 7). Στα ποτήρια μεταφέρονται 100 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού και 20 μ L Tween®20. Τα ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται σε συσκευή ανακίνησης στις 200 στροφές (rpm) για 30 λεπτά (εικόνα 8). Αφού τελειώσει η συσκευή ανακίνησης, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό από το ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται σε 2 φιαλίδια των 50 mL, έτσι

ώστε σε αυτά να περιέχεται ο ίδιος όγκος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μέρος του φυτού ξεχωριστά. Ακολούθως, τα φιαλίδια εγκαθίστανται στη φυγόκεντρο σε 7000 στροφές για 7 λεπτά. Αμέσως μετά, αφαιρείται λίγο υγρό από τα φιαλίδια αλλά όχι το ίζημα (pellet) που βρίσκεται στον πυθμένα ούτως ώστε να έχουν τελικό όγκο 5 mL το καθένα. Στη συνέχεια αναμιγνύονται για να δημιουργηθεί το πυκνό διάλυμα μικροοργανισμών/κοινότητα μικροοργανισμών (consortium).



(Α)



(Β)



(Γ)



(Δ)

Εικόνα 7: Τα 4 μέρη του φυτού *Posidonia Oceanica* φύλλα (Α), matte (Β), ρίζωμα (Γ), ρίζα (Δ)



Εικόνα 8: Τα ποτήρια ζέσεως με τα μέρη του φυτού στη συσκευή ανακίνησης

2.3 Έλεγχος για βιοαποικοδόμηση αργού πετρελαίου

2.3.1 Προετοιμασία θαλασσινού νερού

Το θαλασσινό νερό προέρχεται από μία τοποθεσία στην οποία το νερό δεν είναι μολυσμένο με βιομηχανικά, οικιακά και άλλου είδους απόβλητα. Επίσης καθαρό φυσικό νερό είναι το νερό το οποίο δεν έχει θολότητα και δεν λαμβάνεται από περιοχή όπου υπάρχουν καράβια. Το θαλασσινό νερό αφού συλλεχθεί, πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός επτά ημερών.

2.3.2 Προετοιμασία πετρελαίου

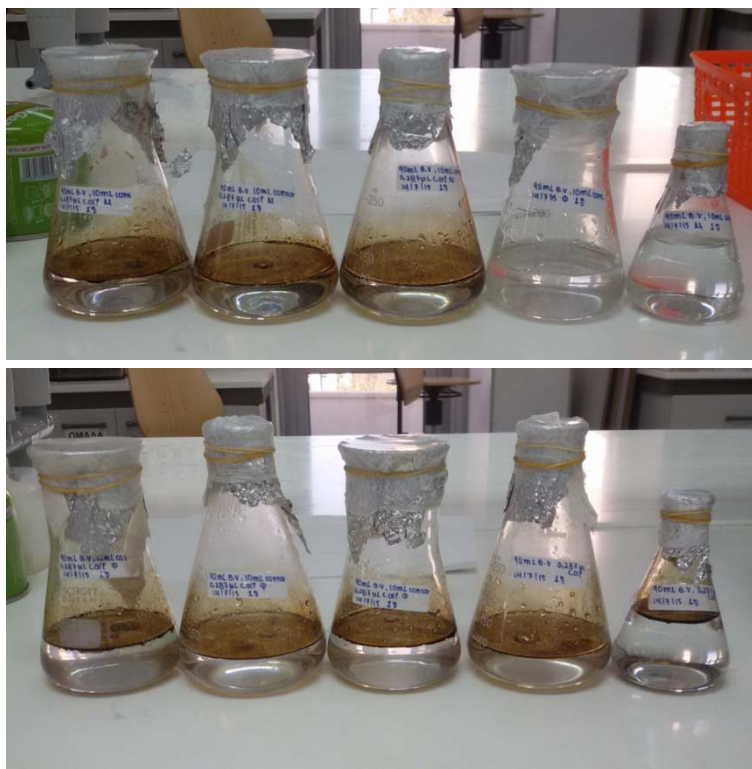
Το αργό πετρέλαιο το οποίο είναι μέτριου βάρους, θερμαίνεται στους 272 °C (τεχνητή διαδικασία γήρανσης) ούτως ώστε το ελαφρύ κλάσμα υδρογονανθράκων να αφαιρεθεί. Στη συνέχεια θερμαίνεται στους 190 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση. Τέλος πραγματοποιείται απόσταξη σε ένα ατμοσφαιρικό σημείο βρασμού 272 °C. Το σύστημα ψύχεται και τοποθετείται υπό ατμοσφαιρική πίεση 20 mm Hg. Η προετοιμασία του πετρελαίου πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Πολυτεχνείο Κρήτης ακολουθώντας το διεθνές πρότυπο ISO/DIS 8708 από το διεθνή οργανισμό τυποποίησης (Register et al. 2014) .

2.3.3 Δομή του πειράματος

Παρασκευάστηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL τα πιο κάτω μίγματα για να εξεταστεί αν αναπτύσσονται οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί στο αργό πετρέλαιο. Τυχόν ανάπτυξη υποδηλώνει την ικανότητα τους να βιοαποικοδομούν το αργό πετρέλαιο.

- I. 90 mL θαλασσινό νερό + 10 mL πυκνού διαλύματος μικροοργανισμών (φύλλα) + 0,287 μl αργό πετρέλαιο (x3)
- II. 90 mL θαλασσινό νερό + 10 mL πυκνού διαλύματος μικροοργανισμών (matte) + 0,287 μl αργό πετρέλαιο (x3)
- III. 90 mL θαλασσινό νερό + 0,287 μl αργό πετρέλαιο (x2)

Στις κωνικές προστέθηκαν 0,000574g νιτρικού νατρίου (NaNO_3) και 0,00574g όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4). Η διαθεσιμότητα αζώτου και φωσφόρου απαιτείται από τους μικροοργανισμούς ως τροφή, γιατί και προστίθενται οι πιο πάνω ποσότητες για την ενίσχυση της βιοποκατάστασης του αργού πετρελαίου. Οι συγκεκριμένες τιμές λήφθηκαν σύμφωνα με το άρθρο Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers, βάσει των M. Nikolopoulou, N. Pasadakis, N. Kalogerakis.



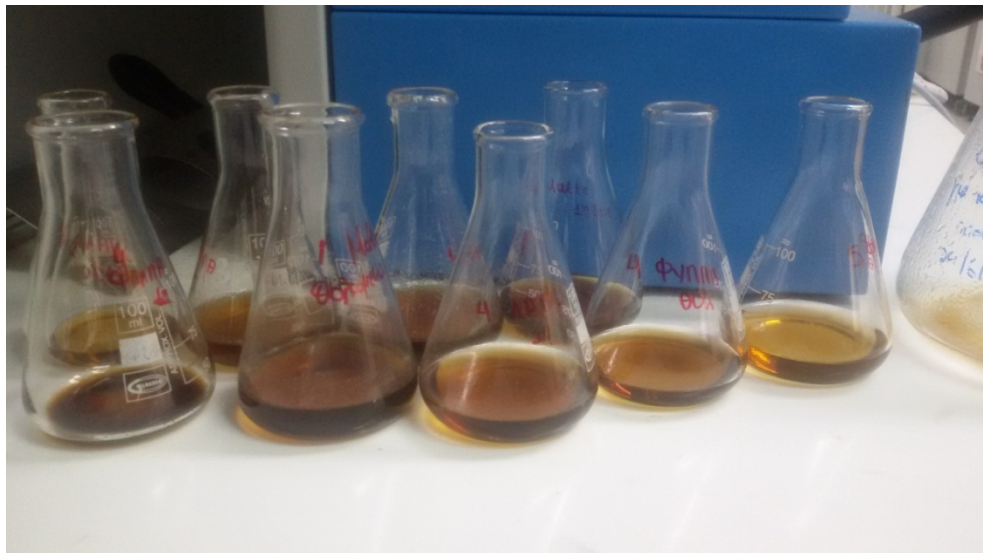
Εικόνα 9: Προετοιμασία κωνικών φιαλών με τις ανάλογες ποσότητες αργού πετρελαίου και της κοινότητας μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από την *Posidonia Oceanica* τα οποία αναφέρονται πιο πάνω

2.4 Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE-Liquid Liquid Extraction)

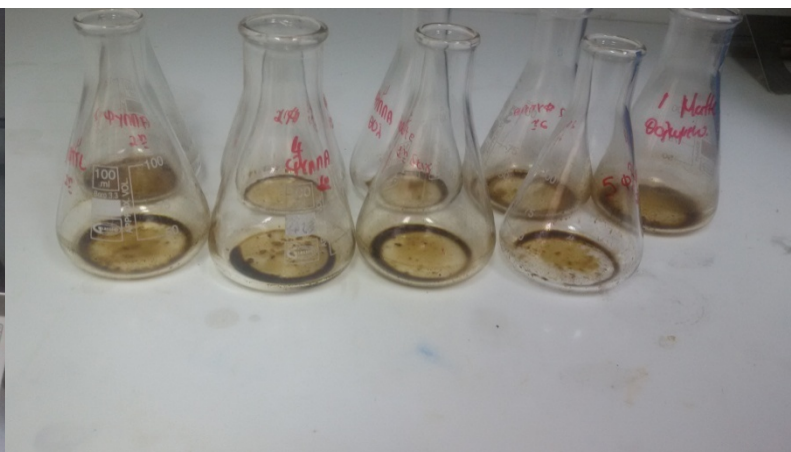
Με την ολοκλήρωση των 28 ημερών επώασης τα δείγματα υπόκεινται σε εκχύλιση υγρής φάσης που είναι μια από τις σημαντικότερες εργαστηριακές μεθόδους, με στόχο την απομόνωση μιας ουσίας από το δείγμα, που επιτυγχάνεται με την επαφή του δείγματος και ενός οργανικού διαλύτη. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός διαλύτης το διχλωρομεθάνιο (DCM- CH_2Cl_2) το οποίο δεν αναμιγνύεται με το νερό. Αρχικά, το δείγμα μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη και η κωνική στην οποία βρισκόταν το δείγμα ξεπλένεται με διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιώντας πιπέττα τύπου pasteur. Τα τοιχώματα ξεπλένονται με ιδιαίτερη προσοχή ούτως ώστε το υγρό στην κωνική να είναι διαυγές και τοποθετείται επίσης στη διαχωριστική χοάνη. Αφού το δείγμα έχει ξεπλυθεί καλά, η διαχωριστική χοάνη ανακινείται, ακολουθεί εκτόνωση (λόγω της πίεσης που δημιουργείται στη διαχωριστική χοάνη) και η ανακίνηση τελειώνει όταν δεν ακούγεται πλέον ο χαρακτηριστικός ήχος της εκτόνωσης. Η διαχωριστική χοάνη αφήνεται σε ηρεμία έτσι ώστε οι δύο φάσεις (οργανική και υδατινή) να διαχωριστούν, όπως φαίνεται στην εικόνα 10. Η στρόφιγγα ανοίγεται προσεκτικά και το δείγμα συλλέγεται σε άλλη κωνική φιάλη (εικόνα 11). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ακόμη κατά τη συλλογή του δείγματος όπου το καπάκι πρέπει να αφήνεται ανοικτό, έτσι ώστε να μην γίνει αναρρόφηση προς τα πάνω. Στη συνέχεια οι κωνικές τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 60°C στις 120 rpm μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης (εικόνα 12). Το εξατμισμένο δείγμα ξεπλένεται με διχλωρομεθάνιο supra soln μέχρι που το υγρό να είναι διαυγές και συλλέγεται σε φιαλίδια των 4 mL (εικόνα 13). Το δείγμα αφήνεται στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας μέχρι να ξεραθεί.



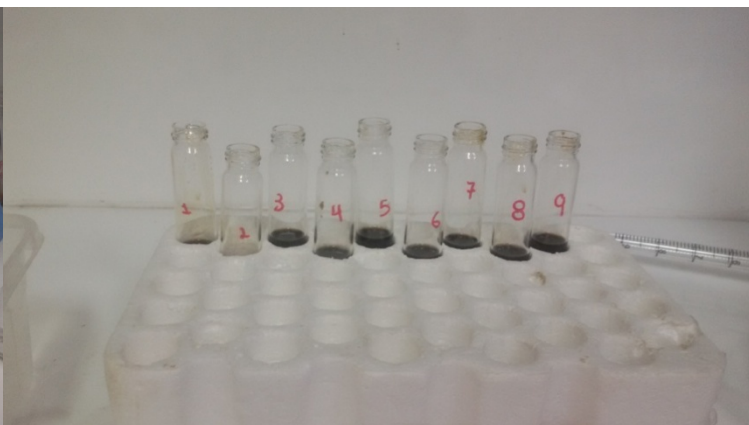
Εικόνα 10: Διαχωρισμός οργανικής και υδάτινης φάσης των δειγμάτων μετά από 28 μέρες επώασης



Εικόνα 11: Συλλογή της οργανικής φάσης σε κωνικές φιάλες



Εικόνα 12: Τοποθέτηση των κωνικών φιαλών στο υδατόλουτρο 60⁰C ούτως ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και να παραμείνει το αργό πετρέλαιο στην κωνική



Εικόνα 13: Διάλυση του εξατμισμένου δείγματος σε διχλωρομεθάνιο και μεταφορά του σε φιαλίδιο 4ml

2.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)

Η γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος SPE, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων του δείγματος πετρελαίου. Είναι η χημική επεξεργασία που απαιτείται πριν την αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, αρχικά μεταφέρονται 5-10 mg δείγματος (από το εξατμισμένο δείγμα στο φιαλίδιο) σε προζυγισμένο φιαλίδιο και διαλύονται σε 1ml εξάνιο. Αφού ξεπλυθεί η διάταξη του SPE με τον τελευταίο διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (στην προκειμένη περίπτωση ήταν το εξάνιο), τα δείγματα μεταφέρονται με πιπέττα pasteur απευθείας στο φυσίγγιο με προσοχή να μη χυθεί το δείγμα έξω (εικόνα 14). Οι στρόφιγγες ανοίγουν αφού τοποθετηθούν όλα τα δείγματα. Όταν το εξάνιο με το δείγμα (δείγμα + 1 mL εξάνιο) περάσουν από το φίλτρο και καταλήξουν στο φιαλίδιο, προστίθενται ακόμα 2 mL εξάνιο από τον αντίστοιχο ογκομετρικό κύλινδρο για κάθε δείγμα. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμα 2 mL εξάνιο. Όταν τα 4 mL εξανίου περάσουν, τα φιαλίδια των 15 mL τα οποία περιέχουν τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (διαυγές), μετακινούνται και αφήνονται στον απαγωγό για να εξατμιστούν (εικόνα 15). Στην συνέχεια τοποθετούνται 2 mL DCM σε κάθε φυσίγγιο και ανοίγεται η στρόφιγγα (εικόνα 16). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμα 2 mL DCM. Όταν περάσουν και τα 4 mL DCM, τα φιαλίδια των 15 mL τα οποία περιέχουν τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (κίτρινο χρώμα), μετακινούνται και αφήνονται στον απαγωγό για να ξεραθούν. Όταν τα δείγματα εξατμιστούν, οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες ξεπλένονται με εξάνιο και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες ξεπλένονται με DCM και τα δείγματα μεταφέρονται σε προζυγισμένα φιαλίδια του GC/MS. Τα φιαλίδια του GC/MS που περιέχουν το δείγμα αφήνονται στον απαγωγό να ξεραθούν και ζυγίζονται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Αφού πραγματοποιείται μέτρηση βάρους του άδειου φιαλιδίου και του φιαλιδίου με το εξατμισμένο δείγμα υπολογίζεται στην ανάλυση συζήτηση αποτελεσμάτων η ποσότητα της σταγόνας αργού πετρελαίου (mg).



Εικόνα 14: Μεταφορά δείγματος στο φυσίγγιο



Εικόνα 15: Μεταφορά του εξανίου



Εικόνα 16: Μεταφορά διχλωρομεθανίου

2.6 Ανάλυση GC-MS

Η τεχνική GC-MS αποτελεί μια αρκετά αξιόπιστη μέθοδο, η οποία συνδυάζει δύο διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους, της Αέριας Χρωματογραφίας και της Φασματομετρίας Μάζας. Ο αέριος χρωματογράφος (GC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών του χημικού δείγματος, ενώ ο φασματογράφος μάζας (MS) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συστατικών αυτών. Τα πετρελαιοειδή περιέχουν μεγάλο αριθμό συστατικών με αποτέλεσμα ο χρωματογραφικός διαχωρισμός τους να καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολός. Έτσι η ανάλυση GC-MS αποτελεί την πιο κατάλληλη μέθοδο για την ανάλυση πετρελαιοειδών.

2.6.α Αέριος χρωματογράφος (GC)

Ο αναλυτής GC, απαρτίζεται από μια μεταλλική στήλη στο ένα άκρο, της οποίας βρίσκεται η θυρίδα έκχυσης όπου εισάγεται το δείγμα, και στο άλλο άκρο είναι τοποθετημένος ο ανιχνευτής. Αρχικά εισάγεται το προς εξέταση δείγμα στη θυρίδα έκχυσης με τη χρήση ενός ελαστικού διαφράγματος. Ακολούθως, το δείγμα εξατμίζεται εφόσον στη θυρίδα εκχύσεως υπάρχουν πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης χρησιμοποιείται και ένα φέρον αέριο το οποίο δεν πρέπει να αντιδρά με το δείγμα όπως το ήλιο, το αργόν, το υδρογόνο και το άζωτο, το οποίο μεταφέρει το δείγμα διαμέσου της στήλης. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών χρόνων που απαιτεί το κάθε συστατικό για να μεταβεί από το ένα άκρο της στήλης στο άλλο. Στο τέλος της διαδικασίας κάθε στοιχείο

παράγει ιδανικά μια συγκεκριμένη φασματική κορυφή που μπορεί να καταγραφεί σε ένα γράφημα χαρτί ή ηλεκτρονικά.

2.6.β Φασματογράφος Μάζας (MS)

Ο αναλυτής MS, αποτελείται από έναν ανιχνευτή, μια πηγή ιόντων, ένα μοριακό επιταχυντή και την είσοδο δείγματος. Για τον προσδιορισμό των ουσιών, πραγματοποιείται βομβαρδισμός των μορίων με ιόντα σε ένα τετράπολο. Η χημική δομή της κάθε ένωσης καθορίζει την πορεία διάσπασης της. Το στόμιο εισόδου του δείγματος, απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες (400⁰C) για να εξασφαλίζεται ότι το δείγμα παραμένει στην αέρια μορφή. Ακολούθως, το δείγμα κατευθύνεται στο θάλαμο ιοντισμού όπου μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής τάσης συντρίβεται με τα μόρια του δείγματος σε θραύσματα. Στη συνέχεια, τα σωματίδια αυτά περνούν μέσα από ένα τετράπολο στο οποίο δημιουργείται μαγνητικό πεδίο υπό εφαρμογή μεταβαλλόμενης τάσης. Η τάση επιτάχυνσης μεταβάλλεται διαρκώς έτσι ώστε να καλύψει ένα ευρύ φάσμα μαζών εφόσον για κάθε τιμή τάσης μόνο μια μάζα είναι ικανή να αναπτύξει ταχύτητα για να κατευθυνθεί προς τον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής καταγράφει ηλεκτρονικά την μάζα των θραυσμάτων και έτσι δημιουργείται ένα γράφημα με κορυφές όπου το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο του αριθμού των θραυσμάτων που ανιχνεύτηκαν για μια συγκεκριμένη μάζα.

2.7 Διαδικασία ανάλυσης στο GC/MS

Αρχικά, σε κάθε φιαλίδιο εκχυλισμένου δείγματος προστίθεται ένα εσωτερικό πρότυπο (internal standard) διάλυμα τεσσάρων δευτεριωμένων ενώσεων τα οποία χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί ο σχετικός συντελεστής απόκρισης (relative response factor - RRF) για τους αναλύτες στόχους. Με το διάλυμα αυτό γίνεται εφικτή η ποσοτικοποίηση των αλειφατικών και αρωματικών κλασμάτων πετρελαίου ούτως ώστε να παρθούν επαρκείς πληροφορίες για την αποδόμηση του πετρελαίου. Ακόμη οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στόχων είναι απαραίτητο να κανονικοποιηθούν μέσω εσωτερικών δεικτών (conserved internal marker) για να διασφαλιστεί ότι η μείωση της συγκέντρωσης τους είναι αποτέλεσμα βιοαποικοδόμησης και όχι σε φυσική αποκοιδόμηση από την κακή μεταχείριση ή την ανεπαρκή εκχύλιση του δείγματος. Εσωτερικοί δείκτες που έχουν βρεθεί χρήσιμοι για την ποσοτικοποίηση είναι C2- ή C3-φθενανθρένιο, C2- χρυσένιο και C3017α(H), 21β(H)-χοπάνιο. Η GC/MS ανάλυση διεξάγεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία:

- 1 ml διαλύματος εξανίου το οποίο προετοιμάστηκε από προηγούμεως τοποθετείται σε φιαλίδια των 1.5 ml
- Στα φιαλίδια προστίθεται επίσης 25 μL διάλυμα εσωτερικών προτύπων συγκέντρωσης 400 ppm. Το διάλυμα περιέχει τέσσερα δευτεριωμένα συστατικά: d_8 -naphthalene, d_{10} anthracene, d_{12} -chrysene και d_{12} -perylene (Πίνακας 11). Η τελική συγκέντρωση των εσωτερικών προτύπων σε κάθε δείγμα είναι 10 ppm.
- Πριν από κάθε ανάλυση, ένα τυφλό οργάνου και καθημερινά πρότυπα αναλύονται. Το MS βαθμονομείται με βάση μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου της EPA 8270. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εσωτερικών προτύπων είναι 10 ppm. Έτσι, σχηματίζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης πέντε σημείων στα 1, 5, 10, 25 και 50 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 συνθήκες λειτουργίας του GC/MS που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση παρουσιάζονται στον πίνακα 12.
- Σε κάθε φιαλίδιο δείγματος προς ανάλυση αναγράφονται οι απαραίτητες πληροφορίες (όνομα, αλειφατικό ή αρωματικό).
- Υπολογίζονται για κάθε συστατικό οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης σε σχέση με το αντίστοιχο δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RRF = (A_x \cdot C_{is}) / (A_{is} \cdot C_x)$$

RRF =Σχετικός συντελεστής απόκρισης

A_x =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 (10 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.

