



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ. ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία

Ενδογενή βακτήρια της περιοχής του
Ασπροπύργου με ικανότητα βιοεξυγίανσης

ΚΟΥΤΑΛΙΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Αμαλία Δ. Καραγκούνη

Αθήνα, Μάρτιος 2013

*Στην οικογένειά μου και σε
όλους όσους με στήριξαν*

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Α. Καραγκούνη, Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Δ. Χατζηνικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

Γ. Διαλλινάς, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και οι δειγματοληψίες έγιναν στην περιοχή του Ασπροπύργου και τη λίμνη Κουμουندούρου με τη βοήθεια του ΕΛΚΕΘΕ και κυρίως του Δρ. Δημητρίου Ηλία.

Η εκπόνηση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων που με την παρουσία τους, την προθυμία τους, τις γνώσεις τους και την εμπειρία τους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Αμαλία Καραγκούνη που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ κοντά της, στο εργαστήριό της και μου υπέδειξε με τις ουσιαστικές συμβουλές πώς να φέρω εις πέρας την εργασία αυτή. Την ευχαριστώ πέρα από το επιστημονικό της ενδιαφέρον και για την κατανόηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε οποιαδήποτε δύσκολη στιγμή παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Επικ. Καθ. κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου και στον Επικ. Καθ. κ. Γεώργιο Διαλλινά για όλες τις συμβουλές τους και για την πολύ καλή συνεργασία.

Θερμές ευχαριστίες, στο Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών και ιδιαιτέρως στον κ. Ηλία Δημητρίου και τον κ. Χατζηανέστη που με δέχτηκαν στον χώρο τους, με συμβούλεψαν και με βοήθησαν να πραγματοποιήσω μέρος των πειραμάτων της εργασίας μου κοντά τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Τομέα Βοτανικής τον Δρ. Ε. Κατσίφα και τον Α. Σαββίδη για την άριστη συνεργασία και συμπαράσταση που μου πρόσφεραν.

Δεν πρέπει να παραλείψω τους συναδέλφους, συνεργάτες και φίλους που με την παρουσία τους δημιούργησαν ένα ευχάριστο εργασιακό κλίμα: Κική Κανινή, Δρ. Παναγιώτα Σταθοπούλου, Μαρία Μπουρμπούλη, Νικολίτσα Ταγαρούλια, Αναστασία Δέλλιου, Γιώργο Παράσχα αλλά κυρίως την Κωνσταντίνα Μωυσή, και τον Καπετανάκη Γιώργο που ήταν ουσιαστικά δίπλα μου σε ότι και αν χρειάστηκε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Δεν θα μπορούσα βεβαίως να ξεχάσω το «παρεάκι του ΜΔΕ», τους πολύ καλούς φίλους και συνεργάτες: Απόστολο Λιακόπουλο, Λαμπρινή Πίκουλα, Δέσποινα Μπερή και Χρύσα Βαλασσάκη που στις δύσκολες στιγμές ήταν για μένα μια δεύτερη οικογένεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα μια φορά την οικογένειά μου και τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν τόσο επιστημονικά όσο και ψυχολογικά κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας.

Περίληψη

Το πετρέλαιο (από το ελληνικό πέτρα και έλαιο, "λάδι της πέτρας" / λατινικά *petroleum*), που μερικές φορές στην καθημερινή γλώσσα αποκαλείται και μαύρος χρυσός ή τσάι του Τέξας, είναι παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα, που αποτελεί και τη σπουδαιότερη σήμερα φυσική πηγή ενέργειας. Λόγω της συνεχής εκμετάλλευσης και εξόρυξης πετρελαίου παρατηρείται μια όλο και αυξανόμενη απελευθέρωση υδρογονανθράκων στο περιβάλλον είτε λόγω ατυχημάτων είτε εξαιτίας των ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Πάνω από 90% προέρχεται απευθείας από τις ανθρώπινες δραστηριότητες οι οποίες αποτελούν και την κύρια πηγή ρύπανσης του νερού και του χώματος

Είναι επιτακτική λοιπόν η ανάγκη βιοεξυγίανσης των περιοχών που ρυπαίνονται με πετρέλαιο. Υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι βιοεξυγίανσης ρυπασμένων με πετρέλαιο περιοχών. Ανάμεσά τους διακρίνονται οι φυσικές μέθοδοι βιοεξυγίανσης αλλά και διάφορες μηχανικές μέθοδοι. Το ενδιαφέρον όμως της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια στην διαδικασία της βιοαποικοδόμησης για την αντιμετώπιση της ρύπανσης από πετρέλαιο.