Πίνακας 3: Εσωτερικά πρότυπα για κάθε αναλυτή στόχο

Εσωτερικό Πρότυπο	<i>d</i> ₈ -naphthalene	<i>d</i> ₁₀ -anthracene	<i>d</i> ₁₂ -chrysene	<i>d</i> ₁₂ -perylene
Αλκάνια	nC10-nC15	nC16-nC23	nC24-nC29	nC30-nC35
		Pristane		C3017 _β (H),21 _α (H)-hopane
		Phytane		
		5 α -androstane		
Αρωματικές 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 4: Συνθήκες λειτουργίας του GC/MS

Συνθήκες λειτουργίας και Πρόγραμμα θερμοκρασίας του GC/MS					
Συνθήκες λειτουργίας					
Θύρα έγχυσης—290 °C					
Γραμμή μεταφοράς—320 °C					
Συνολικός χρόνος λειτουργίας—73 λεπτά					
Ρυθμός ροής της στήλης (He)—1.0 ml/λεπτό					
Πρόγραμμα θερμοκρασίας					
Επίπεδο	Θερμ. 1, °C	Χρόνος 1, λεπτά	Ρυθμός, °C/λεπτό	Θερμ. 2, °C	Χρόνος 2, λεπτά
Επίπεδο 1	55	3	5	280	5
Επίπεδο 2	280	0	3	310	10

Πίνακας 5: Αναλυτές και συστατικά αναφοράς

Αναλύτης	Συστατικό αναφοράς	Αναλύτης	Συστατικό αναφοράς
n-C10	n-C10	C2-naphthalene	Naphthalene.
n-C11	n-C11	C3-naphthalene	Naphthalene.
n-C12	n-C12	C4-naphthalene	Naphthalene.
n-C13	n-C13	Fluorene	Fluorene.
n-C14	n-C14	C1-fluorene	Fluorene.
n-C15	n-C15	C2-fluorene	Fluorene.
n-C16	n-C16	C3-fluorene	Fluorene.
n-C17	n-C17	Dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Pristane	Pristane	C1-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C18	n-C18	C2-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
Phytane	Phytane	C3-dibenzothiophene	Dibenzothiophene.
n-C19	n-C19	Phenanthrene	Phenanthrene.
n-C20	n-C20	Anthracene	Anthracene.
n-C21	n-C21	C1-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C22	n-C22	C2-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C23	n-C23	C3-phenanthrene	Phenanthrene.
n-C24	n-C24	Fluoranthene	Fluoranthene.
n-C25	n-C25	Pyrene	Pyrene.
n-C26	n-C26	C1-pyrene	Pyrene.
n-C27	n-C27	C2-pyrene	Pyrene.
n-C28	n-C28	Chrysene	Chrysene.
n-C29	n-C29	C1-chrysene	Chrysene.
n-C30	n-C30	C2-chrysene	Chrysene.
n-C31	n-C31	Benzo(b)fluoranthene	Benzo(b)fluoranthene.
n-C32	n-C32	Benzo(k)fluoranthene	Benzo(k)fluoranthene.
n-C33	n-C33	Benzo(e)pyrene	Benzo(e)pyrene.
n-C34	n-C34	Benzo(a)pyrene	Benzo(a)pyrene.
n-C35 C ₃₀ 17 _α (H),21 β (H)- hopane	n-C35 C ₃₀ 17 _α (H),21 β (H)- hopane	Perylene ideno(g,h,i)pyrene	Perylene ideno(g,h,i)pyrene

2.8 Μέθοδος CTAB

Αρχικά μεταφέρονται 500ml δείγματος σε φιαλίδια και προστίθενται 564 μL Tris-EDTA Buffer και 10 μL λυσοζύμης. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα. Ακολούθως, προστίθενται 6 μL Πρωτεϊνάσης K για απενεργοποίηση των νουκλεασών καθώς και 30 μL 20% SDS. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 37 $^{\circ}\text{C}$ μέχρι το υπερκείμενο υγρό να γίνει διαφανές. Αργότερα, προστίθενται 100 μL χλωριούχου νατρίου (NaCl) 5M και γίνεται θέρμανση στους 65 $^{\circ}\text{C}$ για 2 λεπτά. Ταυτόχρονα, γίνεται θέρμανση του διαλύματος CTAB/NaCl στους 65 $^{\circ}\text{C}$ και 80 μL από διάλυμα προστίθενται στα φιαλίδια. Τα δείγματα επωάζονται στους 65 $^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά. Επιπρόσθετα, 800 μL φαινόλης:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) προστίθενται στα φιαλίδια για διαχωρισμό των φάσεων, με το DNA να μεταφέρεται στην υγρή φάση μετά από φυγοκέντριση στις 16000 στροφές για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό μαζί με το DNA μεταφέρεται σε άλλο φιαλίδιο και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης. Τα δείγματα υπόκεινται σε φυγοκέντριση στις 16000 στροφές για 10 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε άλλο φιαλίδιο και προστίθενται 500 μL 70% αιθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 16000 στροφές για 30 λεπτά και αφήνονται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου. Η αιθανόλη αφαιρείται και παραμένει το ίζημα, το οποίο διαλύεται με 50-60 μL TE Buffer. Τα δείγματα αφήνονται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 37 $^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA στο φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου στα 260 nm.

3. ΑΝΑΛΥΣΗ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1 Μετρήσεις συγκέντρωσης DNA δειγμάτων από το φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου

Μετά από τη διαδικασία του CTAB, που πραγματοποιήθηκε με την πάροδο των 28 ημερών, μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου και πάρθηκαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 6 και πίνακα 7. Όπου πείραμα ελέγχου 1 περιέχεται θαλασσινό βιομέσο και αργό πετρέλαιο και πείραμα ελέγχου 2 περιέχεται θαλασσινό βιομέσο και διάλυμα μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το φυτό *P.oceanica*.

Πίνακας 6: Συγκέντρωση DNA (ng/ul) δειγμάτων από τη πρώτη δειγματοληψία

Δείγμα	ng/ul	260/280	260/230
φύλλα 1 C.G	433	1,35	0,86
φύλλα 2 C.G	336,53	1,23	2,22
φύλλα 3 C.G	509,84	1,37	2
Matte 1 C.G	245,98	1,39	2,41
Matte 2 C.G	344,9	1,26	2,32
Matte 3 C.G	247,76	1,65	0,43
πειραμα ελέγχου 1	3,23	1,33	0,93
πειραμα ελέγχου 1	2,18	1,27	2,33
πειραμα ελέγχου 2 (φύλλα)	103,8	1,25	2,32
πειραμα ελέγχου 2 (matte)	103,4	1,43	2,49

Οι τιμές του DNA για τα δείγματα φύλλα και matte στην πρώτη δειγματοληψία, κυμαίνονται από 245,98 με 509,84 ng/ul κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται καταναλώνοντας ποσότητα του αργού πετρελαίου. Στα πειράματα ελέγχου 1 η τιμή του DNA

είναι αρκετά χαμηλή σχεδόν μηδαμινή λόγω του ότι δεν περιέχονται μικροοργανισμοί άρα ούτε υπάρχει βιοαποικοδόμηση. Επίσης στα πειράματα ελέγχου 2 οι τιμές είναι αρκετά πιο χαμηλές κάτι το οποίο δείχνει ότι οι μικροοργανισμοί αφού κατανάλωσαν τη ποσότητα της γλυκόζης που περιεχόταν στο θαλασσινό βιομέσο άρχισαν να πεθαίνουν. Το πείραμα ελέγχου 1 και 2, πραγματοποιήθηκε για σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας 7: Συγκέντρωση DNA (ng/ul) δειγμάτων από τη δεύτερη δειγματοληψία

Δείγμα	ng/ul	260/280	260/230
φύλλα 1 Λ	286,32	1,4	0,57
φύλλα 2 Λ	315,45	1,47	2,19
φύλλα 3 Λ	293,19	1,13	1,96
Matte 1 Λ	262,83	1,46	0,31
Matte 2 Λ	269,88	1,29	0,87
Matte 3 Λ	220,3	6,78	1,33
πειραμα ελέγχου 1	2,7	1,5	1,06
πείραμα ελέγχου 1	1,3	1,39	2,35
πείραμα ελέγχου 2	105,37	1,42	1,19
πειραμα ελέγχου 2	108,37	1,44	2,5

Οι τιμές του DNA για τα δείγματα φύλλα και matte της δεύτερης δειγματοληψίας κυμαίνονται από 220,3 με 315,45 ng/ul κάτι το οποίο δείχνει επίσης ότι αφού οι μικροοργανισμοί έχουν επιβιώσει με το πέρας των 28 ημερών, βιοαποικοδομούν το αργό πετρέλαιο. Στα πειράματα ελέγχου 1 που είναι ένα μέτρο σύγκρισης, οι τιμές είναι χαμηλές λόγω του ότι δεν περιέχουν κοινότητα μικροοργανισμών καθώς και στα πειράματα ελέγχου 2 υπάρχει μειωμένη ποσότητα DNA για το λόγο που αναφέρθηκε πιο πάνω.

3.2 Συγκεντρώσεις κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες

Με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μάζας, μέσω του προγράμματος data analysis GC/MS λαμβάνεται ξεχωριστά το κάθε χρωματογράφημα για τον κάθε κορεσμένο υδρογονάνθρακα καθώς και για τον κάθε αρωματικό. Στη συνέχεια, έγινε διόρθωση του base line και έτσι το πρόγραμμα μας υπολόγιζε αμέσως το εμβαδόν της κάθε κορυφής καθώς και τη συγκέντρωση του κάθε κορεσμένου/αρωματικού υδρογονάνθρακα σε μονάδες μέτρησης ppm. Ακολούθως τα ppm μετατρέπονταν σε ng πολλαπλασιάζοντας με τον αριθμό 1000. Λόγω του ότι χρειαζόταν να ελεγχθεί πόσα ng του κάθε κορεσμένου/αρωματικού υδρογονάνθρακα περιέχονται σε ένα mg αργού πετρελαίου, διαιρούσαν τα ng με τα mg της σταγόνας αργού πετρελαίου (διαφορά άδειου φιαλιδίου με φιαλιδίου με το εξατμισμένο δείγμα και έτσι βρίσκουμε τα mg της σταγόνας κατά τη διαδικασία στερεής εκχύλισης). Το βάρος των φιαλιδίων μετρήθηκε στη διαδικασία στερεής εκχύλισης. Ολοκληρώνοντας έχοντας τις συγκεντρώσεις σε ng/mg, διαιρούνταν με τη συγκέντρωση χοπανίου ο οποίος αποτελεί βιοδείκτη βιοδιάσπασης του αργού πετρελαίου αποκλειστικά από τους μικροοργανισμούς και όχι από οποιοδήποτε άλλο παράγοντα. Οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο παράρτημα. Οι τιμές της συγκέντρωσης που υπολογίστηκαν σε ng/mg παρουσιάζονται στους πιο κάτω πίνακες.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte 1	Matte 2	Matte 3	Πείραμα
	CG	CG	C.G	α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,032	0,106	0,04	0,26
C13	1,404	3,319	0,35	4,67
C14	9,723	13,617	6,06	25,47

C15	20,968	24,011	18,80	48,84
C16	21,117	23,170	18,96	50,54
C17	24,245	24,894	20,67	48,15
Pr	18,032	18,223	10,65	25,86
C18	27,085	26,372	20,64	47,32
Ph	14,851	14,936	9,10	21,09
C19	27,011	25,649	17,86	39,73
C20	29,213	28,011	19,04	42,72
C21	26,468	26,830	16,33	36,77
C22	23,234	23,043	14,78	35,26
C23	21,553	21,947	12,46	29,32
C24	19,702	20,809	14,58	25,44
C25	18,255	20,000	10,73	20,76
C26	14,670	15,936	10,72	17,13
C27	12,064	12,798	11,72	57,96
C28	9,500	10,372	9,70	53,29
C29	7,457	8,096	5,32	9,85
C30	8,702	7,798	5,58	12,06
C31	6,851	6,309	4,45	8,76
C32	4,745	4,170	2,87	6,20
C33	3,830	3,170	2,02	4,40
C34	3,447	2,330	1,68	2,97
C35	1,851	1,638	1,27	2,46

Στο δείγμα matte στην πρώτη δειγματοληψία οι τιμές των κορεσμένων υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,032-29,213 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στον άνθρακα C12 στο matte 1 και η μέγιστη στον άνθρακα C20 στο matte 2 επίσης. Οι τιμές των συγκεντρώσεων των κορεσμένων υδρογονανθράκων στα 3 δείγματα έχουν επαναληψιμότητα στις πλείστες περιπτώσεις.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Φύλλα 1 CG	Φύλλα 2 CG	Φύλλα 3 CG	Πείραμα α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,08	7,026	0,63	0,26
C13	0,37	19,931	5,78	4,67
C14	5,59	27,828	18,67	25,47
C15	20,98	23,121	24,00	48,84
C16	28,31	22,034	26,43	50,54
C17	31,94	18,560	22,70	48,15
Pr	15,88	22,190	28,36	25,86
C18	32,13	15,379	19,12	47,32
Ph	13,97	21,733	25,58	21,09
C19	28,70	23,422	28,91	39,73
C20	30,45	21,422	25,03	42,72

C21	26,61	18,922	23,30	36,77
C22	23,66	18,164	20,69	35,26
C23	20,85	16,931	17,31	29,32
C24	19,75	16,741	14,98	25,44
C25	16,25	13,267	13,35	20,76
C26	13,16	10,500	9,52	17,13
C27	10,69	8,241	6,30	57,96
C28	4,18	6,371	7,13	53,29
C29	7,19	8,009	7,32	9,85
C30	10,18	5,336	5,69	12,06
C31	7,06	3,388	4,41	8,76
C32	3,96	0,224	3,44	6,20
C33	3,48	2,638	2,46	4,40
C34	2,04	1,681	1,91	2,97
C35	2,15	7,026	1,00	2,46

Στο δείγμα φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία οι τιμές των κορεσμένων υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,08-32,13 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στον άνθρακα C12 στο φύλλα 1 και η μέγιστη στον άνθρακα C18 στο δείγμα φύλλα 1 επίσης. Τα περισσότερα δείγματα δεν έχουν επαναληψιμότητα.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte 1	Matte 2	Matte 3	Πείραμα
	Λ	Λ	Λ	α
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,191	0,222	0,186	0,86
C13	1,077	0,583	1,438	13,04
C14	8,163	5,519	11,518	44,15
C15	20,877	16,398	25,769	70,23
C16	24,244	20,158	26,360	58,81
C17	24,584	20,244	25,785	55,37
Pr	21,015	17,676	19,848	26,56
C18	28,121	15,652	28,620	52,56
Ph	17,517	15,193	17,029	19,53
C19	23,435	19,287	23,428	44,84
C20	27,992	23,404	27,486	47,01
C21	24,257	19,551	23,018	41,06
C22	24,122	20,812	22,839	38,60
C23	20,611	15,675	18,714	32,48
C24	20,347	13,585	19,861	27,96
C25	18,673	12,923	15,565	22,31
C26	15,331	9,222	11,199	18,23
C27	33,120	78,014	49,111	66,94

C28	27,514	29,403	58,523	51,49
C29	7,578	6,174	7,565	8,75
C30	8,908	7,662	8,616	11,66
C31	6,542	5,343	5,731	8,19
C32	4,092	3,884	4,028	5,31
C33	2,980	2,077	2,843	4,10
C34	2,470	2,039	2,083	2,90
C35	1,323	0,913	1,222	1,80

Στο δείγμα matte στην δεύτερη δειγματοληψία οι τιμές των κορεσμένων υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,186-49,111 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στον άνθρακα C12 στο matte 3 και η μέγιστη στον άνθρακα C27 στο δείγμα matte 3 επίσης.

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αλκάνια	Φύλλα 1 Λ	Φύλλα 2 Λ	Φύλλα 3 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,085	0,156	0,129	0,86
C13	0,757	0,803	0,614	13,04
C14	4,859	4,121	7,311	44,15
C15	1,465	10,709	21,482	70,23
C16	32,397	14,309	23,814	58,81

C17	32,653	13,594	20,257	55,37
Pr	18,512	19,464	19,035	26,56
C18	38,728	19,978	24,447	52,56
Ph	16,234	16,917	16,301	19,53
C19	29,883	15,618	19,026	44,84
C20	35,455	0,785	24,357	47,01
C21	27,923	18,608	19,759	41,06
C22	28,456	21,146	21,288	38,60
C23	22,217	17,128	17,288	32,48
C24	23,764	19,581	17,247	27,96
C25	17,682	13,444	13,292	22,31
C26	16,344	10,256	11,736	18,23
C27	25,057	62,106	32,348	66,94
C28	16,045	79,775	29,421	51,49
C29	7,924	6,650	6,382	8,75
C30	9,815	8,313	7,843	11,66
C31	6,127	6,169	5,438	8,19
C32	4,140	3,925	3,584	5,31
C33	2,688	2,444	2,590	4,10
C34	1,924	1,713	2,011	2,90
C35	1,178	0,981	1,090	1,80

Στο δείγμα φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία οι τιμές των κορεσμένων υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,085-62,106 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να

αντιστοιχεί στον άνθρακα C12 στο δείγμα φύλλα 1 και η μέγιστη στον άνθρακα C27 στο δείγμα φύλλα 2. Υπάρχει επανάληψη στις τιμές των δειγμάτων.

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Matte 1 CG	Matte 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,1170	0,1277	0,5779
Dibenzothiophene	0,4362	0,4681	0,8594
Phenanthrene	0,5426	0,5745	0,6920
Chrysene	0,1277	0,1277	0,1883
Pyrene	0,0213	0,0213	0,0354
benzo(e)pyrene	0,0426	0,0426	0,0615

Στο δείγμα matte στην πρώτη δειγματοληψία οι τιμές των αρωματικών υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,0213-0,5745 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στο πυρένιο και η μέγιστη στο φενανθρένιο. Υπάρχει επανάληψη στις τιμές των δειγμάτων.

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία.

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1 CG	Φύλλα 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
fluorene	0,0259	0,0042	0,5779
dibenzothiophene	0,3103	0,2960	0,8594
phenanthrene	0,6034	0,4313	0,6920
chrysene	0,1379	0,0709	0,1883
pyrene	0,0086	0,0079	0,0354
benzo(e)pyrene	0,0431	0,0157	0,0615

Στο δείγμα φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία οι τιμές των αρωματικών υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,0042-0,6034 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στο φλουρένιο και η μέγιστη στο φενανθρένιο. Η επανάληψη στις τιμές των δειγμάτων είναι σχετικά καλή.

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα matte στη δεύτερη δειγματοληψία.

ng/mg αργό πετρέλαιο – Αρωματικά	Matte 1 Λ	Matte 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,0128	0,0778	0,2682
Dibenzothiophene	0,3466	0,3347	0,4368
Phenanthrene	0,5071	0,4748	0,3889
Chrysene	0,0757	0,0725	0,0939
Pyrene	0,0438	0,0338	0,0125
benzo(e)pyrene	0,0199	0,7053	0,0297

Στο δείγμα matte στην δεύτερη δειγματοληψία οι τιμές των αρωματικών υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,0128-0,3466 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στο φλουρένιο και η μέγιστη στο διβενζοθειοφένιο. Η επανάληψη στις τιμές των δειγμάτων είναι σχετικά καλή.

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων μετά τις 28 ημέρες για το δείγμα φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1 Λ	Φύλλα 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,0103	0,0905	0,2682
Dibenzothiophene	0,3592	0,3349	0,4368
Phenanthrene	0,5234	0,4797	0,3889
Chrysene	0,0701	0,0730	0,0939
Pyrene	0,0191	0,0393	0,0125
benzo(e)pyrene	1,9490	0,5169	0,0297

Στο δείγμα φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία οι τιμές των αρωματικών υδρογονανθράκων κυμαίνονται από 0,0103-0,3592 ng/mg αργό πετρέλαιο, με την ελάχιστη συγκέντρωση να αντιστοιχεί στο φλουρένιο και η μέγιστη στο διβενζοθειοφένιο. Η επανάληψη στις τιμές των δειγμάτων είναι σχετικά καλή.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, συγκρίνοντας τα με το πείραμα ελέγχου το οποίο περιείχε θαλασσινό βιομέσο και αργό πετρέλαιο, παρατηρούμε ότι στα περισσότερα δείγματα η συγκέντρωση των αρωματικών και κορεσμένων που βρίσκονται στο πείραμα ελέγχου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα τα οποία περιείχαν μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με την παρατήρηση αυτή, συμπεραίνουμε ότι αφού τα δείγματα με τους μικροοργανισμούς περιείχαν λιγότερη συγκέντρωση κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων, έχουν την ικανότητα να βιοαποικοδομούν το αργό πετρέλαιο. Σε ελάχιστες περιπτώσεις (κόκκινα γράμματα) παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το πείραμα ελέγχου, και αυτό ίσως να οφείλεται σε σφάλματα που μπορεί να προκλήθηκαν κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας. Πιο πιθανόν να οφείλονται κατά τη διαδικασία υγρής - υγρής εκχύλισης στην οποία απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον διαχωρισμό των δύο φάσεων καθώς και στην στερεή εκχύλιση όπου το εξατμισμένο δείγμα κορεσμένων και ιδιαίτερα αρωματικών (λόγω του ότι είναι διαυγές) πρέπει να εκχυθεί ολόκληρο στο φιαλίδιο του GC-MS.

Ακολούθως παρουσιάζεται ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των κορεσμένων υδρογονανθράκων σε κατηγορίες οι οποίες προκύπτουν από τις δευτεριωμένες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μάζας, καθώς και ο μέσος όρος των αρωματικών υδρογονανθράκων.

Πίνακας 16: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση κορεσμένων υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte	Φύλλα	Πείραμα ελέγχου	Βιοαποικοδόμηση δείγματος φύλλα	Βιοαποικοδόμηση δείγματος matte
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12-C15	8,2025	12,8338	19,81	35,21%	58,59%
C16-C23	22,5243	23,3739	47,3225	50,60%	52,40%
C24-C29	12,9127	10,71	30,73	65,15%	57,98%
C30-C35	4,036	3,7818	6,1416	38,42%	34,28%

Πίνακας 17: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση κορεσμένων υδρογονανθράκων για τα δείγματα matte και φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte	Φύλλα	Πείραμα ελέγχου	Βιοαποικοδόμηση δείγματος φύλλα	Βιοαποικοδόμηση δείγματος matte
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12-C15	6,8284	4,3742	32,07	86,36%	78,70%
C16-C23	23,2666	22,4630	52,1025	56,89%	55,34%
C24-C29	24,0939	22,7252	32,6133	30,31%	26,12%
C30-C35	4,042	3,9985	5,66	29,35%	28,59%

Πίνακας 18: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Matte	Φύλλα	Πείραμα ελέγχου	Βιοαποικοδόμηση δείγματος φύλλα	Βιοαποικοδόμηση δείγματος matte
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
fluorene	0,1223	0,0150	0,5779	97,40%	78,83%
dibenzothiophene	0,4521	0,3031	0,8594	64,73%	47,39%
phenanthrene	0,5585	0,5174	0,6920	25,23%	19,29%
chrysene	0,1277	0,1044	0,1883	44,55%	32,18%
pyrene	0,0213	0,00825	0,0354	76,69%	39,83%
benzo(e)pyrene	0,0426	0,0294	0,0615	52,20%	30,73%

Πίνακας 19: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και βιοαποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων για τα δείγματα φύλλα και matte στην δεύτερη δειγματοληψία

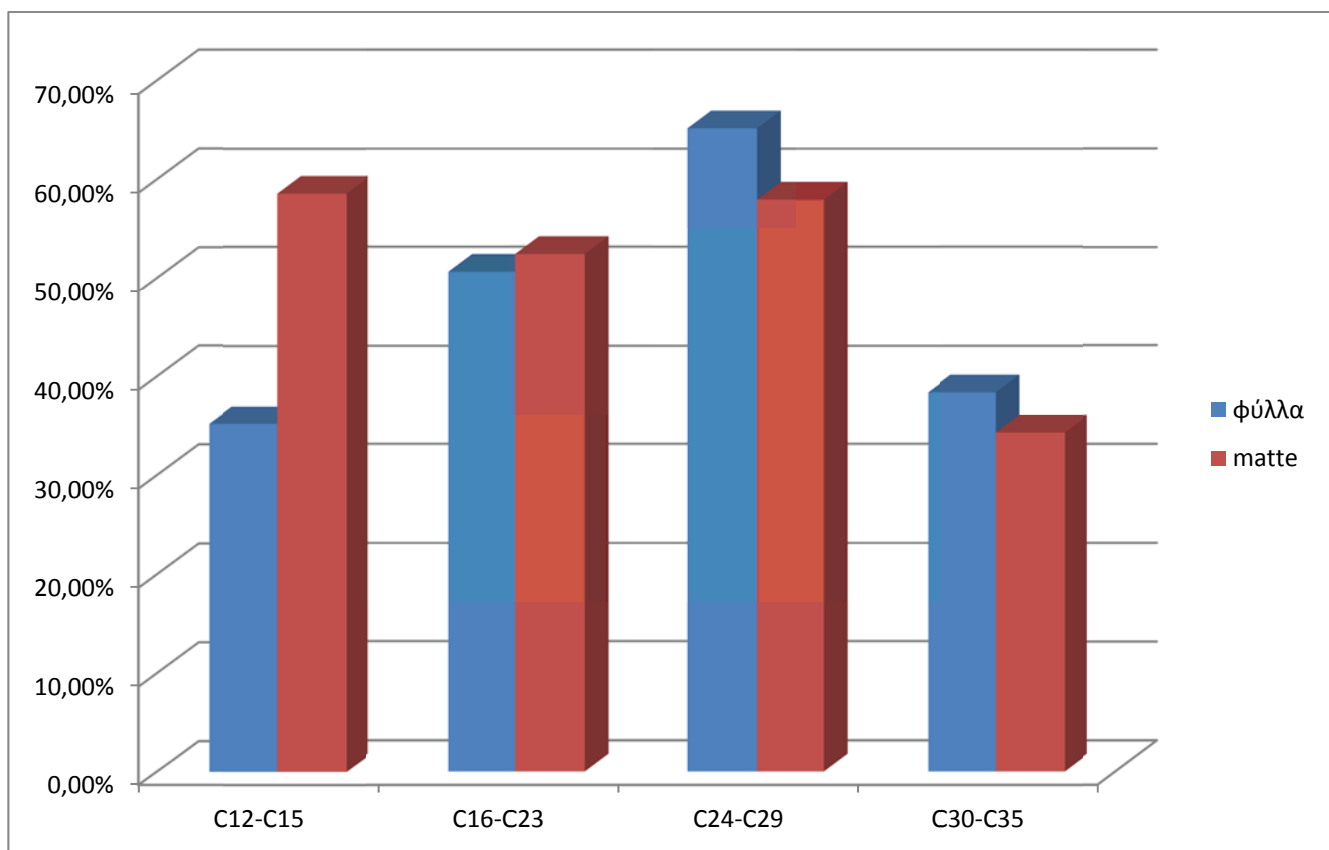
ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Matte	Φύλλα	Πείραμα	Βιοαποικοδόμηση δείγματος φύλλα	Βιοαποικοδόμηση δείγματος matte
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
fluorene	0,0453	0,0504	0,2682	81,20%	83,10%
dibenzothiophene	0,3407	0,3470	0,4368	20,55%	22%
phenanthrene	0,4909	0,5015	0,3889	0%	0%
Chrysene	0,0741	0,0715	0,0939	23,85%	21,08%
Pyrene	0,0388	0,0292	0,0125	0%	0%
benzo(e)pyrene	0,3626	1,2329	0,0297	0%	0%

Στην πρώτη δειγματοληψία, το δείγμα φύλλα είχε το υψηλότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης των κορεσμένων υδρογονανθράκων (C24-C29) με ποσοστό 65,15% ενώ το χαμηλότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ήταν του δείγματος matte, 34,28% στην κατηγορία C30-C35. Στην δεύτερη δειγματοληψία όσον αφορά τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες επίσης τη μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση είχε το δείγμα φύλλα με ποσοστό 86,36% στην κατηγορία C12-C15 ενώ το χαμηλότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης το δείγμα φύλλα με 26,12% στην κατηγορία C24-C29.