Με στόχο την βιοεξυγίανση ρυπασμένων με πετρέλαιο περιοχών περίπου εκατό βακτήρια απομονώθηκαν από την λίμνη Κουμουνδούρου και τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό *Nutrient Broth* με προσθήκη 10% αργού πετρελαίου και ελέγχθησαν για την ταυτοποίηση μιας *n-alkane* μονοξυγενάσης χρησιμοποιώντας γενικούς εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο (*alkB*). Αυτά τα οποία έφεραν το γονίδιο *alkB* χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με 16S rDNA αλληλούχιση. Τα βακτήρια αυτά ήταν ικανά να μεγαλώσουν σε υγρές καλλιέργειες με αργό πετρέλαιο ως μοναδική πηγή άνθρακα. Στα επιλεγμένα στελέχη έγινε εκτίμηση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης. Τέλος φτιάχτηκαν τρεις ομάδες (*consortium*) βακτηρίων και μελετήθηκε σε καλλιέργειες με θρεπτικό *Walne medium* και προσθήκη 10% αργού πετρελαίου η ικανότητά τους να βιοαποικοδομούν ρυπασμένο με πετρέλαιο νερό.

Petroleum (L. *petroleum*, from Greek: πέτρα (rock) + Latin: *oleum* (oil)) is a naturally occurring flammable liquid consisting of a complex mixture of hydrocarbons of various molecular weights and other liquid organic compounds, that are found in geologic formations beneath the Earth's surface. *Petroleum* is used in manufacturing a wide variety

of materials, and it is estimated that the world consumes about 88 million barrels each day. The use of fossil fuels such as petroleum can have a negative impact on Earth's biosphere, releasing pollutants and greenhouse gases into the air and damaging ecosystems through events such as oil spills.

A number of approaches and technologies have been developed for controlling oil spills in marine shorelines and freshwater environments such as natural, physical and chemical methods. Biodegradation of oil is one of the most important processes involved in weathering and the eventual removal of petroleum from the environment, particularly for the non volatile components of petroleum. Numerous scientific review articles have covered various aspects of this process and the environmental factors that influence the rate of biodegradation.

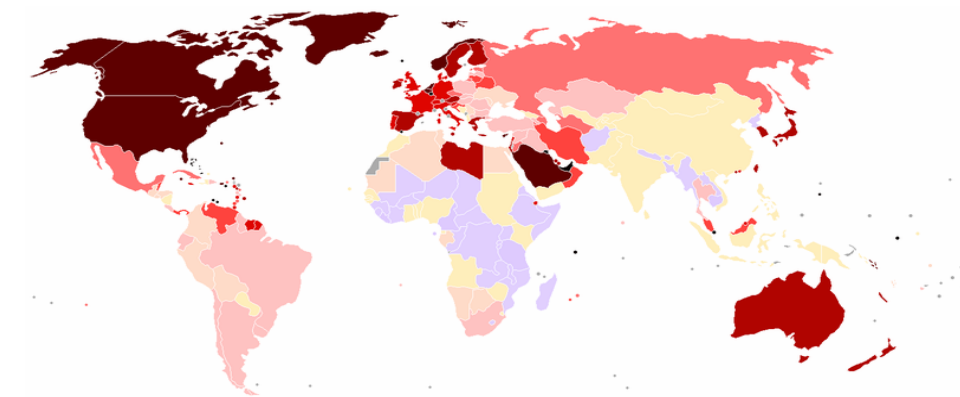
Taking into consideration the above mentioned it was studied the bioremediation process at the area of Aspropirgos. One-hundred bacteria isolated from lake Koumoundouro and the coastal area of Aspropirgos were screened for detection of a n-alkane monooxygenase gene using degenerated primers developed to amplify the alkB gene. The isolates carrying the alkB gene were further characterized by 16S rDNA gene sequencing. These isolates were able to grow in liquid cultures with 5% crude oil as the sole carbon source. Finally, bacteria consortium were made from these isolates and were studied for their ability to biodegrade oil contaminated water.



1 Εισαγωγή

Το πετρέλαιο (από το ελληνικό πέτρα και έλαιο, "λάδι της πέτρας" / λατινικά *petroleum*), που μερικές φορές στην καθημερινή γλώσσα αποκαλείται και μαύρος χρυσός ή τσάι του Τέξας, είναι παχύρρευστο, μαύρο ή βαθύ καφετί ή πρασινωπό υγρό πέτρωμα, που αποτελεί και τη σπουδαιότερη σήμερα φυσική πηγή ενέργειας. Το αργό (ακατέργαστο) πετρέλαιο είναι υγρό πέτρωμα, μίγμα υδρογονανθράκων, δηλαδή ουσιών που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο, κατά ένα μεγάλο μέρος της σειράς των αλκανίων, που όμως περιέχει και αρκετούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, καθώς και άλλες οργανικές ενώσεις και το οποίο βρίσκεται μέσα σε πορώδη πετρώματα στα ανώτερα στρώματα μερικών περιοχών τού φλοιού της Γης (E.I.A., 2011).

Τα προϊόντα του πετρελαίου είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τη βιομηχανία και στην καθημερινή ζωή του ανθρώπου (Das *et al*, 2010). Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή αργού πετρελαίου είναι περίπου 70 εκατομμύρια βαρέλια κάθε μέρα, από όπου το 50% μεταφέρεται μέσω της θάλασσας (McKew *et al*, 2007). Σύμφωνα με την Διαχείριση Πληροφοριών Ενέργειας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (US Energy Information Administration) το 2011 η κατανάλωση πετρελαίου παγκοσμίως ήταν 87.421 εκατομμύρια βαρέλια την ημέρα. Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανομή του πετρελαίου για το 2011 (Banks *et al*, 2012)



Εικόνα 1.1 Παγκόσμια κατανομή πετρελαίου για το 2011. Με σκούρο χρώμα αναπαριστώνονται οι περιοχές με την μεγαλύτερη κατανάλωση πετρελαίου. Η Αμερική, ο Καναδάς και η Ευρώπη είναι αυτές όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη κατανάλωση πετρελαίου.

Είναι εμφανές ότι οι σύγχρονες κοινωνίες εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη χρήση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων και των παραγώγων του. Για τον λόγο αυτό η κατανάλωση του πετρελαίου είναι αυξημένη με αποτέλεσμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα να καταγράφονται σοβαρά ατυχήματα διαρροής πετρελαϊκών υδρογονανθράκων στο περιβάλλον (Di Martino *et al*, 2012), όπως το πρόσφατο γεγονός στον κόλπο του Μεξικού, που είχε τεράστιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα της περιοχής. Σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται ότι περίπου 1,7 και 8,8 εκατομμύρια τόνους πετρελαίου απελευθερώνονται στο περιβάλλον (Zahng *et al*, 2011).

1.1 Πετρελαϊκή ρύπανση

Η απελευθέρωση υδρογονανθράκων στο περιβάλλον όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή γίνεται είτε λόγω ατυχημάτων είτε εξαιτίας των ανθρώπινων δραστηριοτήτων (Kvenvolden *et al*, 2003). Πάνω από 90% προέρχεται απευθείας από τις ανθρώπινες δραστηριότητες οι οποίες αποτελούν και την κύρια πηγή ρύπανσης του νερού και του χώματος. Όσον αφορά στα θαλάσσια οικοσυστήματα, η παραγωγή αργού πετρελαίου, η εξόρυξη, οι ανεξέλεγκτες απελευθερώσεις πετρελαίου, η φυσική ρύπανση από τις δεξαμενές, ο τρόπος διάθεσης από τους τελικούς δέκτες αποτελούν τις σημαντικότερες πηγές θαλάσσιας πετρελαϊκής ρύπανσης (Medina-Bellver *et al*, 2005).

Ατυχήματα διαρροής πετρελαϊκών υδρογονανθράκων μεγάλων διαστάσεων εμφανίζονται και στο παρελθόν όπως στην Αλάσκα το 1989 που οδήγησε στον θάνατο χιλιάδες πουλιά και θαλάσσια θηλαστικά, και στην Αγγλία το 1967 όπου με την βύθιση του υπερτάνκερ Torrey - Canyon δόθηκε η αφορμή για την στροφή του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας στο πρόβλημα της ρύπανσης από πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες (Atlas and Bartha, 1981).

1.1.1 Σύσταση του αργού πετρελαίου

Το αργό πετρέλαιο αποτελείται από συστατικά υδρογονανθράκων (περίπου 50-98% της συνολικής σύστασης) και συστατικά που δεν είναι υδρογονάνθρακες (θείο, άζωτο, οξυγόνο και ποικιλία μετάλλων). Η ενδεικτική χημική σύσταση και κάποια φυσικά χαρακτηριστικά του αργού πετρελαίου αναφέρονται στον Πίνακα 1.1.