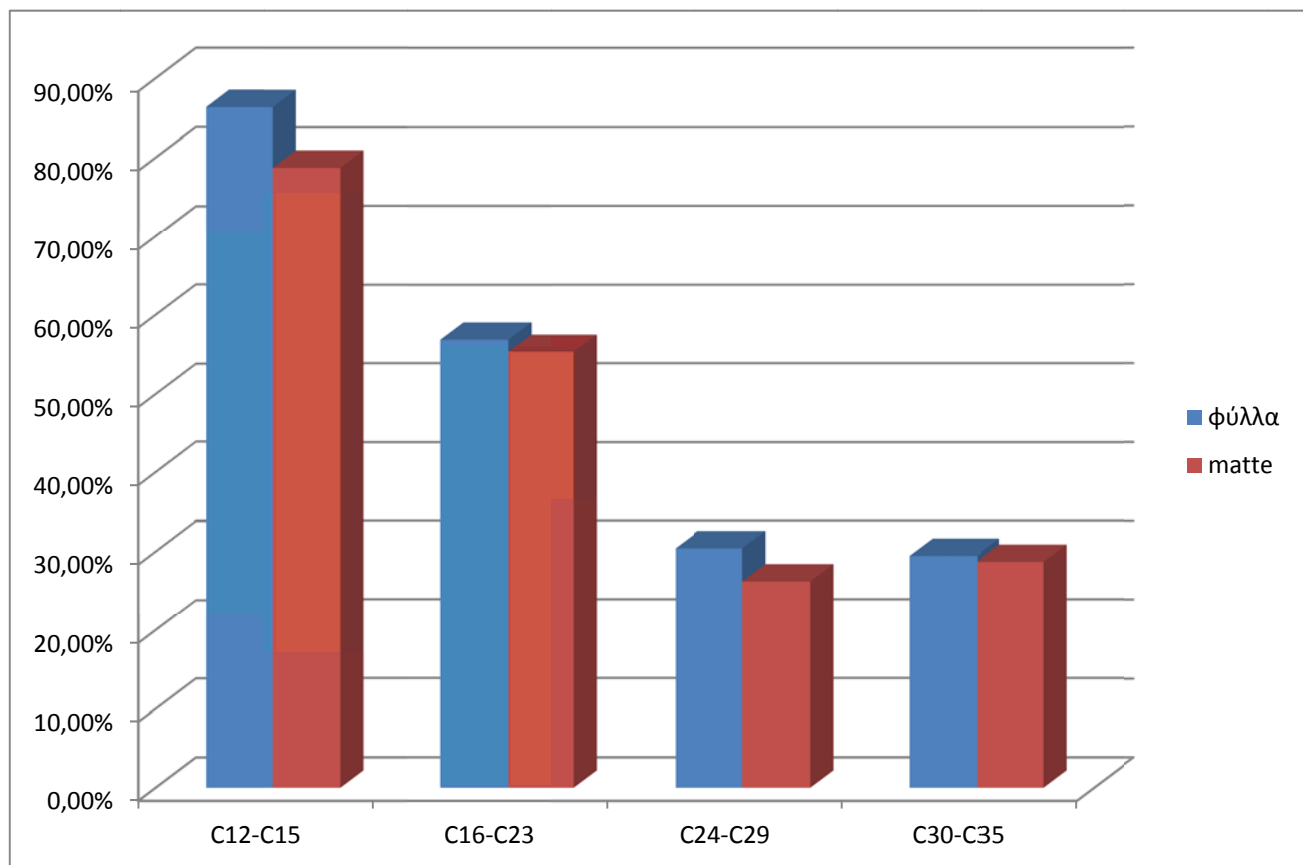
Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες στη πρώτη δειγματοληψία, και συγκεκριμένα το φλορένιο, είχε τη μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση από το δείγμα φύλλα με ποσοστό 97,40%, ενώ το

χαμηλότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ήταν στο φαινανθρένιο από το δείγμα matte με ποσοστό 19,29%. Επιπρόσθετα, στη δεύτερη δειγματοληψία, και συγκεκριμένα για τα αρωματικά, το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ήταν από το δείγμα matte 83,10% στο φλορένιο, ενώ το μικρότερο ποσοστό ήταν 20,55% από το δείγμα φύλλα στο διβενζοθειοφαίνιο. Στην δεύτερη δειγματοληψία, οι μικροοργανισμοί δεν κατάφεραν να βιοαποικοδομήσουν το φαινανθρένιο, πυρένιο και βενζοπυρένιο.

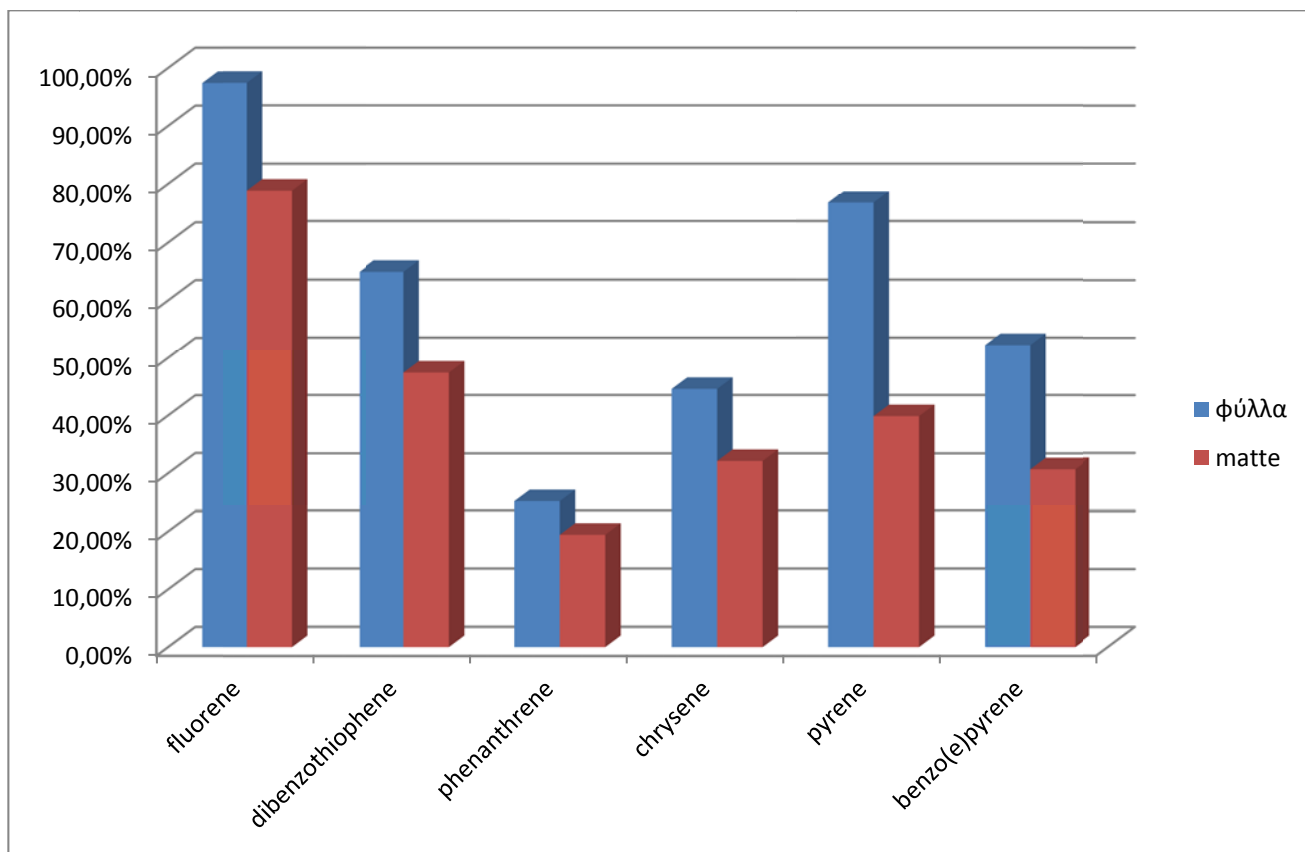
Με βάση το ποσοστό βιοαποικοδόμησης, κατασκευάστηκαν οι πιο κάτω γραφικές παραστάσεις.



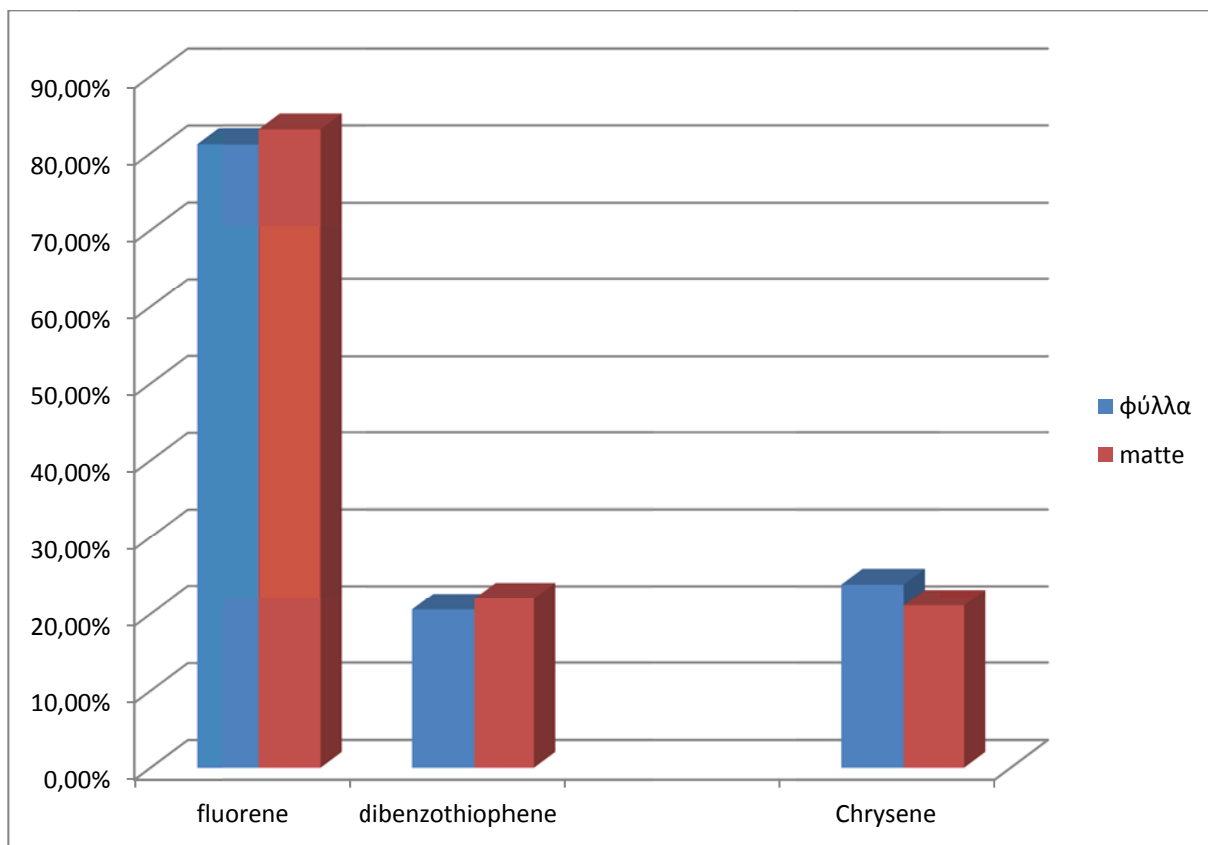
Σχεδιάγραμμα 2: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης κορεσμένων υδρογονανθράκων στη πρώτη δειγματοληψία



Σχεδιάγραμμα 3: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης κορεσμένων υδρογονανθράκων στην δεύτερη δειγματοληψία



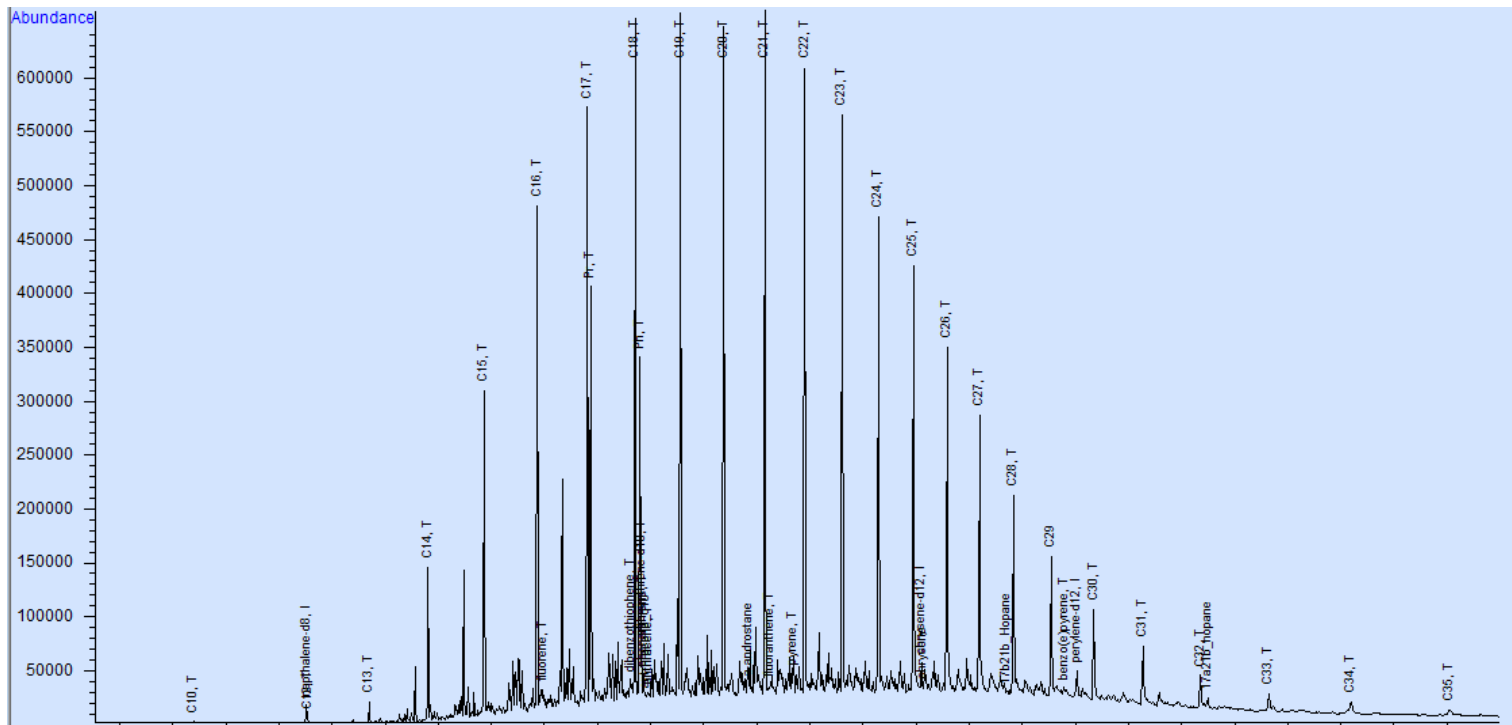
Σχεδιάγραμμα 4: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων στην πρώτη δειγματοληψία



Σχεδιάγραμμα 5: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων στην δεύτερη δειγματοληψία

Λόγω του ότι στην δεύτερη δειγματοληψία το ποσοστό βιοαποικοδόμησης ήταν αρνητικό για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες και συγκεκριμένα για το φαινανθρένιο, πυρένιο και βενζοπυρένιο, δεν λήφθηκαν υπόψη στο σχεδιάγραμμα 6.

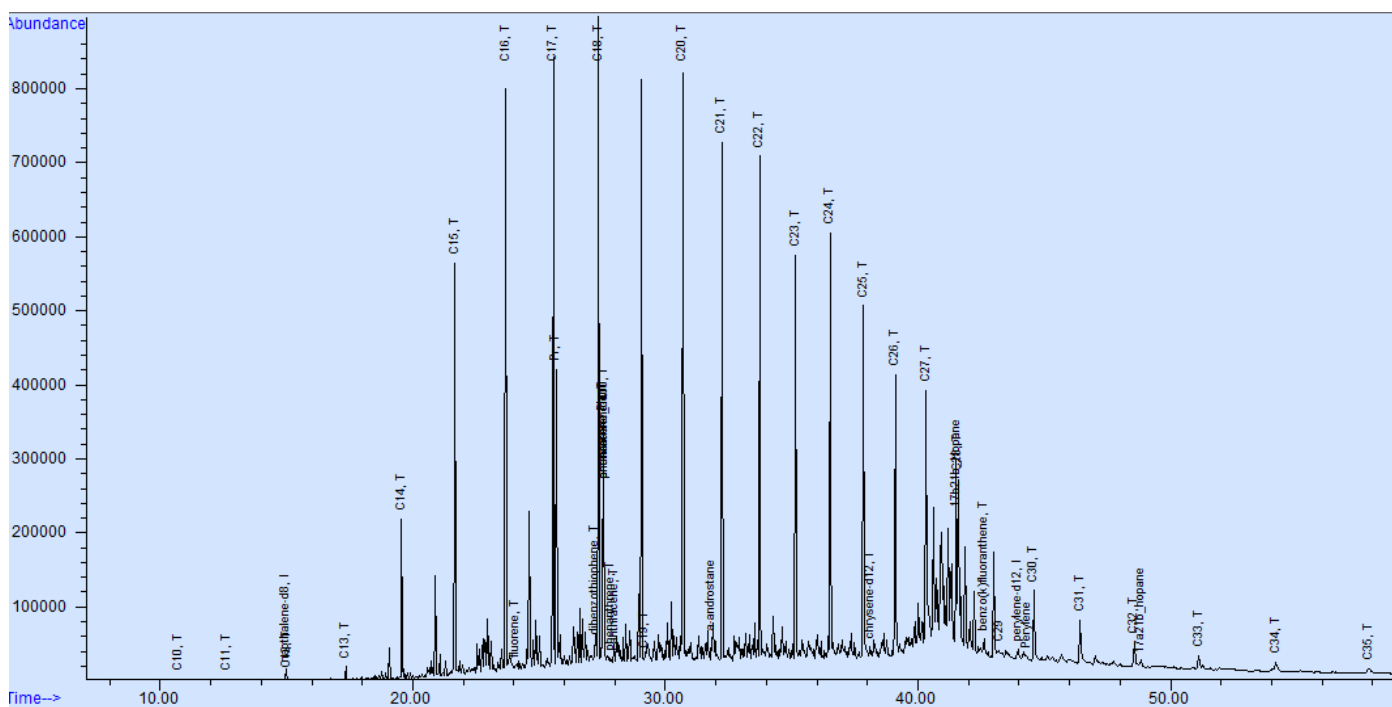
3.3 Ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος matte και πειράματος ελέγχου στη πρώτη δειγματοληψία για κορεσμένους υδρογονάνθρακες



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες

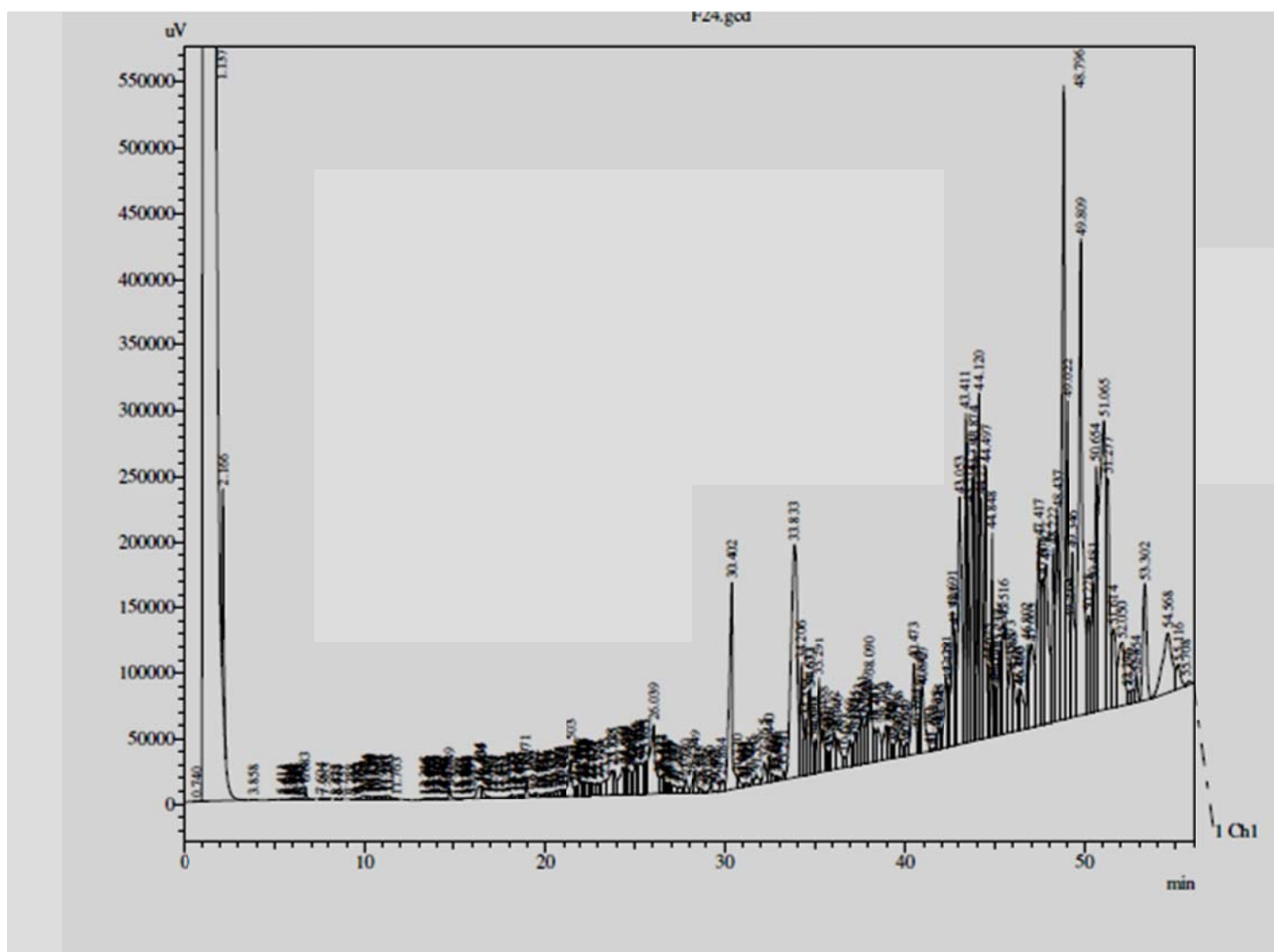


Εικόνα 19: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες

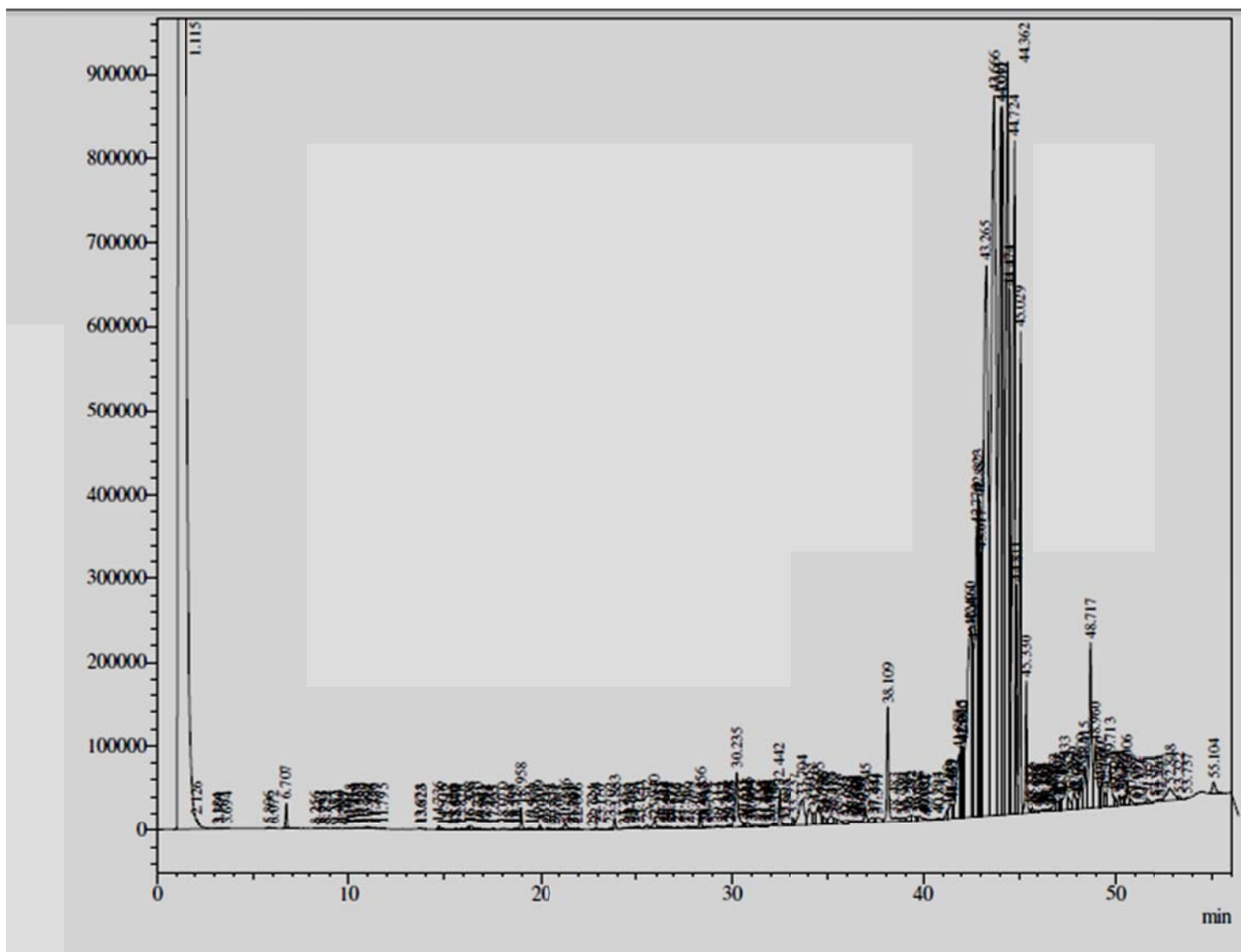
Τα υπόλοιπα χρωματογραφήματα, παρουσιάζονται στο παράρτημα.

3.4 Χρωματογραφήματα αρωματικών υδρογονανθράκων που αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο (GC) μετά τις 28 ημέρες επώασης

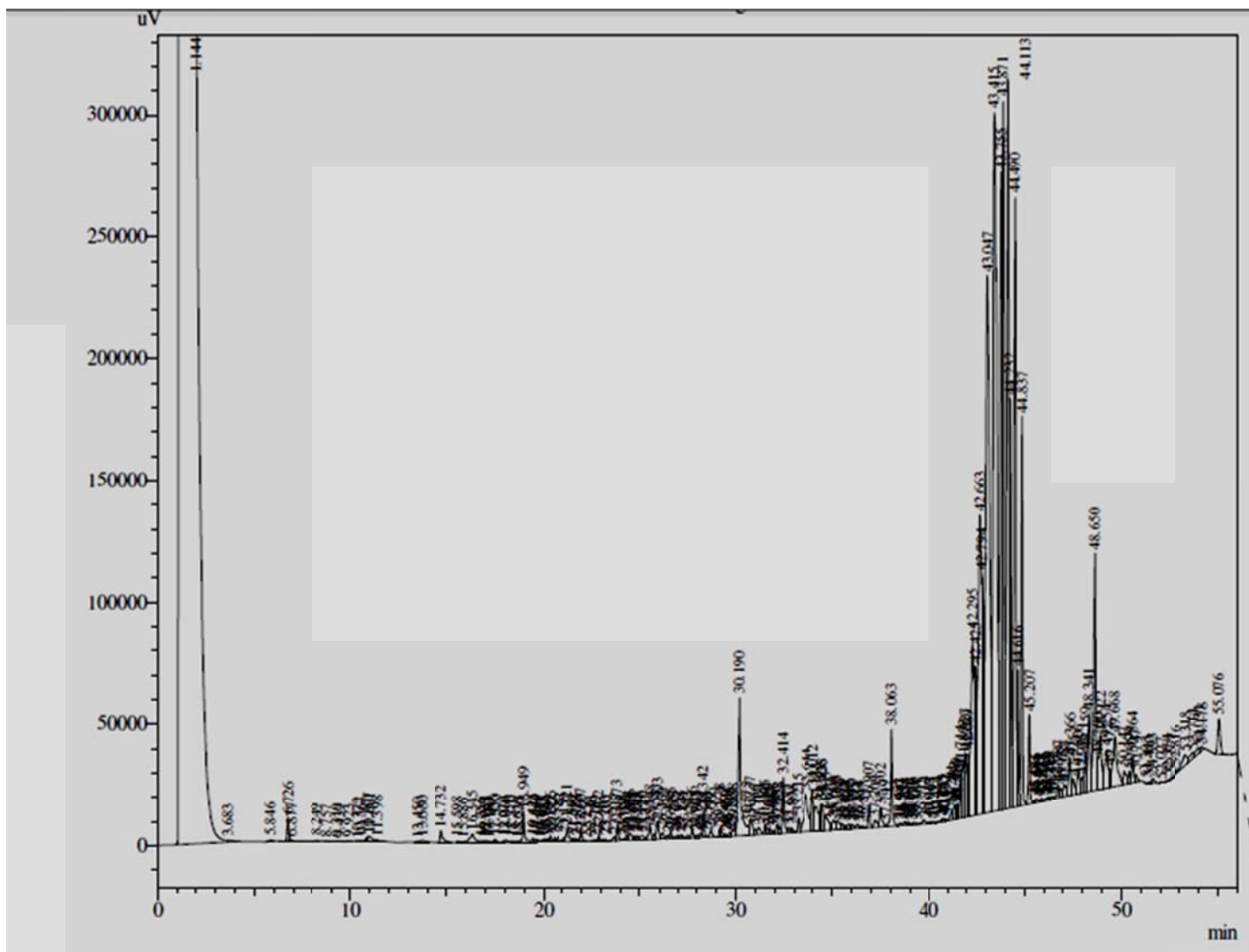
Ο άξονας ψ των χρωματογραφημάτων παρουσιάζει τη συγκέντρωση των συστατικών του δείγματος ενώ ο άξονας χ το χρόνο.



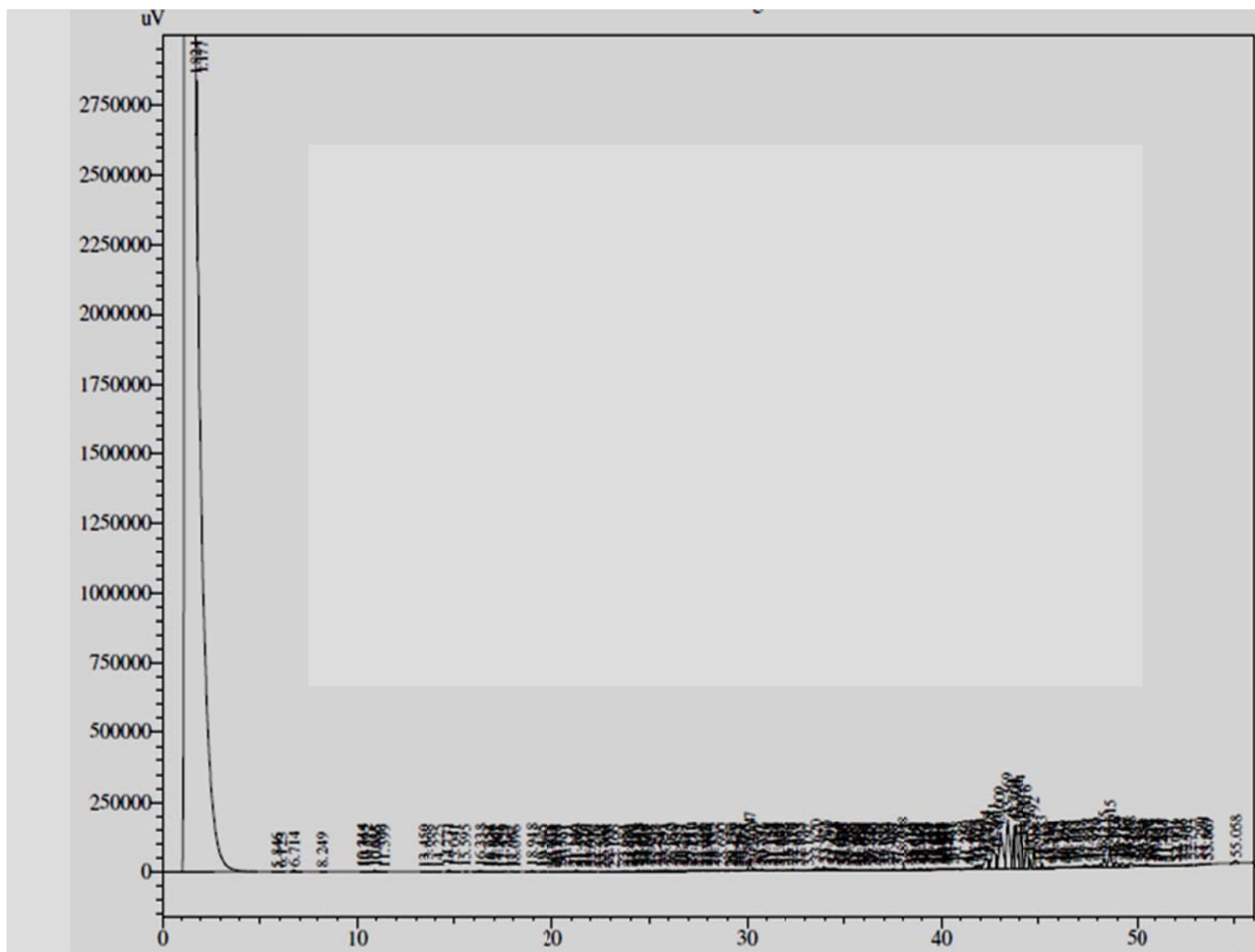
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του πειράματος ελέγχου στη δεύτερη δειγματοληψία



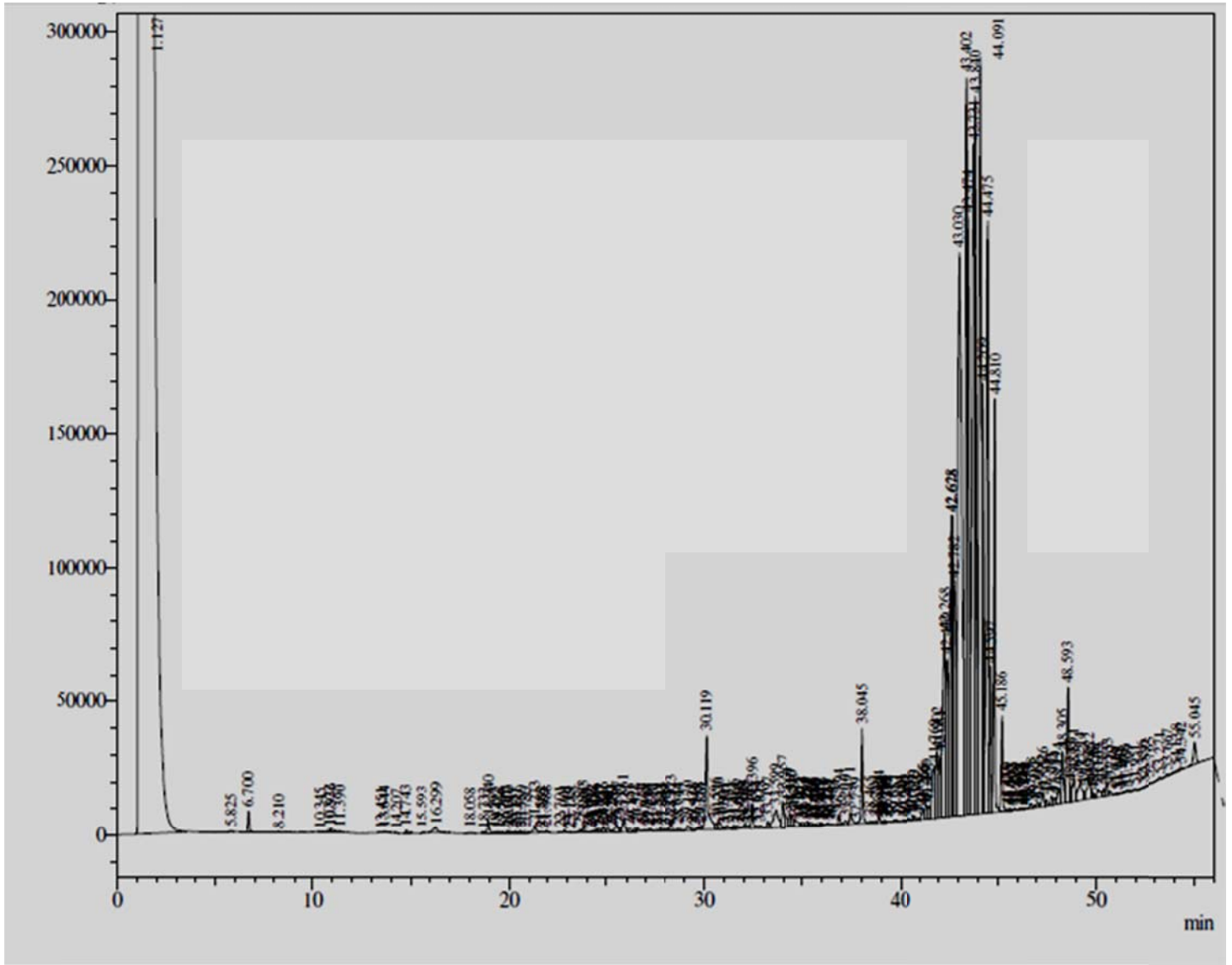
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στη πρώτη δειγματοληψία



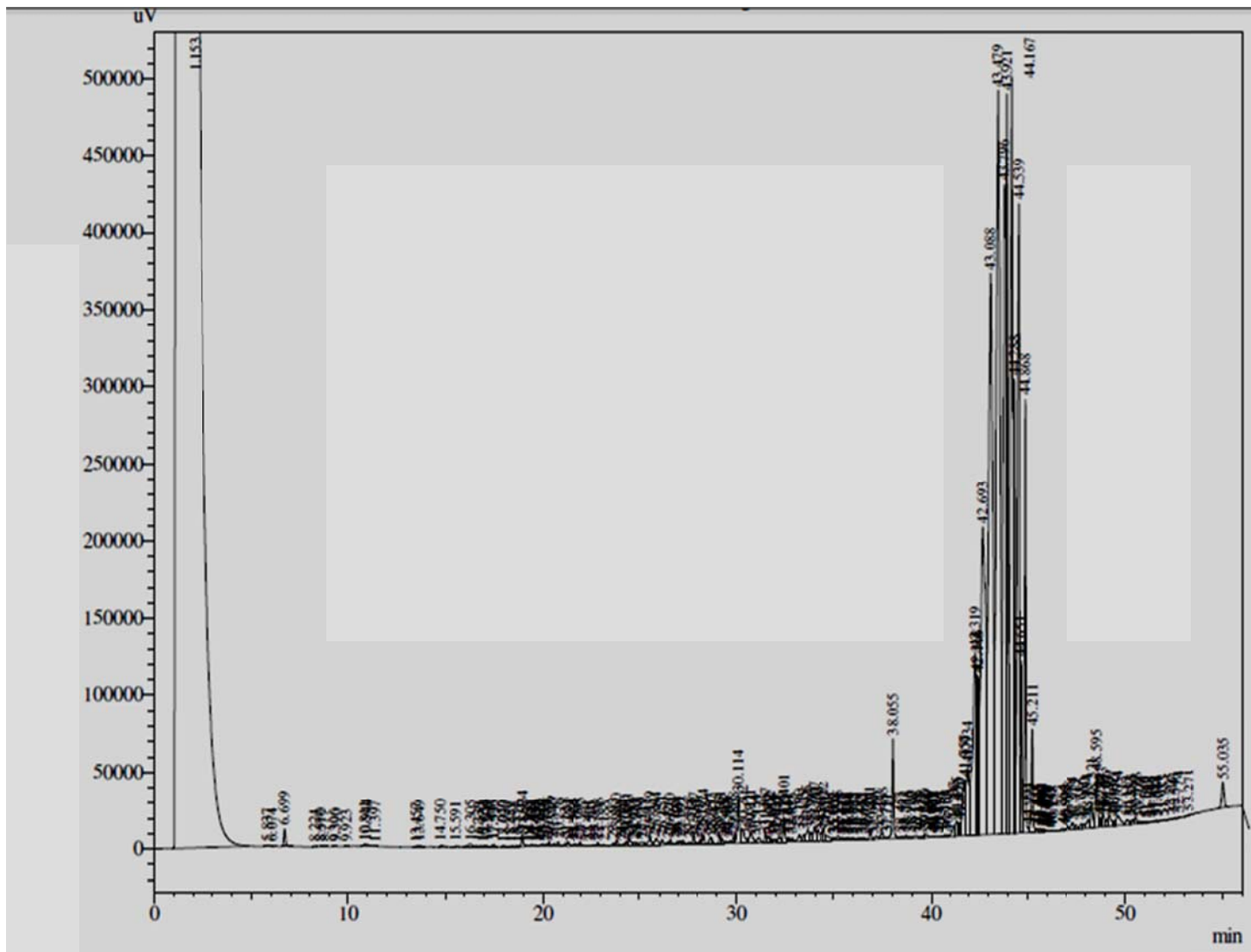
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα του δείγματος φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα του δείγματος matte στη πρώτη δειγματοληψία



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα του δείγματος φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα του δείγματος matte στη δεύτερη δειγματοληψία

Με βάση τα πιο πάνω χρωματογραφήματα που διεξάχθηκαν στον αέριο χρωματογράφο, έχουμε καταλήξει στο ότι αφού οι κορυφές μειώνονται σε σχέση με τα πειράματα ελέγχου, οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να βιοδιασπούν τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Στη συνέχεια στον πίνακα 20 και 21 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των συστατικών που περιέχονται στα δείγματα.

Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχονται στα δείγματα

Δείγμα	ναφθαλένιο	Ακεναφθυλένιο	Ακεναφθένιο	φλορένιο	Φαινανθρένιο + ανθρακένιο	φλορανθένιο
Πείραμα ελέγχου L	102.494	261.594	355.856	553.028	93.301	28.250
Πείραμα ελέγχου C.G	77.878	53.583	40.995	107.320	56.982	29.549
Φύλλα L	74.274	36.670	42.393	86.963	79.385	76.076
Matte C.G	55.379	36.033	26.881	70.048	57.100	46.330
Φύλλα C.G	68.381	48.014	37.173	39.236	54.152	40.945
Matte L	80.031	62.281	51.116	62.719	66.210	77.586

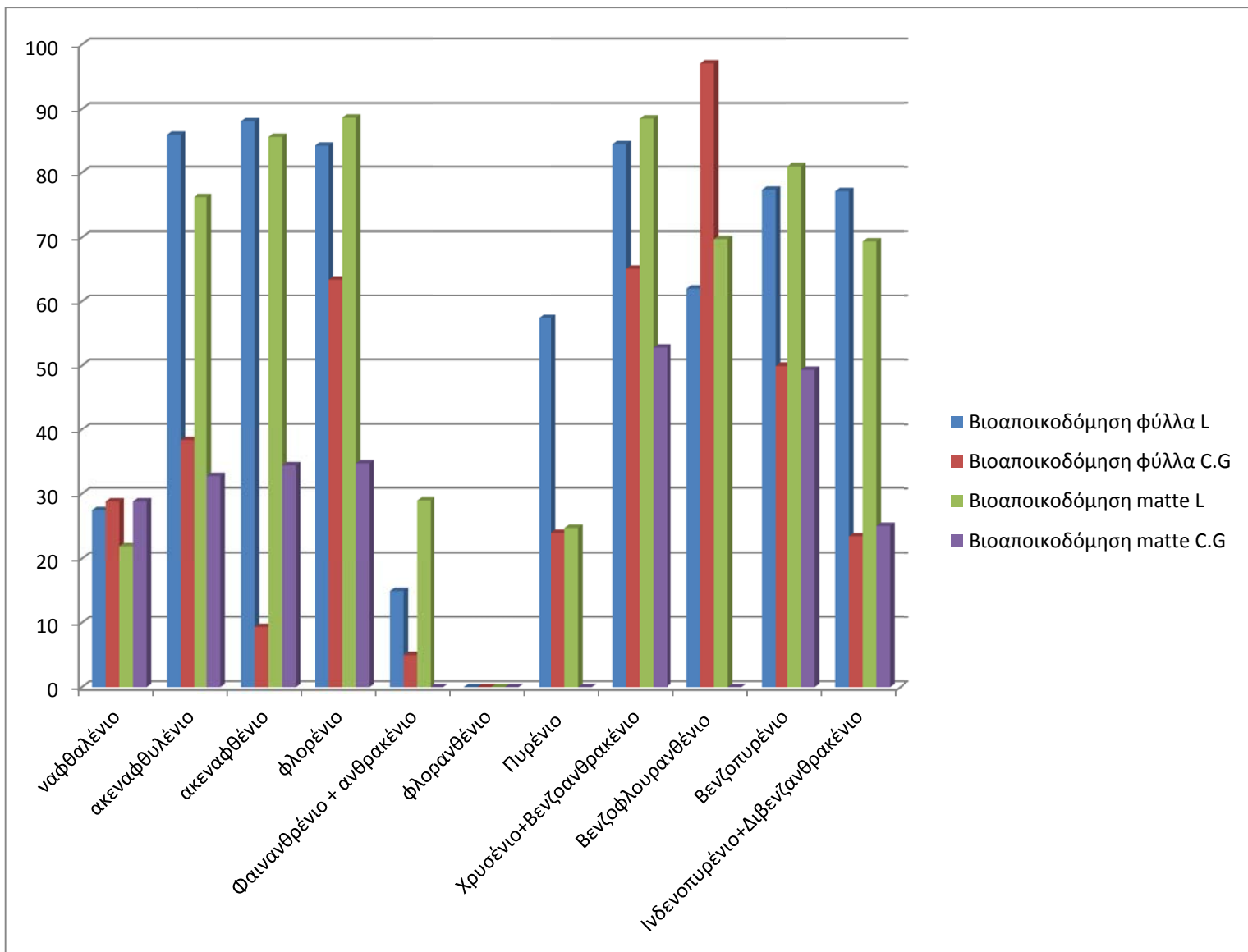
Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχονται στα δείγματα

Δείγμα	Πυρένιο	Χρυσένιο+Βενζοανθρακένιο	Βενζοφλουρανθένιο	Βενζοπυρένιο	Ινδανοπυρένιο+Διβενζανθρακένιο
Πείραμα ελέγχου L	93.879	1032.249	195.167	431.763	248.389
Πείραμα ελέγχου C.G	36.419	257.399	33.979	137.847	75.141
Φύλλα L	42.115	160.043	74.046	97.833	56.829
Matte C.G	41.234	121.526	44.904	69.776	56.281
Φύλλα C.G	27.676	89.746	0.000	68.975	57.497
Matte L	70.624	118.499	59.248	82.223	79.016

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των αρωματικών υδρογονανθράκων με το πείραμα ελέγχου, παρατηρούμε ότι στα περισσότερα δείγματα τα αρωματικά συστατικά έχουν λιγότερη συγκέντρωση από το πείραμα ελέγχου, κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το φυτό *P.oceanica* έχουν την ικανότητα να βιοαποικοδομούν το αργό πετρέλαιο. Σε κάποιες περιπτώσεις η συγκέντρωση των αρωματικών συστατικών είναι μεγαλύτερη από το πείραμα ελέγχου (κόκκινες τιμές). Σε αυτές τις περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί δεν κατάφεραν να καταναλώσουν το αρωματικό κλάσμα.

Πίνακας 22: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων

Αρωματικά	Βιοαποικοδ όμηση φύλλα L	Βιοαποικοδ όμηση φύλλα C.G	Βιοαποικοδ όμηση matte L	Βιοαποικοδ όμηση matte C.G
Ναφθαλένιο	27,53	28,89	21,91	28,89
Ακεναφθυλένιο	85,98	38,34	76,19	32,75
Ακεναφθένιο	88,08	9,32	85,63	34,42
Φλορένιο	84,27	63,44	88,65	34,72
Φαινανθρένιο + ανθρακένιο	14,91	4,96	29,03	0
Φλορανθένιο	0	0	0	0
Πυρένιο	57,40	24	24,77	0
Χρυσένιο+Βενζοανθρ ακένιο	84,49	65,13	88,52	52,78
Βενζοφλουρανθένιο	62,06	97,05	69,72	0
Βενζοπυρένιο	77,34	49,96	80,95	49,38
Ινδενοπυρένιο+Διβεν ζανθρακένιο	77,12	23,48	69,39	25,09



Σχεδιάγραμμα 6: Ποσοστό βιοαποικοδόμησης αρωματικών υδρογονανθράκων

Συγκρίνοντας το ποσοστό βιοαποικοδόμησης των αρωματικών υδρογονανθράκων που αναλύθηκαν με τον αέριο χρωματογράφο και φασματογράφο μάζας σε σχέση με τον αέριο χρωματογράφο παρατηρείται ότι για τον αρωματικό υδρογονάνθρακα φλορένιο το ποσοστό είναι περίπου ίδιο. Τα ποσοστά όμως των υδρογονανθράκων πυρένιο και βενζοπυρένιο διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό και αυτό ίσως να οφείλεται στη διαφορετική ευαισθησία του οργάνου αλλά και στο ότι είχαμε 3 επαναλήψεις δειγμάτων άρα 3 διαφορετικά πειράματα.

3.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων με παρόμοιες έρευνες

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, απελευθερώνονται στο θαλάσσιο περιβάλλον μεγάλες ποσότητες πετρελαιοκηλίδων που αποτελούν κίνδυνο για τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Για αυτό η ανάγκη για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων είναι αξιοσημείωτη. Η φυσική συλλογή με προσροφητικά υλικά, πλωτά φράγματα κ.α έχουν αποδειχθεί ως μη αποτελεσματικές (Barríos 2011). Η μέθοδος της βιοαποκατάστασης με τη χρήση μικροοργανισμών, εγγυάται την αποκατάσταση των κατεστραμμένων οικοσυστημάτων αξιοποιώντας τις μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών. Η μέθοδος της βιοαποκατάστασης έχει δύο κύριες στρατηγικές, την προσθήκη θρεπτικών συστατικών καθώς και την εισαγωγή βιώσιμων μικροοργανισμών (Nikolopoulou & Kalogerakis 2008).

Συμπερασματικά οι ενώσεις του πετρελαίου αλλά και άλλοι οργανικοί ρύποι έχουν συσσωρευτεί σε μεγάλο βαθμό στα υδάτινα νερά, και έτσι καλείται επιτακτική ανάγκη να αποκατασταθούν με βιολογικές μεθόδους που αποτελούν την πιο φθηνή, φιλική προς το περιβάλλον αλλά και αποτελεσματική λύση. Συγκεκριμένα, περιέχουν μια πολύπλοκη και ισχυρή ένωση την λιγνίνη η οποία είναι δυνατό να διασπαστεί μέσω μυκήτων και βακτηρίων που παράγουν τα λιγνολυτικά ένζυμα, την λακκάση, την υπεροξειδάση και την μανγκανάση. Τα ένζυμα αυτά έχουν ευρεία εφαρμογή γιατί έχουν την δυνατότητα να διασπούν διοξίνες, πολυχλωριομένα διφαινύλια, υδρογονάνθρακες πετρελαίου, βιομηχανικά απόβλητα βαφής, ζιζανιοκτόνα και φυτοφάρμακα (Behnood et al. 2013).

Σύμφωνα με μια μεταπτυχιακή διατριβή όπου έχει ακολουθηθεί παρόμοια μεθοδολογία έχει συνδυάσει λιπόφιλα θρεπτικά συστατικά όπως είναι το ουρικό οξύ και η λεκινθίνη μαζί με επιφανειοδραστικές ενώσεις βιολογικής προέλευσης (ραμνολιπίδια) καθώς και μελάσα. Αυτό που έχει επιτύχει είναι η ενίσχυση του πληθυσμού των μικροβιακών βιοαποικοδομητών υδρογονανθρακών καθώς και στη μετέπειτα αυξημένη απομάκρυνση των κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων. Το αποτέλεσμα από την μεταπτυχιακή διατριβή ήταν ότι ο συνδυασμός ουρικού οξέος είχε απομάκρυνση αλκανίων 83%, ο συνδυασμός ουρικού οξέος με λεκινθίνη και ραμνολιπίδια είχε απομάκρυνση αλκανίων 96% και τέλος ο συνδυασμός ουρικού οξέος, λεκινθίνης, ραμνολιπιδίων και μελάσας είχε απομάκρυνση 83%. (Νικολοπούλου 2005). Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν επίσης θρεπτικά συστατικά, το NaNO_3 και K_2HPO_4 ούτως ώστε να ενισχυθεί η δράση των μικροοργανισμών

και να βιοαποικοδομήσουν τους κορεσμένους και αρωματικούς υδρογονάνθρακες του αργού πετρελαίου όπως και επιτεύχθηκε σε κάποιο βαθμό.

Επιπρόσθετα σε παρόμοια μελέτη, όπου δεν χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά συστατικά για την ενίσχυση του μικροβιακού πληθυσμού, αλλά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της βιοενίσχυσης δηλαδή της προσθήκης μικροοργανισμών. Έτσι παρατηρήθηκε σε δείγμα το οποίο περιείχε διπλάσια ποσότητα αρχικού πληθυσμού σε σχέση με αυτή των άλλων δειγμάτων, ότι εμφανίζεται επίσης αργή και αδύναμη η βιοαποικοδόμηση τόσο των κορεσμένων όσο και αρωματικών υδρογονανθράκων. Με την συγκεκριμένη παρατήρηση συμπεραίνεται ότι οι μικροοργανισμοί-βιοαποδομητές αργούν να ενεργοποιηθούν και αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι δεν προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά στα δείγματα ούτως ώστε να τα καταναλώσουν οι μικροοργανισμοί και ενεργοποιηθούν σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια (C14-C20) ενώ για τα μεσαίου μοριακού βάρους συστατικά (C21-C30) η μείωση της ποσότητας τους είναι αισθητά μικρότερη. Τέλος, τα μεγάλου μοριακού βάρους συστατικά (C31-C35) δεν εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερη μείωση (Μητροπούλου 2014.). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, στην δεύτερη δειγματοληψία το δείγμα φύλλα ακολουθεί την ίδια πορεία βιοαποικοδόμησης των κορεσμένων υδρογονανθράκων με την έρευνα, δηλαδή τη μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση έχουν τα μικρού μοριακού βάρους συστατικά (C12-C15) και τη μικρότερη τα μεγαλύτερου βάρους συστατικά (C30-C35). Το δείγμα matte στη δεύτερη δειγματοληψία έχει τη μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση στα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια (C12-C15), ακολουθούν C16-C23, C30-C35, και τέλος τη μικρότερη βιοαποικοδόμηση οι άνθρακες C24-C29. Όσον αφορά τη πρώτη δειγματοληψία, το δείγμα φύλλα έχει τη μέγιστη βιοαποικοδόμηση στα συστατικά C24-C29, ακολουθούν C16-C23, C30-C35 και C12-C15. Το δείγμα matte στη πρώτη δειγματοληψία έχει μέγιστη βιοαποικοδόμηση στα χαμηλού μοριακού βάρους αλκάνια C12-C15, και ακολουθούν C24-C29, C16-C23, και τέλος τα μεγαλύτερα μοριακού βάρους αλκάνια C30-C35.

Ακόμη, σε διπλωματική έρευνα στην οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της βιοεξυγίανσης με βιοδιέγερση δηλαδή με προσθήκη θρεπτικών συστατικών για την βιοαποικοδόμηση μαζούτ, παρατηρήθηκε ότι στο αρωματικό κλάσμα δεν υπήρχε ιδιαίτερη απομάκρυνση σε σχέση με την απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων. Λόγω όμως του ότι χρησιμοποιήθηκε παλαιό πετρέλαιο κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ως ένα βαθμό το πετρέλαιο είχε ήδη υποστεί σταδιακή γήρανση με την πάροδο του χρόνου (Ελενη 2015).

Στην συγκεκριμένη διπλωματική, χρησιμοποιήθηκε επίσης η εκτίμηση του βαθμού βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου μέσω της βιοδιέγερσης και παρατηρήθηκε επίσης μεγαλύτερη απομάκρυνση των κορεσμένων υδρογονανθράκων σε σχέση με το αρωματικό κλάσμα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της δεύτερης δειγματοληψίας όπου κάποια δείγματα παρουσίασαν μηδενική βιοαποικοδόμηση στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Επίσης, σε άρθρο, για την βιοαποικοδόμηση του αργού πετρελαίου χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Phanerochate chrysosporium* ο οποίος έχει την ικανότητα να απομακρύνει ένα ευρύ φάσμα ρύπων. Στα δείγματα προστέθηκαν οι επιφανειοδραστικές ουσίες Tween 20, NAR-111-2 ούτως ώστε να ενισχυθεί η βιοαποικοδόμηση καθώς υπήρχαν και διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας χρησιμοποιήθηκαν για να ερευνηθεί αν έχει επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τελικό αποτέλεσμα της έρευνας είναι ότι ο μύκητας *Phanerochate chrysosporium*, έχει την ικανότητα να απομακρύνει το αργό πετρέλαιο από αλατούχα λύματα και ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Behnood et al. 2013).

Σε ένα άλλο άρθρο στο οποίο μελετήθηκε η βιοαποικοδόμηση του αργού πετρελαίου, αρχικά απομονώθηκαν μικροοργανισμοί από μολυσμένη άμμο με πετρέλαιο και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με οργανικά θρεπτικά συστατικά (ουρικό οξύ και λεκινθίνη). Για να ελεγχθεί αν έχουν απομακρυνθεί οι κορεσμένοι και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων με αέριο χρωματογράφο και φασματογράφο μάζας. Οι συγκεντρώσεις διορθώθηκαν με τη συγκέντρωση του χοπανίου όπως πραγματοποιήθηκε και στις συγκεντρώσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ο οποίος αποτελεί δείκτη βιοαποικοδόμησης από τους μικροοργανισμούς και όχι από οποιοδήποτε άλλο παράγοντα. Μέσω της ανάλυσης, διαπιστώθηκε ότι το κορεσμένο κλάσμα διασπάται πιο εκτεταμένα από το αρωματικό, και ότι η προσθήκη θρεπτικών συστατικών είναι αποτελεσματική εφόσον ενίσχυσε σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες από C12-C35 έχουν υποβαθμιστεί περισσότερο από 97% και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες περισσότερο από 95% (Nikolopoulou & Kalogerakis 2008). Στην παρούσα διπλωματική, έχουν υποβαθμιστεί επίσης περισσότερο οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες σε σχέση με τους αρωματικούς όπως προαναφέρθηκε.

Ακόμη, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με στόχο την απομάκρυνση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων χρησιμοποιήθηκε ο θαλάσσιος μικροοργανισμός *Achromobacter xylosoxidans*, σε συνδυασμό με την επιφανειοδραστική ουσία Triton X-100 και την β-κυκλοδεξτρίνη ως διαλυτοποιητή των υδρογονανθράκων. Η ουσία Triton X-100 οδήγησε σε αύξηση στην αποδόμηση χαμηλού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων κατά 2,8 φορές ενώ αντίστοιχα η β-κυκλοδεξτρίνη κατά 1,4 φορές. Η αποδόμηση του υψηλού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων αυξήθηκε κατά 7,59 και 2,23 φορές από Triton X-100 και β-κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα (Dave et al. 2014). Στην διπλωματική, ο αρωματικός υδρογονάνθρακας φλορένιο έχει τη μέγιστη βιοαποικοδόμηση και από το δείγμα φύλλα και από matte τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη δειγματοληψία. Στην πρώτη δειγματοληψία έχει ποσοστό βιοαποικοδόμηση 97,40% από το δείγμα φύλλα και 78,83% από το δείγμα matte. Στη δεύτερη δειγματοληψία το φλορένιο είχε βαθμό βιοαποικοδόμησης 81,20% από το δείγμα φύλλα και 83,10% από το δείγμα matte.

Επιπλέον, σε άρθρο που έχει δημοσιευτεί, αναφέρεται στη βιοαποικοδόμηση του ντίζελ με μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από την ερυθρά θάλασσα της Σαουδικής Αραβίας. Τα στελέχη μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν είναι *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Eupenicillium hirayamae*, *Paecilomyces variotii*, τα οποία όταν χρησιμοποιούνται μαζί ως κοινοπραξία, δρουν συνεργιστικά και όχι ανταγωνιστικά με αποτέλεσμα να διασπώνται οι κύριοι υδρογονάνθρακες που υπάρχουν στο καύσιμο ντίζελ. Η μεγαλύτερη υποβάθμιση των υδρογονανθράκων ήταν από τονμύκητα *Cladosporium* με ποσοστό 34% μετά το πέρας των πέντε ημερών (Ameen et al. 2015). Στην συγκεκριμένη διπλωματική έχει χρησιμοποιηθεί κοινότητα μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το φυτό *P.oceanica*. Με βάση τα αποτελέσματα, έχει διεξαχθεί το αποτέλεσμα ότι δρουν αθροιστικά για την κατανάλωση του αργού πετρελαίου.

Σε παρόμοια έρευνα, στόχος ήταν η βιοαποικοδόμηση του αργού πετρελαίου από τους μικροοργανισμούς *Bacillus subtilis* DM-04 και *Pseudomonas aeruginosa* Μ οι οποίοι χρησιμοποιούν τους υδρογονάνθρακες ως μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η ανάλυση με αέριο χρωματογράφο έδειξε ότι το επίπεδο των αλκανίων μειώνεται. Συμπερασματικά, τα πιο πάνω στελέχη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικής αποκατάστασης χώρους μολυσμένους από υδρογονάνθρακες αργού πετρελαίου (Das & Mukherjee 2007).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το φυτό *P.Oceanica* για βιοαποικοδόμηση του αργού πετρελαίου.

- Η βιοδιάσπαση των συστατικών του πετρελαίου αποδείχθηκε επιτυχής συγκρίνοντας τα δείγματα με το πείραμα ελέγχου το οποίο δεν περιείχε ποσότητα μικροοργανισμών. Μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρξε σφάλμα και αυτό ίσως να οφείλεται κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.
- Η χρησιμοποίηση θρεπτικών συστατικών για την ενίσχυση της μικροβιακής κοινότητας αποδείχθηκε αποτελεσματική για την βιοδιάσπαση των κορεσμένων και αρωματικών υδρογονανθράκων σε σύγκριση με άλλες έρευνες όπου δεν χρησιμοποιήθηκαν. Η έξυγιανση του θαλάσσιου περιβάλλοντος μέσω της βιοενίσχυσης δηλαδή μέσω της προσθήκης μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να βιοδιασπών το πετρέλαιο έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική από μόνη της.
- Επιπρόσθετα, μέσω της συγκεκριμένης πτυχιακής διατριβής, έχω διδαχθεί σημαντικές γνώσεις καθώς επίσης έχω αποκτήσει εμπειρίες όσον αφορά την εκτέλεση πειραμάτων σε εργαστηριακό χώρο.
- Τελειώνοντας, θα ήθελα να επιστήσω την προσοχή σας στη μέθοδο της βιοδιέγερσης που αναπτύχθηκε στη παρούσα εργασία, λέγοντας ότι μπορεί να ανταγωνιστεί τα συμβατικές μεθόδους και να εξελιχθεί σε μιας πρώτης επιλογής μεθόδου για την αντιμετώπιση των πετρελαιοκηλίδων.

Μέρος των αποτελεσμάτων θα παρουσιαστούν στο 10^ο συνέδριο του International Society for Environmental Biotechnology στην Βαρκελώνη στις 1-3 Ιουνίου 2016 σε ομιλία με τίτλο Unravelling the biodegradation potential of PAHs of marine microbial consortium isolated from *Posidonia oceanica* of Cyprus.

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη εργασία, θα πρότεινα τη χρήση λιπόφιλων λιπασμάτων καθώς και επιφανειοδραστικών ουσιών στα δείγματα για μελλοντική έρευνα. Η σύζευξη των λιπόφιλων λιπασμάτων και των επιφανειοδραστικών ουσιών έχουν την ικανότητα να διασπείρουν το αργό πετρέλαιο, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τη διεπιφάνεια ύδατος-πετρελαίου και έτσι οι μικροοργανισμοί μπορούν να δράσουν πιο εύκολα και να το βιοδιασπάσουν. Επίσης σημαντικό θα ήταν να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να διασπών τους συγκεκριμένους υδρογονάνθρακες εφόσον έχει ήδη πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA των δειγμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βλάχος, Γ. Π., (2007). Εμπορική ναυτιλία και θαλάσσιο περιβάλλον, Εκδόσεις Αθ.Σταμούλης, Αθήνα,σ 695
- Adekunle, A.A. & Adebambo, O.A., 2007. Petroleum Hydrocarbon Utilization by Fungi Isolated From *Detarium Senegalense* (J . F Gmelin) Seeds. , 3(1).
- Ameen, F., Moslem, M. & Hadi, S., 2015. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X15000765>.
- Anon, Deepwater Horizon and the Gulf oil spill - the key questions answered | Environment | The Guardian. Available at: <http://www.theguardian.com/environment/2011/apr/20/deepwater-horizon-key-questions-answered> [Accessed April 23, 2016].
- Atlas, R.M. et al., 2015. Oil Biodegradation and Oil-Degrading Microbial Populations in Marsh Sediments Impacted by Oil from the Deepwater Horizon Well Blowout. *Environmental Science and Technology*, 49(14), pp.8356–8366.
- Barrios, Y., 2011. Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotechnologia Aplicada*, 28(2), pp.69–76.
- Behnood, M., Nasernejad, B. & Nikazar, M., 2013. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.007>.
- Das, K. & Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7).
- Dave, B.P. et al., 2014. Enhanced biodegradation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) by marine halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Triton X-100 and β -cyclodextrin - A microcosm approach. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.027>.
- Dave, D. & Ghaly, a. E., 2011. Remediation Technologies for Marine Oil Spills : A Critical Review and Comparative Analysis D . Dave and A . E . Ghaly Department of Process Engineering and Applied Science , Faculty of Engineering , Dalhousie University , Halifax ,

- Nova Scotia , Canada. *American Journal of Environmental Sciences*, 7(5), pp.423–440.
- Ekundayo, F.O., Olukunle, O.F. & Ekundayo, E.A., 2012. Biodegradation of Bonnylight crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, ondo state. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(1).
- Enviropaedia, Exxon Valdez Disaster | Sustainable Development & Environmental Awareness. Available at: http://www.enviropaedia.com/topic/default.php?topic_id=106 [Accessed April 23, 2016].
- EPA, 1999. *Understanding oil spills and oil response*,
- Esin Eraydin Erdoğan, 2012. Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 11(21).
- Garshelis, D.L. & Johnson, C.B., 2013. Prolonged recovery of sea otters from the Exxon Valdez oil spill? a re-examination of the evidence. *Marine Pollution Bulletin*, 71(1-2), pp.7–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.027>.
- Hassanshahian, M. & Cappello, S., 2013. Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. In *Biodegradation - Engineering and Technology*. pp. 101–135.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G. & Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 64(1). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.006>.
- ITOPF, 2011. Fate of Marine Oil Spills. *International Tanker Owners Pollution Federation Limited*.
- ITOPF, 2015. Oil Tanker Spill Statistics 2015. Available at: <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/> [Accessed April 19, 2016].
- Khan, S.R. et al., 2015. Enzymatic Evaluation During Biodegradation of Kerosene and Diesel by Locally Isolated Fungi from Petroleum-Contaminated Soils of Western India. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 24(5). Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15320383.2015.985783>.
- Larkum; Anthony; Orth; Robert J.; Duarte; Carlos, 2006. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Available at: <http://www.springer.com/us/book/9781402029424> [Accessed April 23, 2016].

- Leahy, J.G. & Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), pp.305–315.
- Mohamed I. A. Ali, 2012. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(16).
- Nikolopoulou, M. et al., 2013. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.038>.
- Nikolopoulou, M. & Kalogerakis, N., 2008a. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56(11), pp.1855–1861.
- Nikolopoulou, M. & Kalogerakis, N., 2008b. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56(11).
- Oil, M. & May, S., 1991. Bioremediation for Marine Oil Spills May 1991. *Office*, (May).
- Redondo, J.M. & Platonov, A.K., 2009. Self-similar distribution of oil spills in European coastal waters. *Environmental Research Letters*, 4(1), p.014008. Available at: <http://iopscience.iop.org/1748-9326/4/1/014008/fulltext/> [Accessed March 22, 2016].
- Register, O. of T.F., IntraWEB, E. by & LLC, 2014. *Title 40 Protection of Environment Parts 300 to 399 (Revised as of July 1, 2013): 40-CFR-Vol-29*, IntraWEB, LLC. Available at: <https://books.google.com/books?id=XAkJBAAQBAJ&pgis=1> [Accessed April 26, 2016].
- Response, H.M. & Division, A., 1994. OIL Options for Minimizing Environmental Impacts of Options for Minimizing Environmental Impacts of. , (June).
- Ruiz, M., Pasadakis, N. & Kalogerakis, N., 2006. Bioremediation and toxicity determination of natural seawater polluted with weathered crude oil by salt-tolerant consortia in a SBR. *Marine Pollution Bulletin*, 52(11).
- Swannell, R.P., Lee, K. & McDonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. In *Microbiological reviews*. pp. 342–365.
- Taylor, J.D. & Cunliffe, M., 2015. Polychaete burrows harbour distinct microbial communities in oil-contaminated coastal sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 7, p.n/a–n/a.

Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12292>.

Telesca, L. et al., 2015. Seagrass meadows (*Posidonia oceanica*) distribution and trajectories of change. *Scientific reports*, 5, p.12505. Available at: <http://www.nature.com/srep/2015/150728/srep12505/full/srep12505.html> [Accessed April 23, 2016].

Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L., King, D.W., and Holder, E., 1996. *Guidelines for the bioremediation of oilcontaminated salt marshes Xueqing Zhu, et al.*, DIANE Publishing. Available at: <https://books.google.com/books?id=moCZaTTVWukC&pgis=1> [Accessed April 23, 2016].

Zhu, X., Venosa, A.D. & Suidan, M.T., 2004. *Literature review on the use of bioremediation agents for cleanup of oilcontaminated estuarine environments*, DIANE Publishing. Available at: <https://books.google.com/books?id=JfMMx07oJ4wC&pgis=1> [Accessed April 23, 2016].

ΒΗΘΛΕΕΜ, Ν., 2009. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΗΤΡΙΚΩΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΧΩΡΟΥ.

Ελενη, Σ., 2015. Αποδομηση βαρεων υδρογονανθρακων απο διαρροες μαζουτ στη θαλασσια περιοχη κερατσινιου.

Κωνσταντίνος, Κ., 2008. Μοντέλο Τύχης / Γήρανσης Κηλίδων Πετρελαίου.

Μητροπουλου, Ο.Κ., « Εξέταση αποτελεσματικότητας της βιοαποδόμησης πετρελαιοειδών από τρία μικροβιακά κονσόρσια από τον κόλπο της Ελευσίνας ».

Νικολοπούλου, Μ., 2005. Ενισχυμένη Βιοδιέγερση Εγγενών Θαλάσσιων Μικροοργανισμών με τη Χρήση Λιπόφιλων Λιπασμάτων σε Συνδυασμό με Επιφανειοδραστικές Βιολογικές Ουσίες για Αποικοδόμηση Πετρελαιοκηλίδων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ούτως ώστε από τη συγκέντρωση σε ppm που έχουμε αρχικά, να μετατραπεί σε ng/mg αργού πετρελαίου.

Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία

ppm αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Φύλλα 1 C.G	Φύλλα 2 C.G	Φύλλα 3 C.G	Πείραμα α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,11	0,44	0,13	0,14
C13	0,51	8,15	0,74	2,50
C14	7,67	23,12	6,82	13,66
C15	28,78	32,28	22,05	26,20
C16	38,83	26,82	28,34	27,11
C17	43,81	25,56	31,21	25,83
Pr	21,78	21,53	26,81	13,87
C18	44,07	25,74	33,49	25,38
Ph	19,16	17,84	22,57	11,31
C19	39,36	25,21	30,21	21,31
C20	41,77	27,17	34,13	22,92
C21	36,50	24,85	29,55	19,73
C22	32,45	21,95	27,52	18,91
C23	28,59	21,07	24,43	15,73

C24	27,08	19,64	20,44	13,64
C25	22,29	19,42	17,69	11,13
C26	18,05	15,39	15,76	9,19
C27	14,66	12,18	11,25	31,09
C28	5,74	9,56	7,44	28,58
C29	9,86	7,39	8,42	5,28
C30	13,97	9,29	8,64	6,47
C31	9,68	6,19	6,72	4,70
C32	5,43	3,93	5,21	3,33
C33	4,77	0,26	4,06	2,36
C34	2,80	3,06	2,91	1,59
C35	2,96	1,95	2,25	1,32
Χοπάνιο	1,37	1,16	1,18	0,54

Πίνακας 24: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην πρώτη δειγματοληψία

ppm αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	matte 1 C.G	matte 2 C.G	matte 3 C.G	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,03	12,8	12,99	0,14
C13	1,32	22,57	40,34	2,50
C14	9,14	21,78	40,68	13,66

C15	19,71	23,4	44,36	26,20
C16	19,85	17,13	22,85	27,11
C17	22,79	24,79	44,29	25,83
Pr	16,95	14,04	19,53	13,87
C18	25,46	24,11	38,32	25,38
Ph	13,96	26,33	40,85	11,31
C19	25,39	25,22	35,04	21,31
C20	27,46	21,66	31,71	22,92
C21	24,88	20,63	26,74	19,73
C22	21,84	19,56	31,28	18,91
C23	20,26	18,8	23,03	15,73
C24	18,52	14,98	23,00	13,64
C25	17,16	12,03	25,15	11,13
C26	13,79	9,75	20,81	9,19
C27	11,34	7,61	11,42	31,09
C28	8,93	7,33	11,97	28,58
C29	7,01	5,93	9,55	5,28
C30	8,18	3,92	6,15	6,47
C31	6,44	2,98	4,33	4,70
C32	4,46	2,19	3,61	3,33
C33	3,6	1,54	2,73	2,36
C34	3,24	0,94	2,14	1,59
C35	1,74	12,8	12,99	1,32
Χοπάνιο	0,94	22,57	40,34	0,54

Πίνακας 25: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία

ppm αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Φύλλα 1 Λ	Φύλλα 2 Λ	Φύλλα 3 Λ	Πείραμα α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,05	0,09	0,08	0,90
C13	0,43	0,46	0,39	13,61
C14	2,75	2,37	4,69	46,09
C15	0,83	6,17	13,77	73,32
C16	18,31	8,24	15,26	61,39
C17	18,46	7,83	12,98	57,80
Pr	10,46	11,21	12,20	27,72
C18	21,89	11,51	15,67	54,87
Ph	9,18	9,74	10,45	20,39
C19	16,89	9,00	12,19	46,82
C20	20,04	0,45	15,61	49,08
C21	15,78	10,72	12,66	42,86
C22	16,08	12,18	13,64	40,30
C23	12,56	9,87	11,08	33,91
C24	13,43	11,28	11,05	29,19
C25	9,99	7,74	8,52	23,29
C26	9,24	5,91	7,52	19,04

C27	14,16	35,77	20,73	69,88
C28	9,07	45,95	18,85	53,76
C29	4,48	3,83	4,09	9,13
C30	5,55	4,79	5,03	12,17
C31	3,46	3,55	3,48	8,55
C32	2,34	2,26	2,30	5,54
C33	1,52	1,41	1,66	4,28
C34	1,09	0,99	1,29	3,03
C35	0,67	0,57	0,70	1,88
Χοπάνιο	0,57	0,58	0,64	1,04

Πίνακας 26: Συγκεντρώσεις κορεσμένων υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην δεύτερη δειγματοληψία

ppm αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte 1 Λ	Matte 2 Λ	Matte 3 Λ	Πείραμα α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	0,17	0,17	0,14	0,90
C13	0,97	0,43	1,12	13,61
C14	7,38	4,11	8,96	46,09
C15	18,86	12,22	20,04	73,32
C16	21,91	15,02	20,50	61,39
C17	22,21	15,09	20,05	57,80

Pr	18,99	13,17	15,43	27,72
C18	25,41	11,66	22,25	54,87
Ph	15,83	11,32	13,24	20,39
C19	21,18	14,37	18,22	46,82
C20	25,29	17,44	21,37	49,08
C21	21,92	14,57	17,90	42,86
C22	21,80	15,51	17,76	40,30
C23	18,62	11,68	14,55	33,91
C24	18,39	10,12	15,44	29,19
C25	16,87	9,63	12,10	23,29
C26	13,85	6,87	8,71	19,04
C27	29,93	58,14	38,19	69,88
C28	24,86	21,91	45,51	53,76
C29	6,85	4,60	5,88	9,13
C30	8,05	5,71	6,70	12,17
C31	5,91	3,98	4,46	8,55
C32	3,70	2,89	3,13	5,54
C33	2,69	1,55	2,21	4,28
C34	2,23	1,52	1,62	3,03
C35	1,20	0,68	0,95	1,88
Χοπάνιο	0,90	0,75	0,78	1,04

Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Matte 1 CG	Matte 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,11	0,12	0,31
Dibenzothiophene	0,41	0,44	0,461
Phenanthrene	0,51	0,54	0,3712
Chrysene	0,12	0,12	0,101
Pyrene	0,02	0,02	0,019
benzo(e)pyrene	0,04	0,04	0,033
Χοπάνιο	0,94	0,94	0,54

Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1 CG	Φύλλα 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,0058	0,03	0,31
dibenzothiophene	0,406	0,36	0,461
Phenanthrene	0,5916	0,7	0,3712
Chrysene	0,0972	0,16	0,101
Pyrene	0,0108	0,01	0,019
benzo(e)pyrene	0,0216	0,05	0,033
Χοπάνιο	1,37	1,16	0,54

Πίνακας 29: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1 Λ	Φύλλα 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,0058	0,03	0,28
dibenzothiophene	0,203	0,36	0,456
Phenanthrene	0,2958	0,7	0,406
Chrysene	0,0396	0,16	0,098
Pyrene	0,0108	0,01	0,013
benzo(e)pyrene	1,1016	0,05	0,031
Χοπάνιο	0,57	1,16	1,04

Πίνακας 30: Συγκεντρώσεις αρωματικών υδρογονανθράκων σε ppm των δειγμάτων matte στην δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	matte 1 Λ	matte 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,0116	0,058	0,28
dibenzothiophene	0,3132	0,2494	0,456
Phenanthrene	0,4582	0,3538	0,406
Chrysene	0,0684	0,054	0,098
Pyrene	0,0396	0,0252	0,013
benzo(e)pyrene	0,018	0,5256	0,031
Χοπάνιο	0,90	0,75	1,04

Στη συνέχεια, όλες οι πιο πάνω τιμές πολλαπλασιάζονται με 1000 ούτως ώστε τα ppm να μετατραπούν σε ng. Ακολούθως παρουσιάζεται η διαφορά του βάρους του άδειου φιαλιδίου και του φιαλιδίου με το αργό πετρέλαιο η οποία μας δίνει τα γραμμάρια αργού πετρελαίου. Τα g μετατρέπονται σε mg επί 1000.

Πίνακας 31: Συγκέντρωση (mg) αργού πετρελαίου για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες

Δείγμα (κορεσμένοι υδρογονάνθρακες)	mg αργού πετρελαίου
Matte 1 C.G	6,6
Matte 2 C.G	7,30
Matte 3 C.G	6,10
Φύλλα 1 C.G	9
Φύλλα 2 C.G	9,10

Φύλλα 3 C.G	10
Πείραμα ελέγχου C.G	9
Matte 1 Λ	9,60
Matte 2 Λ	6,50
Matte 3 Λ	9
Φύλλα 1 Λ	7
Φύλλα 2 Λ	9,50
Φύλλα 3 Λ	7,90
Πείραμα ελέγχου Λ	9

Πίνακας 32: Συγκέντρωση (mg) αργού πετρελαίου για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες

Δείγμα (αρωματικοί υδρογονάνθρακες)	mg αργού πετρελαίου
Matte 1 C.G	6,6
Matte 2 C.G	7,3
Φύλλα 1 C.G	9
Φύλλα 2 C.G	9,1
Πείραμα ελέγχου C.G	9
Matte 1 Λ	9,60
Matte 2 Λ	6,50
Φύλλα 1 Λ	7
Φύλλα 2 Λ	9,50
Πείραμα ελέγχου Λ	9

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα ng αρωματικών και κορεσμένων υδρογονανθράκων που περιέχονται σε ένα mg αργού πετρελαίου. Πραγματοποιείται διαίρεση του ng των αρωματικών και κορεσμένων με τα αντίστοιχα mg αργού πετρελαίου.

Πίνακας 33: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Matte 1 C.G	Matte 2 C.G	Matte 3 C.G	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	5	14	15	15
C13	200	427	123	278
C14	1385	1753	2130	1518
C15	2986	3092	6613	2911
C16	3008	2984	6668	3012
C17	3453	3205	7272	2870
Pr	2568	2347	3745	1542
C18	3858	3396	7261	2820
Ph	2115	1923	3201	1257
C19	3847	3303	6282	2368
C20	4161	3607	6697	2546
C21	3770	3455	5744	2192

C22	3309	2967	5199	2102
C23	3070	2826	4383	1748
C24	2806	2679	5128	1516
C25	2600	2575	3775	1237
C26	2089	2052	3771	1021
C27	1718	1648	4122	3454
C28	1353	1336	3411	3176
C29	1062	1042	1871	587
C30	1239	1004	1963	719
C31	976	812	1566	522
C32	676	537	1009	370
C33	545	408	710	262
C34	491	300	593	177
C35	264	211	447	146
χοπάνιο	142	129	351	60

Πίνακας 34: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Φύλλα 1 C.G	Φύλλα 2 C.G	Φύλλα 3 C.G	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	12	48	13	15

C13	57	896	74	278
C14	852	2541	682	1518
C15	3198	3547	2205	2911
C16	4314	2947	2834	3012
C17	4867	2809	3121	2870
Pr	2421	2366	2681	1542
C18	4896	2829	3349	2820
Ph	2129	1960	2257	1257
C19	4373	2770	3021	2368
C20	4641	2986	3413	2546
C21	4055	2731	2955	2192
C22	3605	2412	2752	2102
C23	3177	2315	2443	1748
C24	3009	2158	2044	1516
C25	2476	2134	1769	1237
C26	2005	1691	1576	1021
C27	1629	1338	1125	3454
C28	638	1051	744	3176
C29	1095	812	842	587
C30	1552	1021	864	719
C31	1075	680	672	522
C32	603	432	521	370
C33	530	29	406	262
C34	312	336	291	177

C35	328	214	225	146
χοπάνιο	152	127	118	60

Πίνακας 35: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στην δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	Φύλλα 1 Λ	Φύλλα 2 Λ	Φύλλα 3 Λ	Πείραμα α ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	7	9	10	100
C13	61	49	50	1513
C14	392	250	593	5121
C15	118	649	1742	8147
C16	2616	868	1932	6821
C17	2637	824	1643	6423
Pr	1495	1180	1544	3080
C18	3127	1211	1983	6097
Ph	1311	1026	1322	2266
C19	2413	947	1543	5202
C20	2863	48	1976	5453

C21	2255	1128	1603	4762
C22	2298	1282	1727	4478
C23	1794	1039	1402	3768
C24	1919	1187	1399	3243
C25	1428	815	1078	2588
C26	1320	622	952	2115
C27	2023	3766	2624	7765
C28	1295	4837	2386	5973
C29	640	403	518	1015
C30	793	504	636	1352
C31	495	374	441	950
C32	334	238	291	616
C33	217	148	210	476
C34	155	104	163	337
C35	95	59	88	209
χοπάνιο	81	61	81	100

Πίνακας 36: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην δεύτερη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο – Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	matte 1 Λ	matte 2 Λ	matte 3 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
C12	18	25	16	100

C13	101	67	124	1513
C14	768	633	995	5121
C15	1965	1880	2226	8147
C16	2282	2311	2277	6821
C17	2314	2321	2228	6423
Pr	1978	2026	1715	3080
C18	2647	1794	2473	6097
Ph	1649	1742	1471	2266
C19	2206	2211	2024	5202
C20	2635	2683	2375	5453
C21	2283	2241	1989	4762
C22	2270	2386	1973	4478
C23	1940	1797	1617	3768
C24	1915	1557	1716	3243
C25	1758	1482	1345	2588
C26	1443	1057	968	2115
C27	3117	8944	4243	7765
C28	2590	3371	5056	5973
C29	713	708	654	1015
C30	839	878	744	1352
C31	616	613	495	950
C32	385	445	348	616
C33	281	238	246	476
C34	233	234	180	337

C35	125	105	106	209
χοπάνιο	94	115	86	100

Πίνακας 37: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στην πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Matte 1 CG	Matte 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	16,7	16,4	34,4
Dibenzothiophene	62,1	60,3	51,2
Phenanthrene	77,3	74,0	41,2
Chrysene	18,2	16,4	11,2
Pyrene	3,0	2,7	2,1
benzo(e)pyrene	6,1	5,5	3,7
Χοπάνιο	142,4	128,8	59,6

Πίνακας 38: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στη πρώτη δειγματοληψία

ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1 CG	Φύλλα 2 CG	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,6	3,3	34,4
Dibenzothiophene	45,1	39,6	51,2
Phenanthrene	65,7	76,9	41,2
Chrysene	10,8	17,6	11,2
Pyrene	1,2	1,1	2,1
benzo(e)pyrene	2,4	5,5	3,7
Χοπάνιο	152,4	127,5	59,6

Πίνακας 39: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος φύλλα στη δεύτερη δειγματοληψία

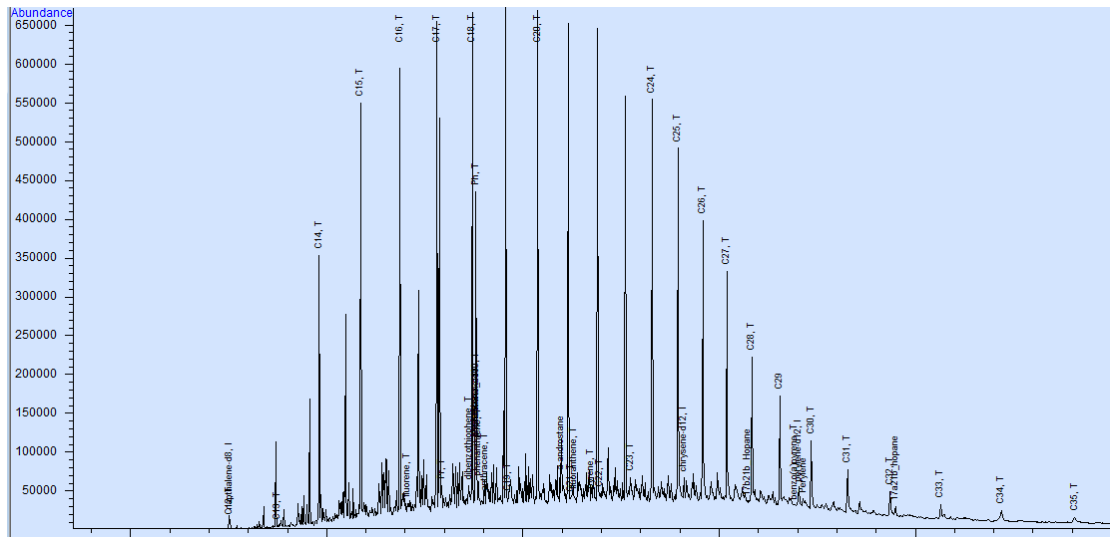
ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	Φύλλα 1Λ	Φύλλα 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	0,8	7,3	31,1
dibenzothiophene	29,0	27,2	50,7
Phenanthrene	42,3	38,9	45,1
Chrysene	5,7	5,9	10,9
Pyrene	1,5	3,2	1,4
benzo(e)pyrene	157,4	41,9	3,4
Χοπάνιο	80,7	81,1	116,0

Πίνακας 40: Συγκέντρωση (ng/mg) αργού πετρελαίου του δείγματος matte στη δεύτερη δειγματοληψία

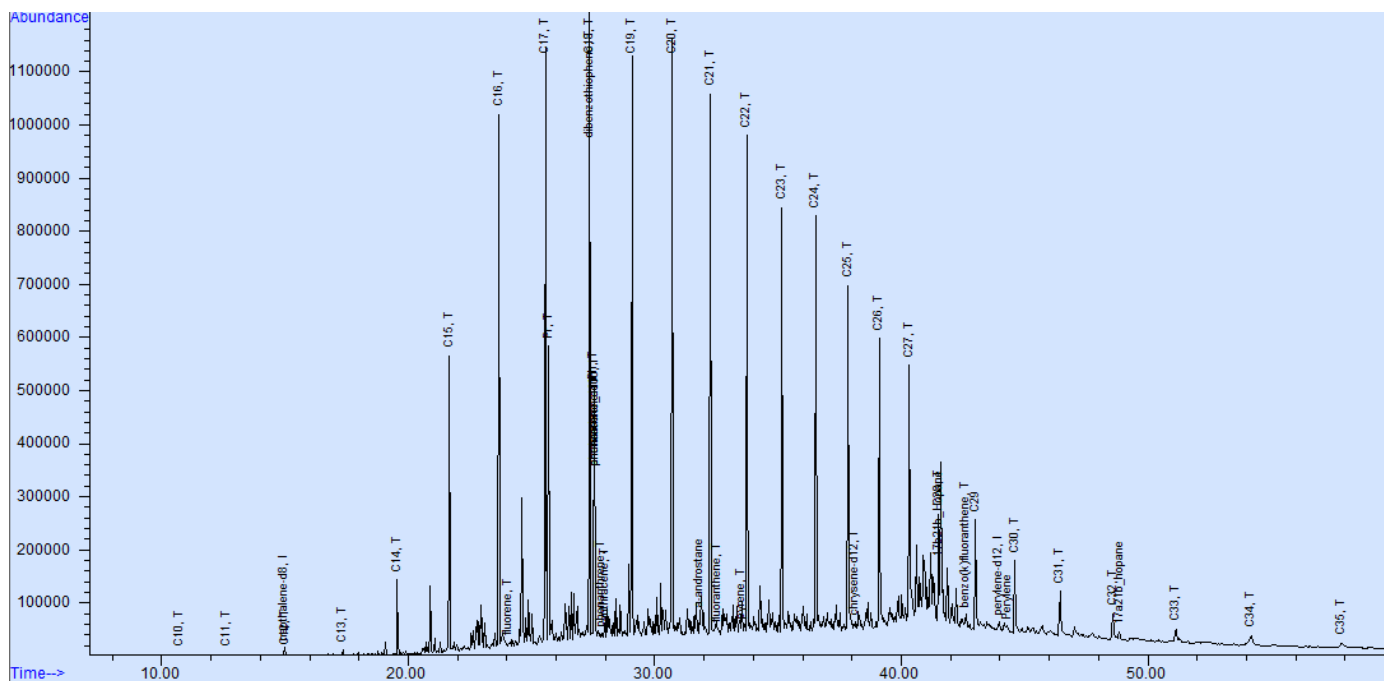
ng/mg αργό πετρέλαιο - Αρωματικά	matte 1Λ	matte 2 Λ	Πείραμα ελέγχου
	Ημέρα 28	Ημέρα 28	Ημέρα 28
Fluorine	1,2	8,9	31,1
Dibenzothiophene	32,6	38,4	50,7
Phenanthrene	47,7	54,4	45,1
Chrysene	7,1	8,3	10,9
Pyrene	4,1	3,9	1,4
benzo(e)pyrene	1,9	80,9	3,4
Χοπάνιο	94,1	114,6	116,0

Ολοκληρώνοντας, τα ng/mg αργό πετρέλαιο του κάθε αρωματικού και κορεσμένου υδρογονάνθρακα διαιρούνται με το χοπάνιο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο κεφάλαιο ανάλυση-συζήτηση αποτελεσμάτων.

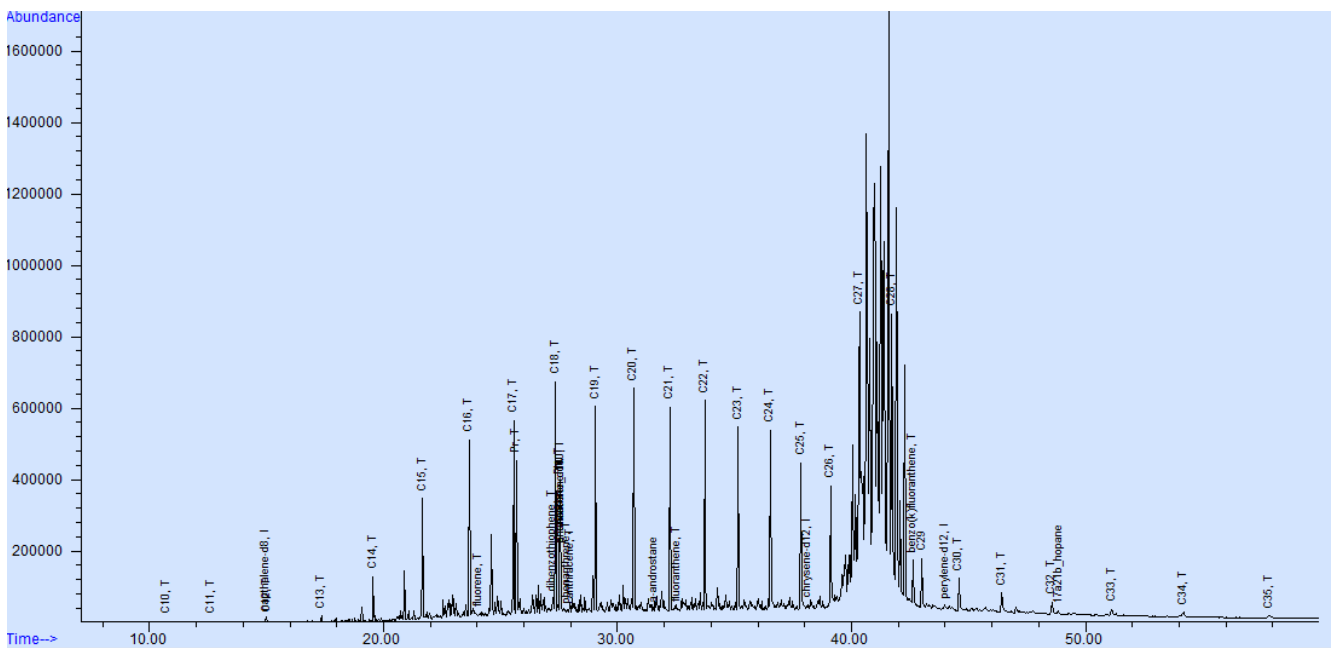
Ακολούθως παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο και φασματογράφο μάζας.



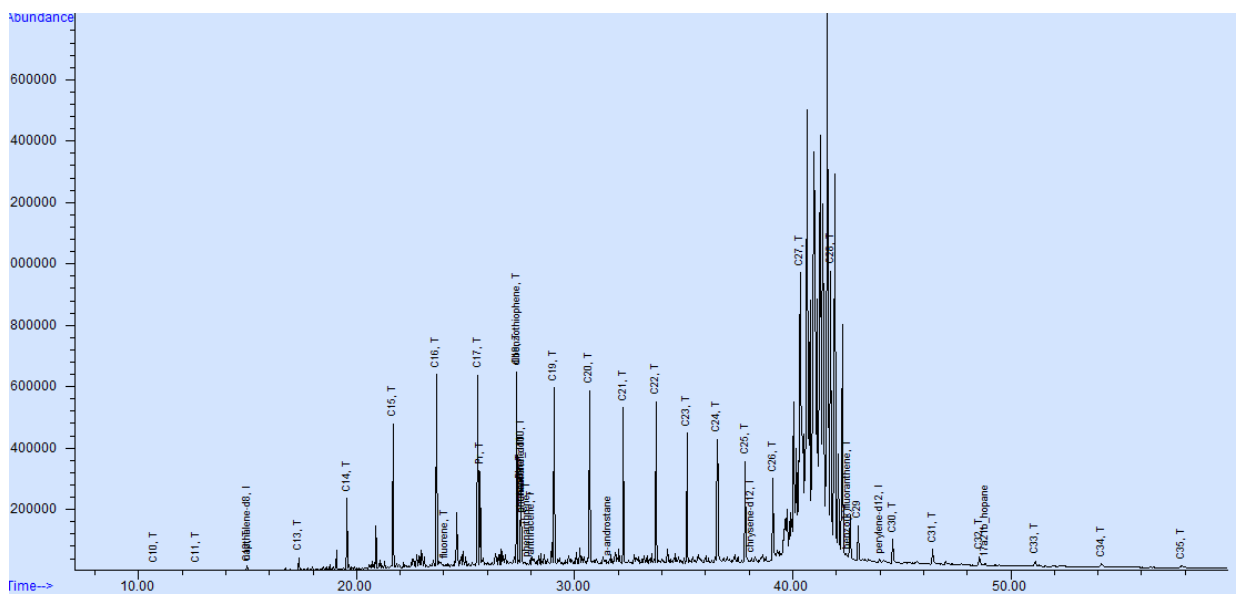
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα δείγματος matte 3 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



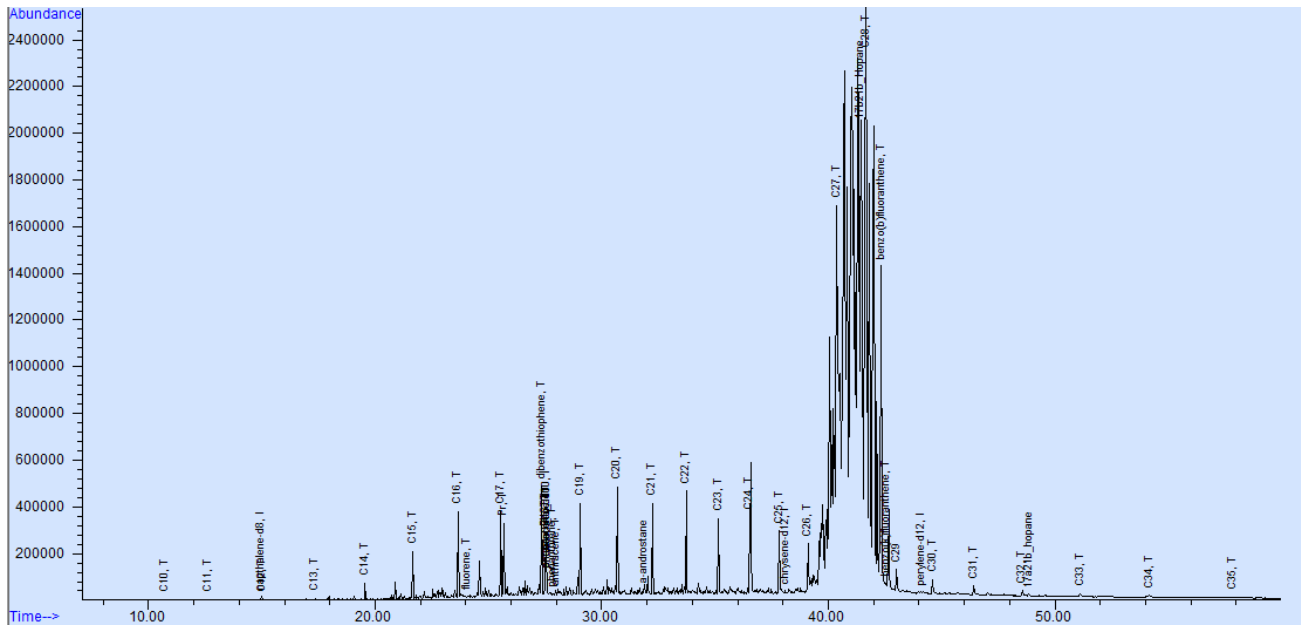
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



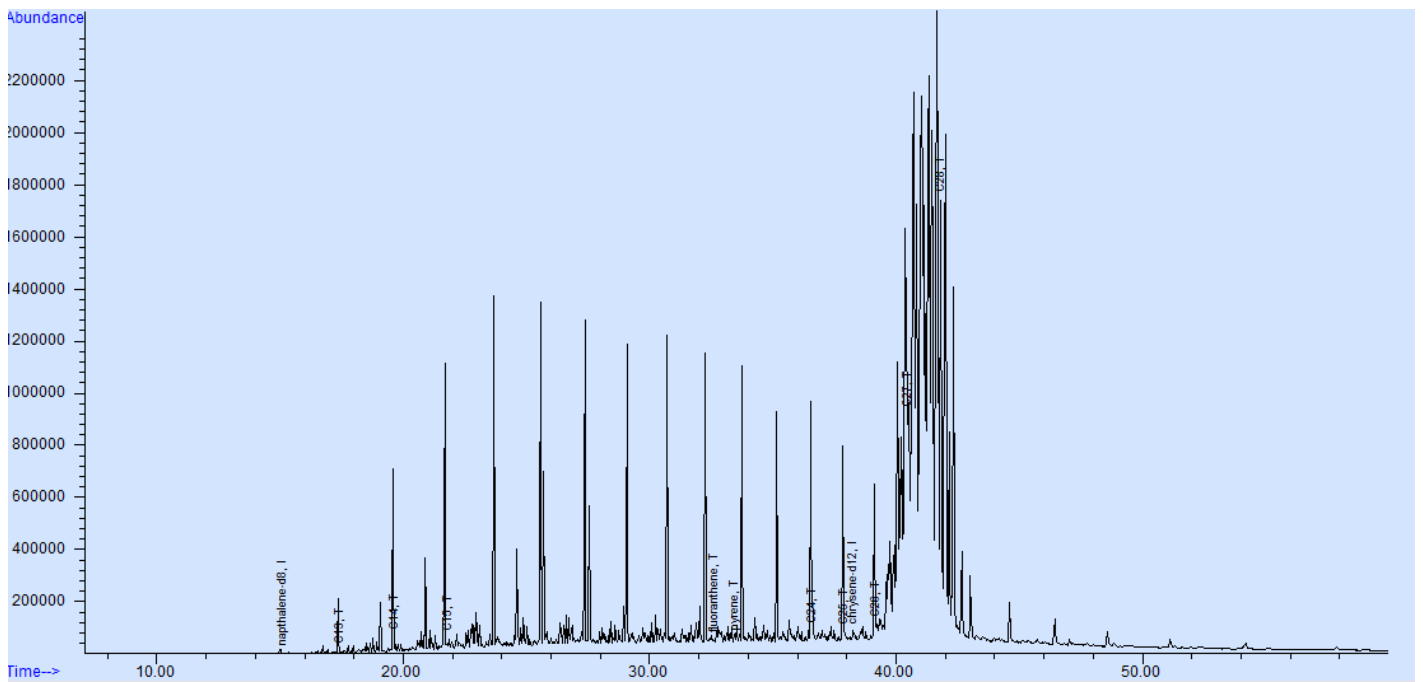
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



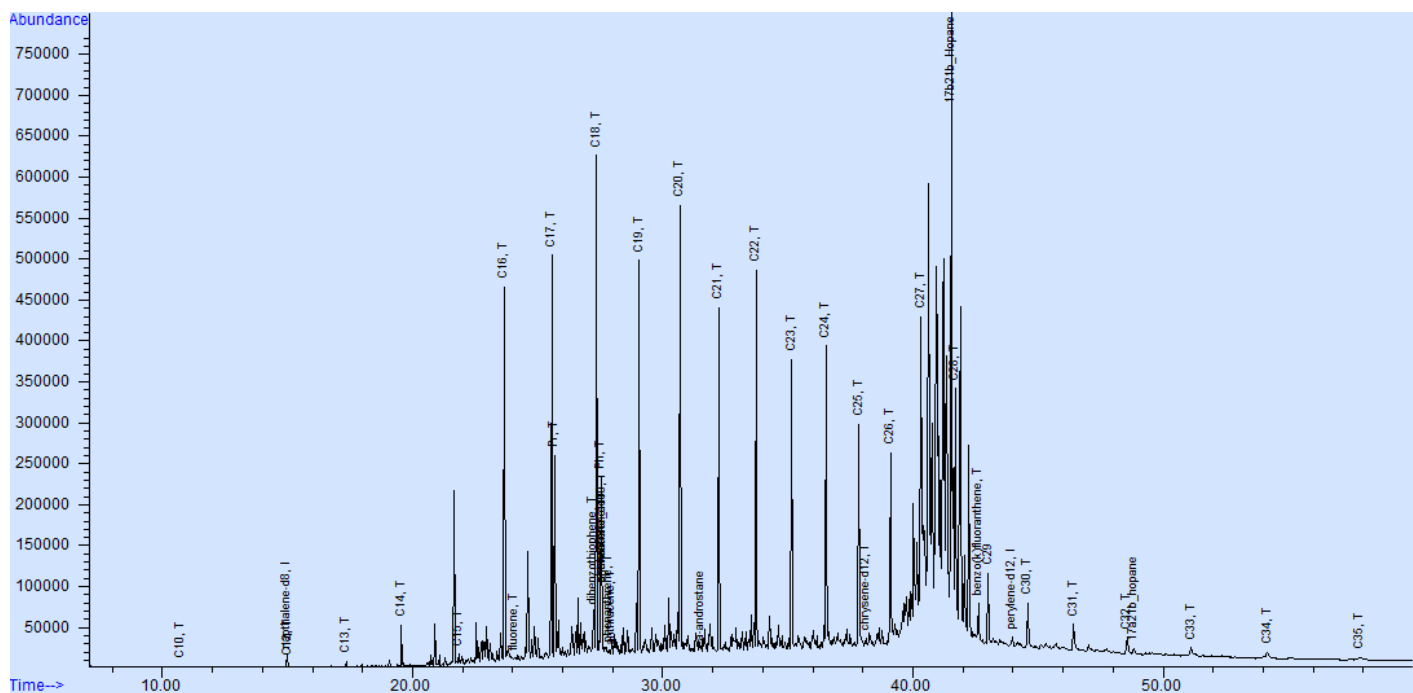
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 3 στην πρώτη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



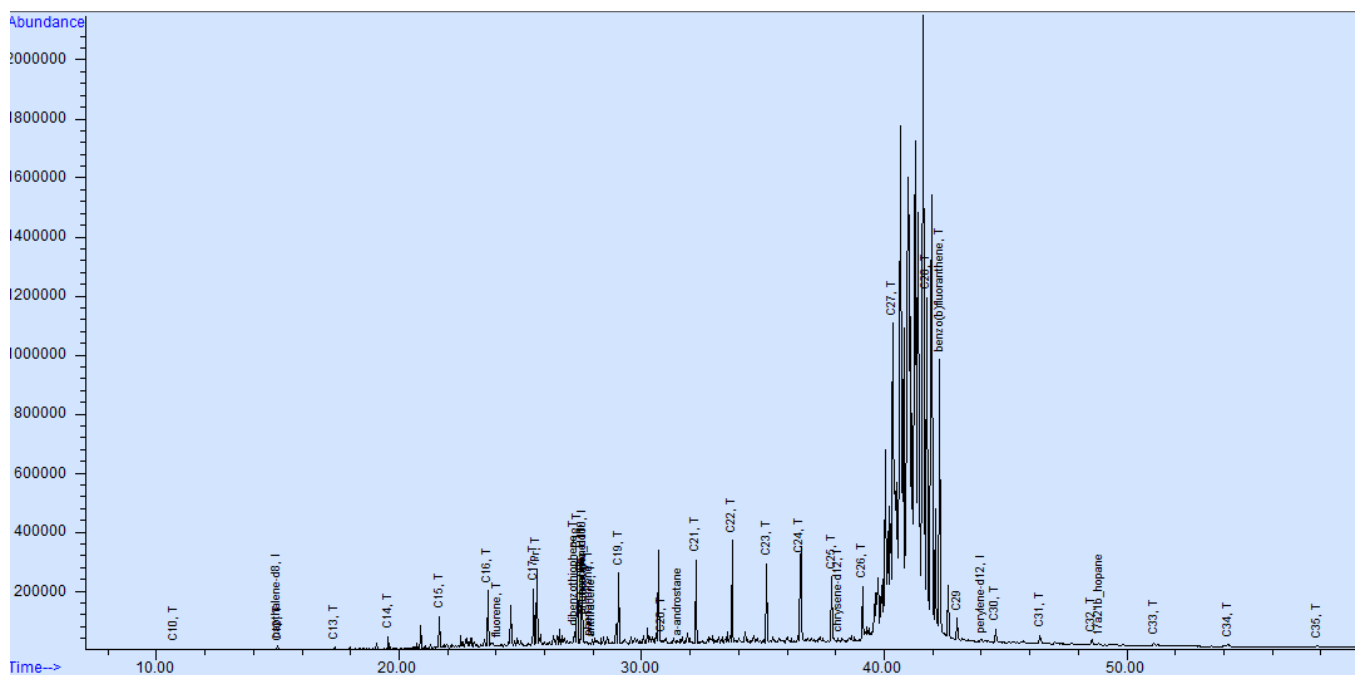
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



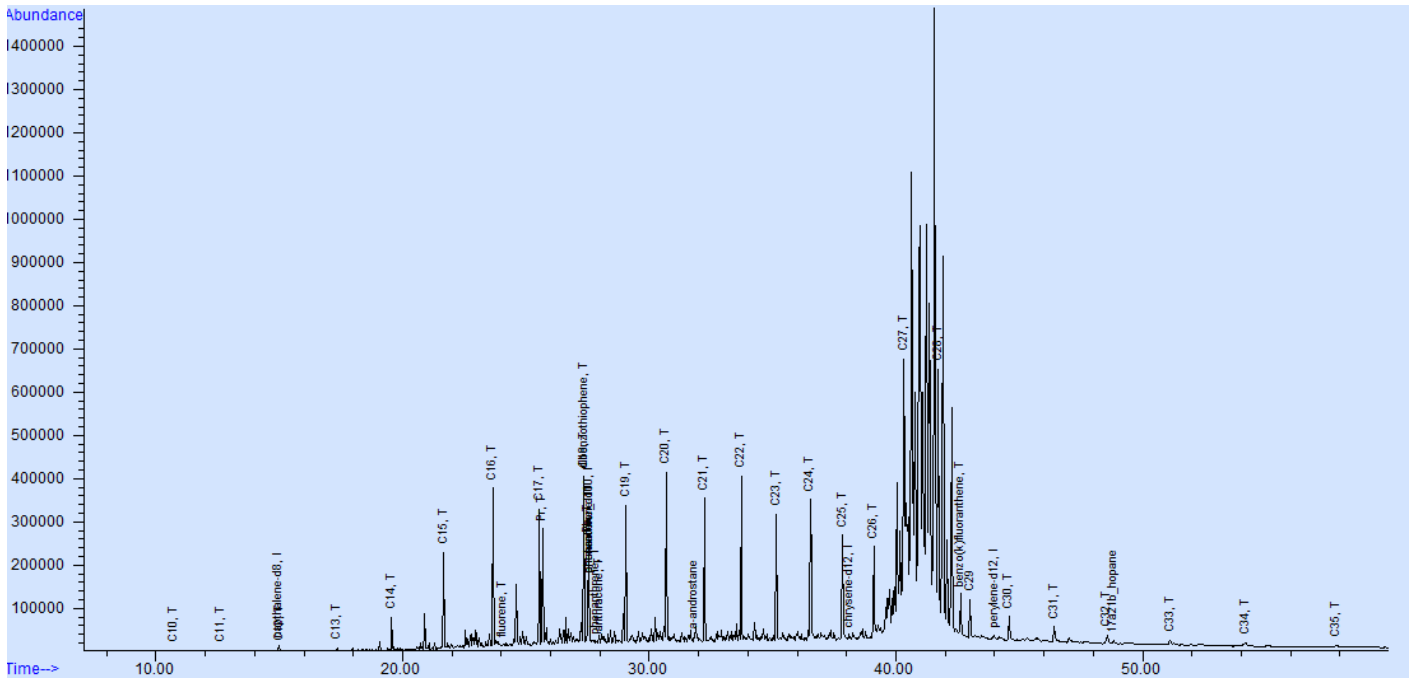
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



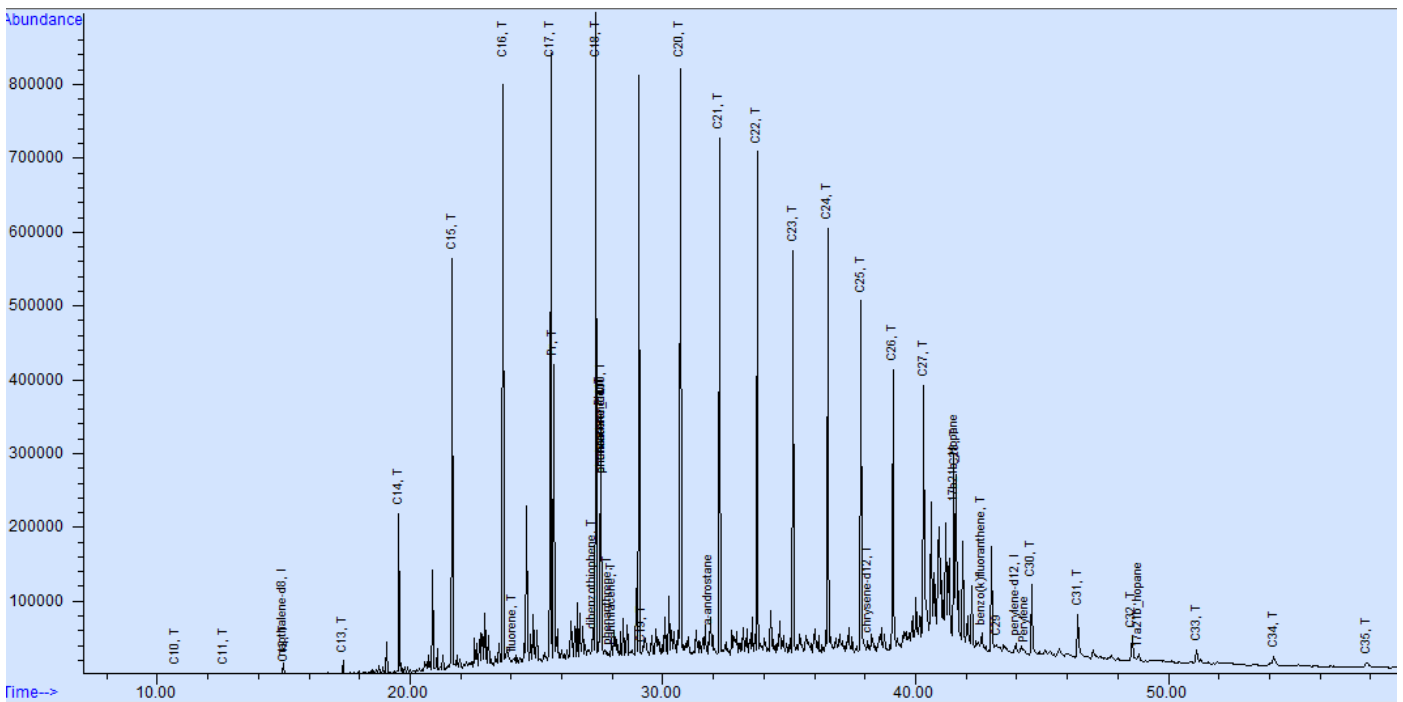
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα δείγματος matte 3 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



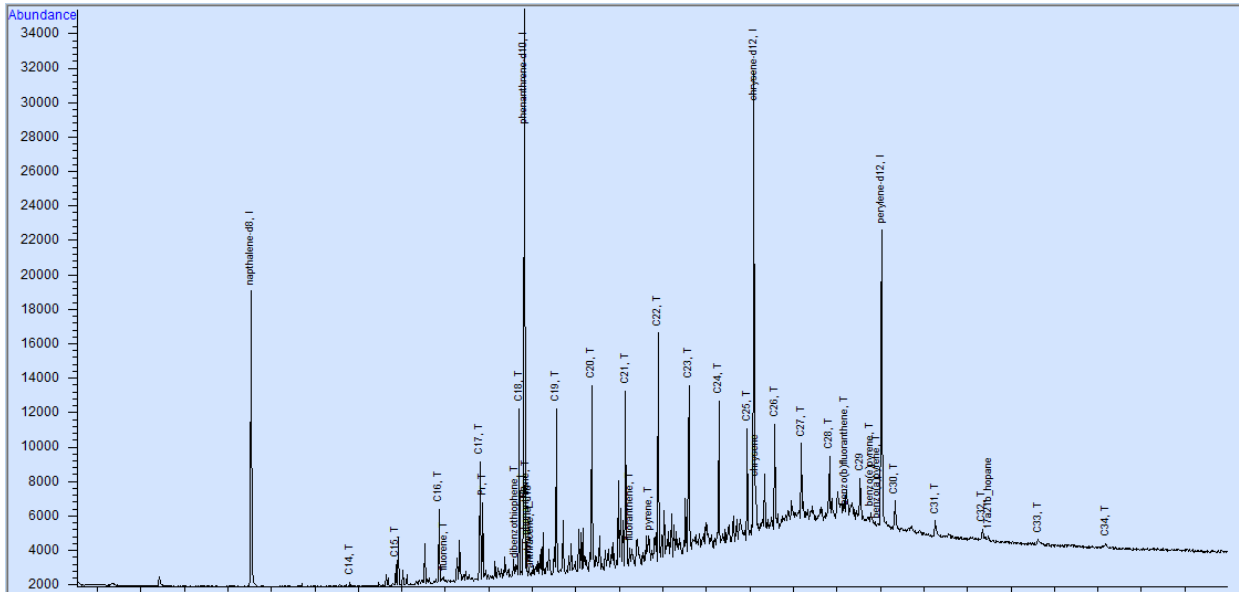
Εικόνα 33: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



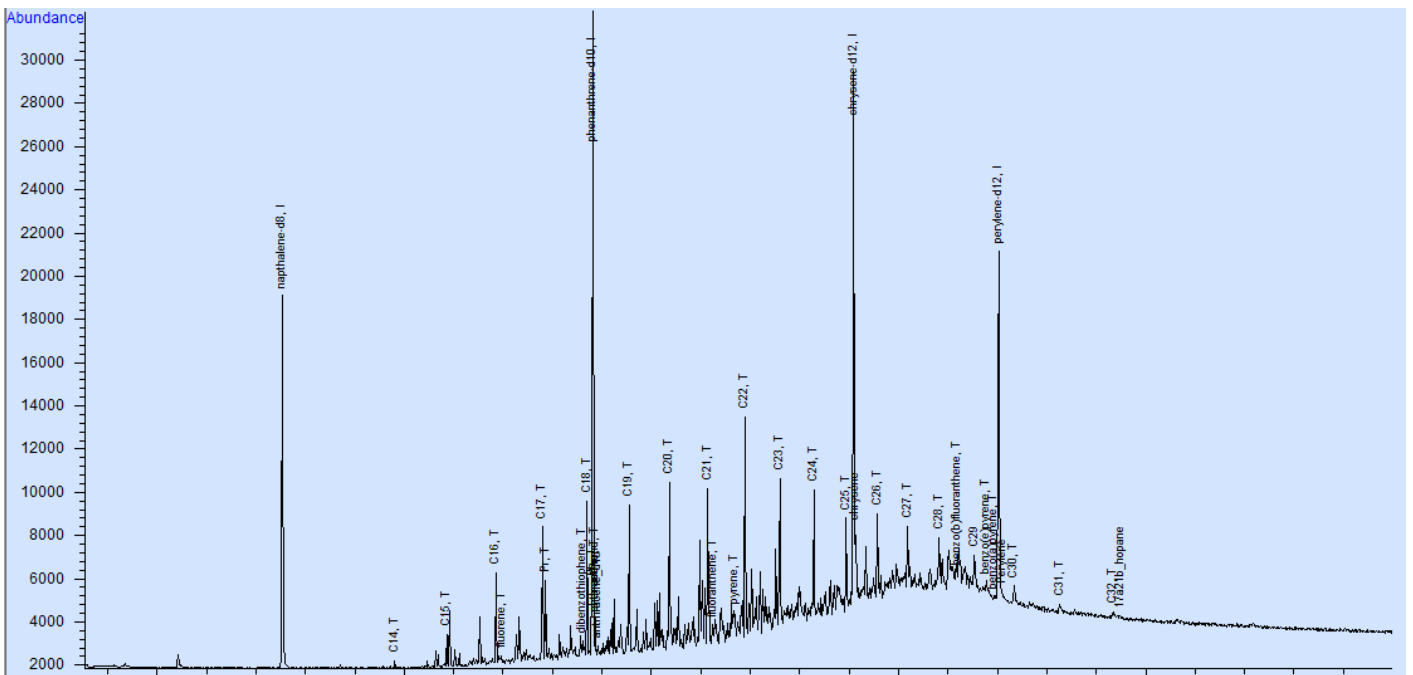
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



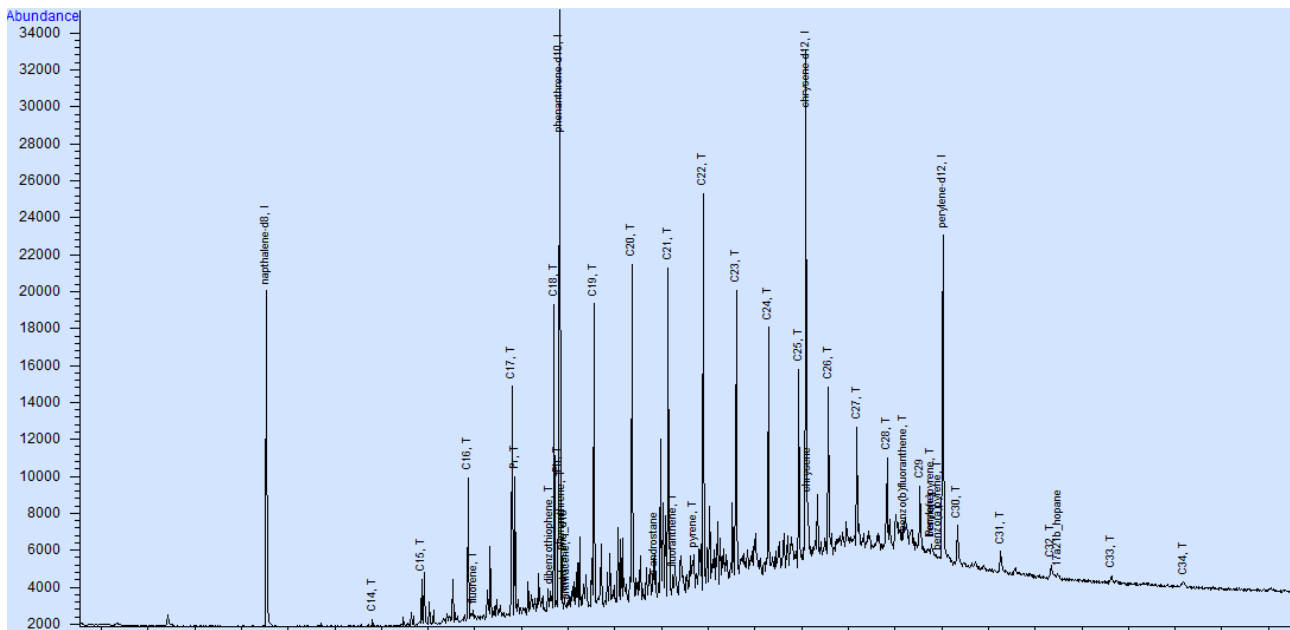
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 3 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



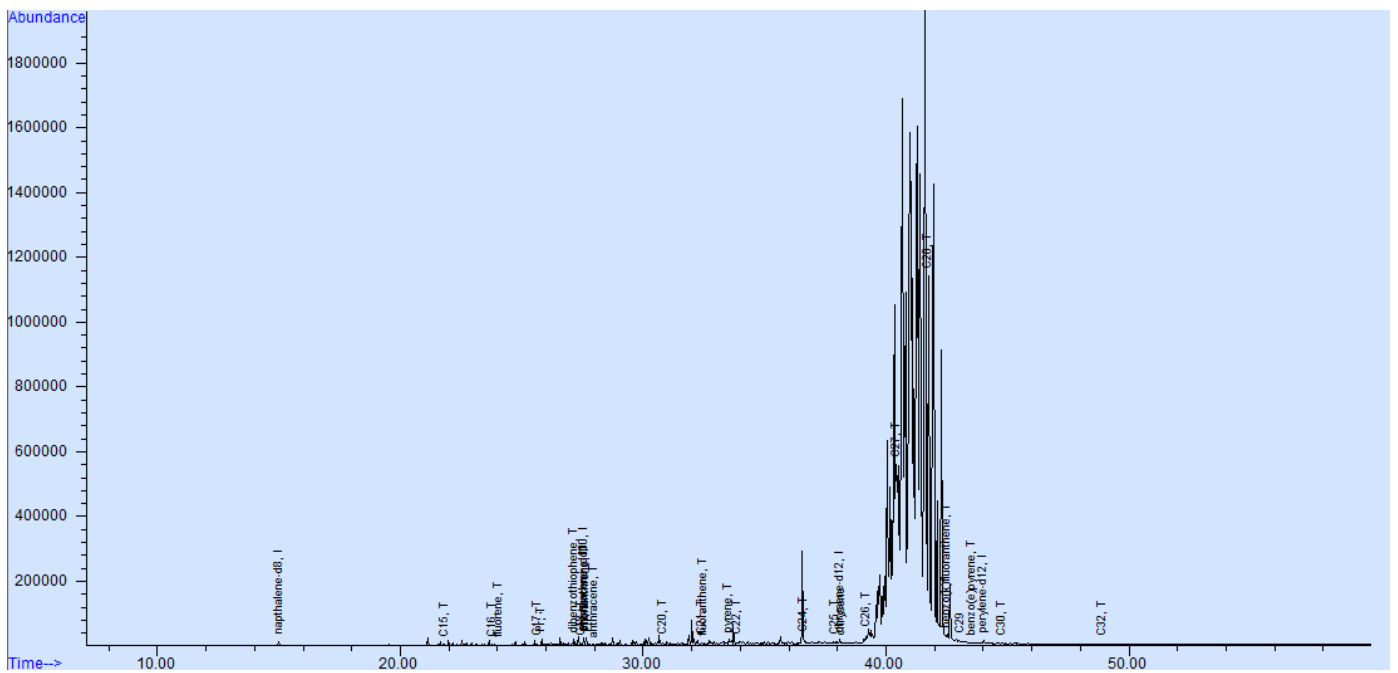
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην δεύτερη δειγματοληψία για τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες



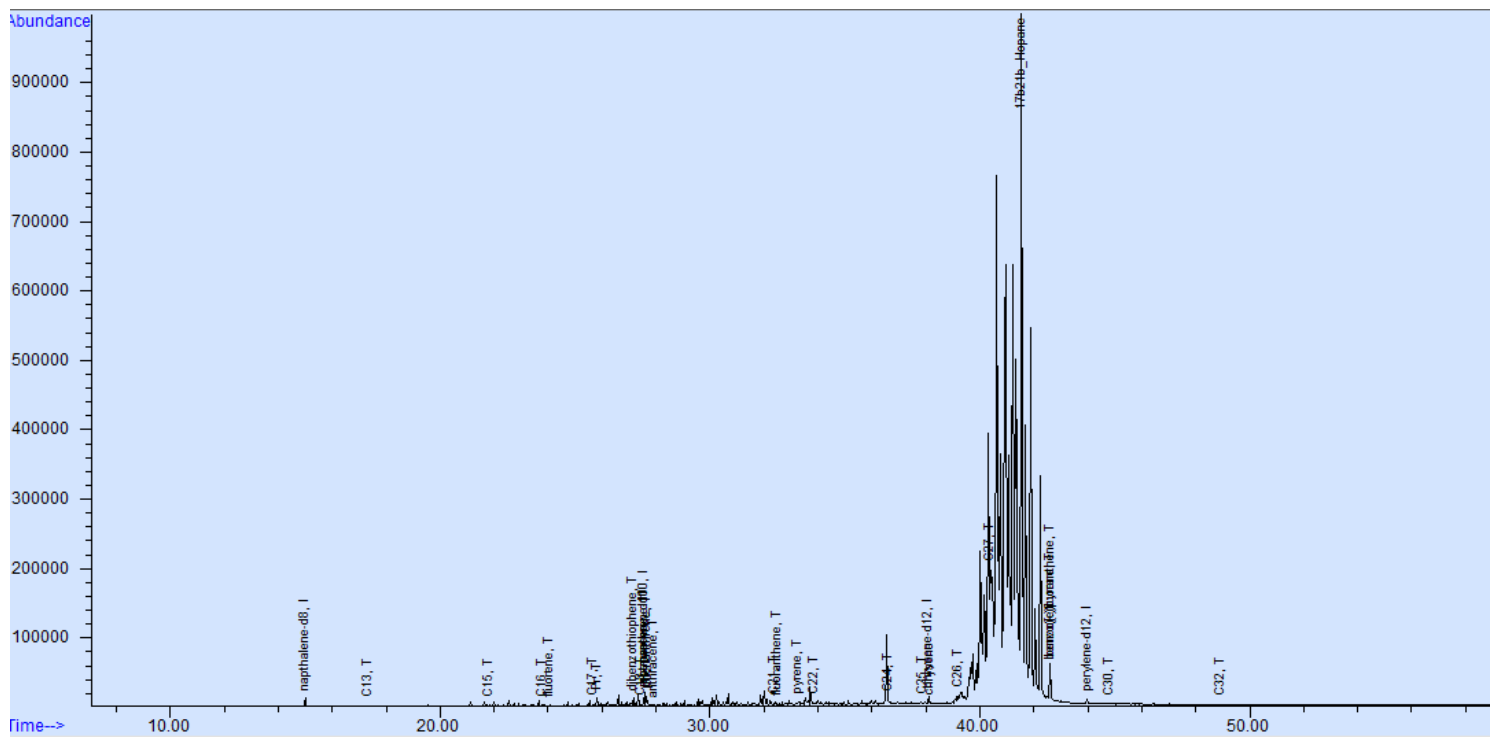
Εικόνα 37: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



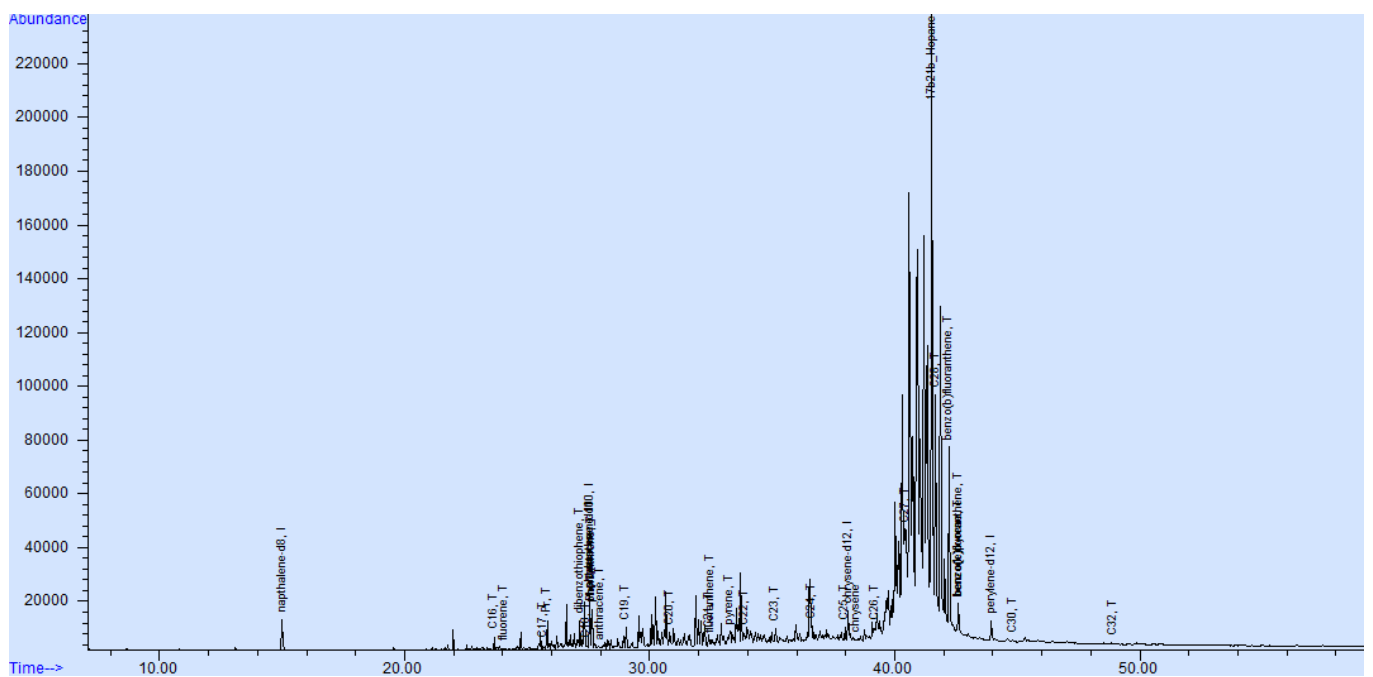
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα δείγματος matte 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



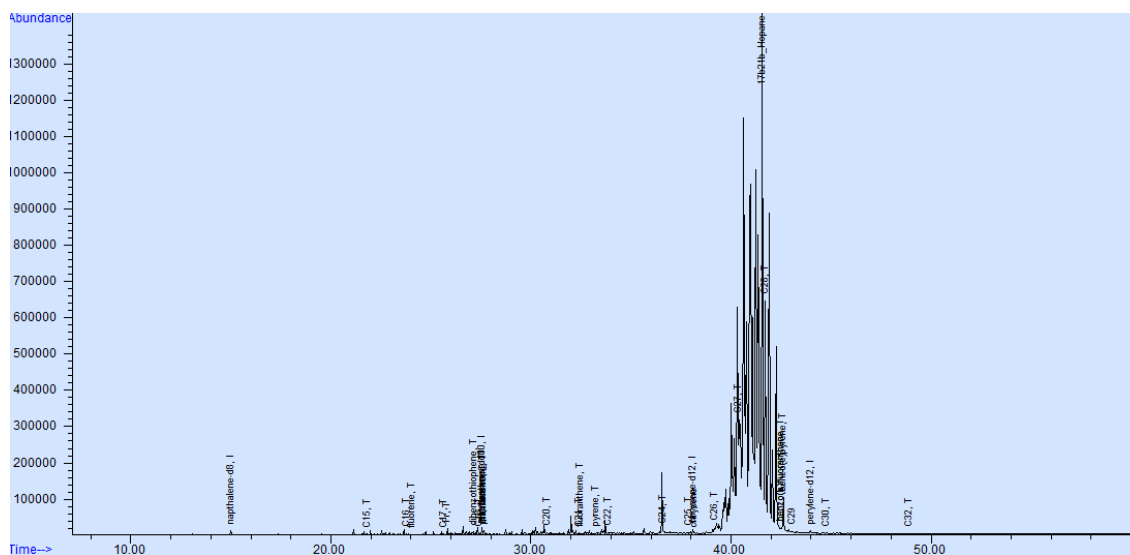
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



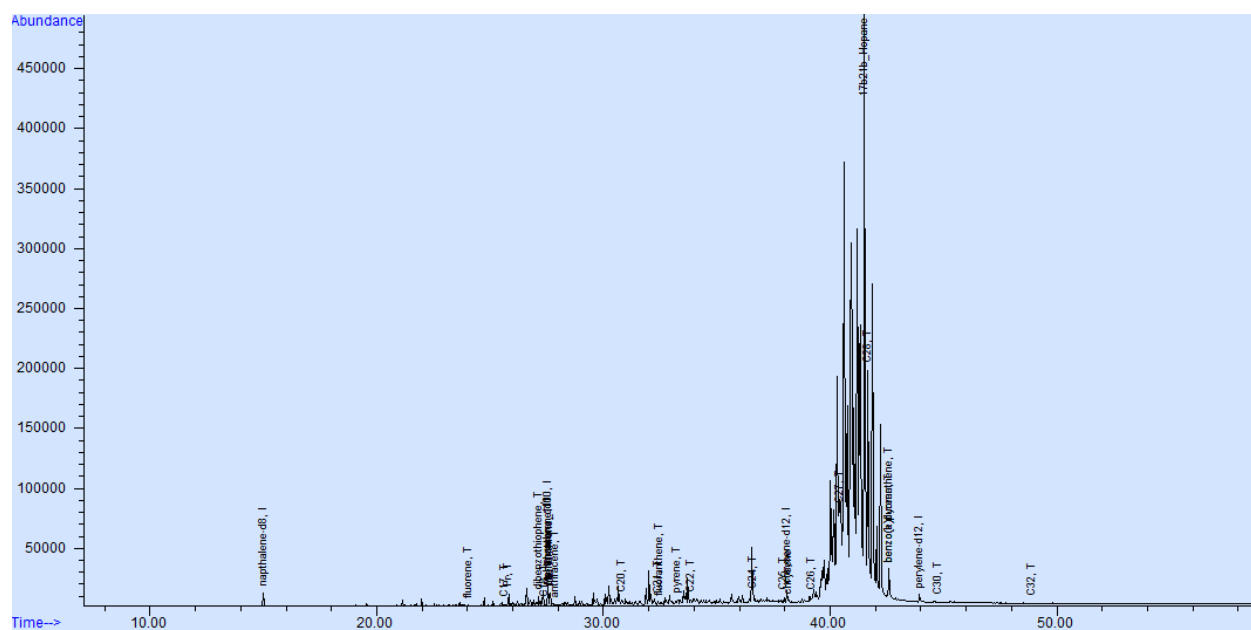
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



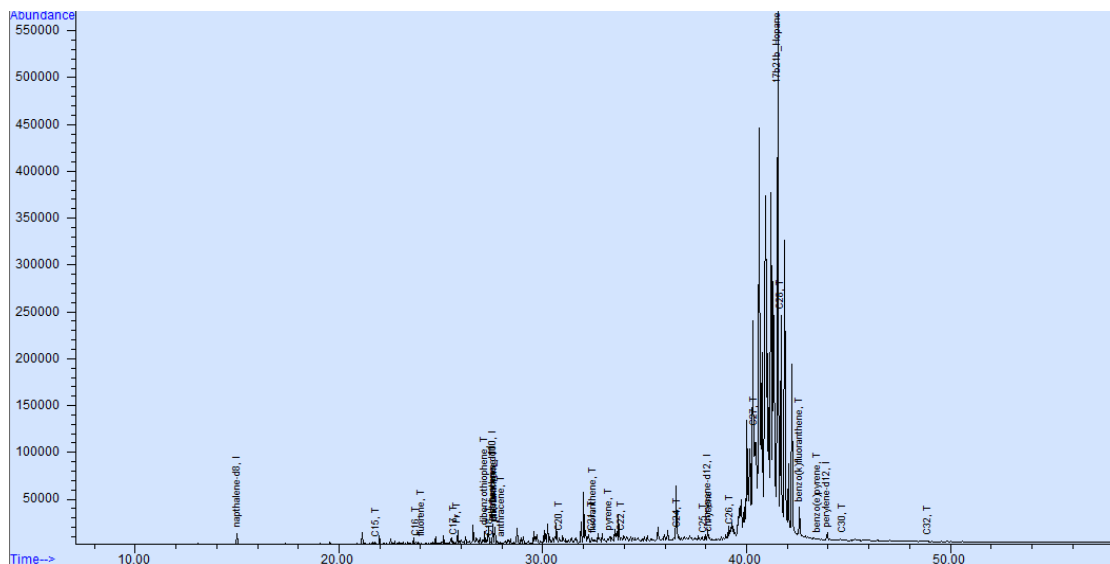
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην πρώτη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



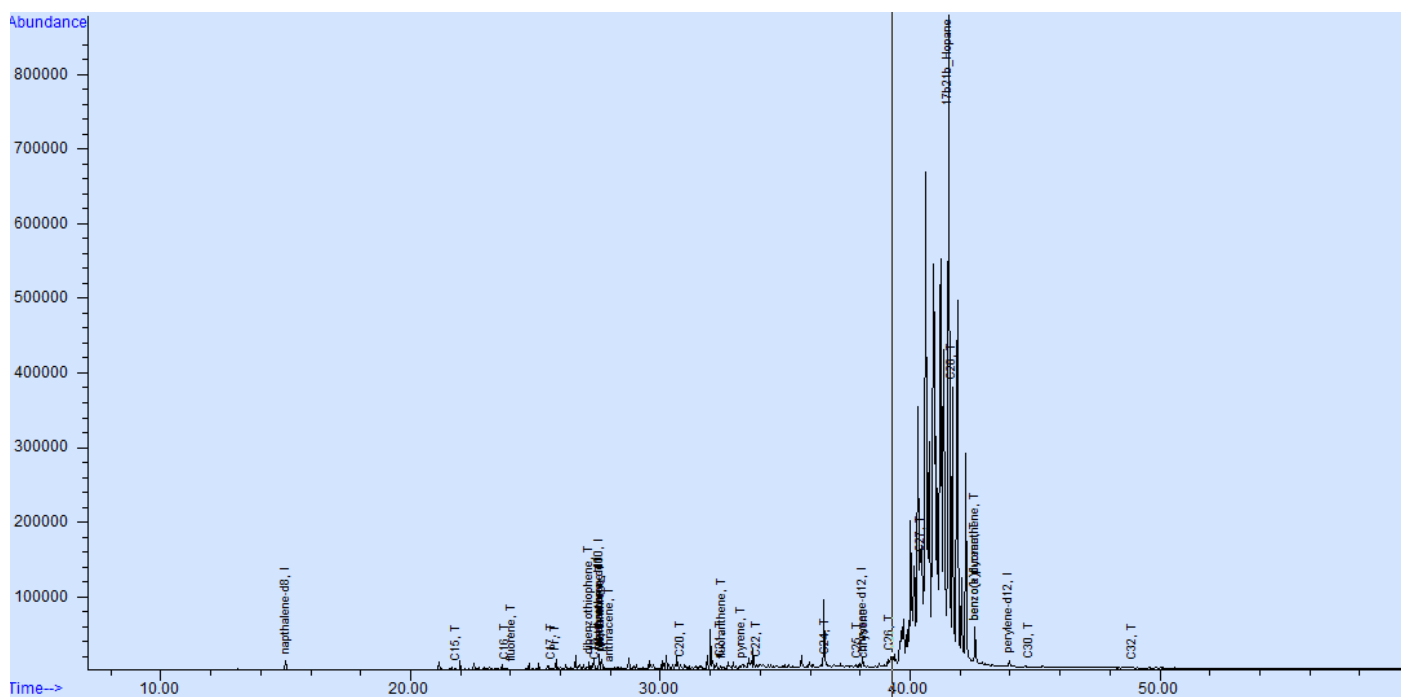
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πειράματος ελέγχου στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



Εικόνα 43: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



Εικόνα 44: Χρωματογράφημα δείγματος φύλλα 2 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



Εικόνα 45: Χρωματογράφημα δείγματος matte 1 στην δεύτερη δειγματοληψία για τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες

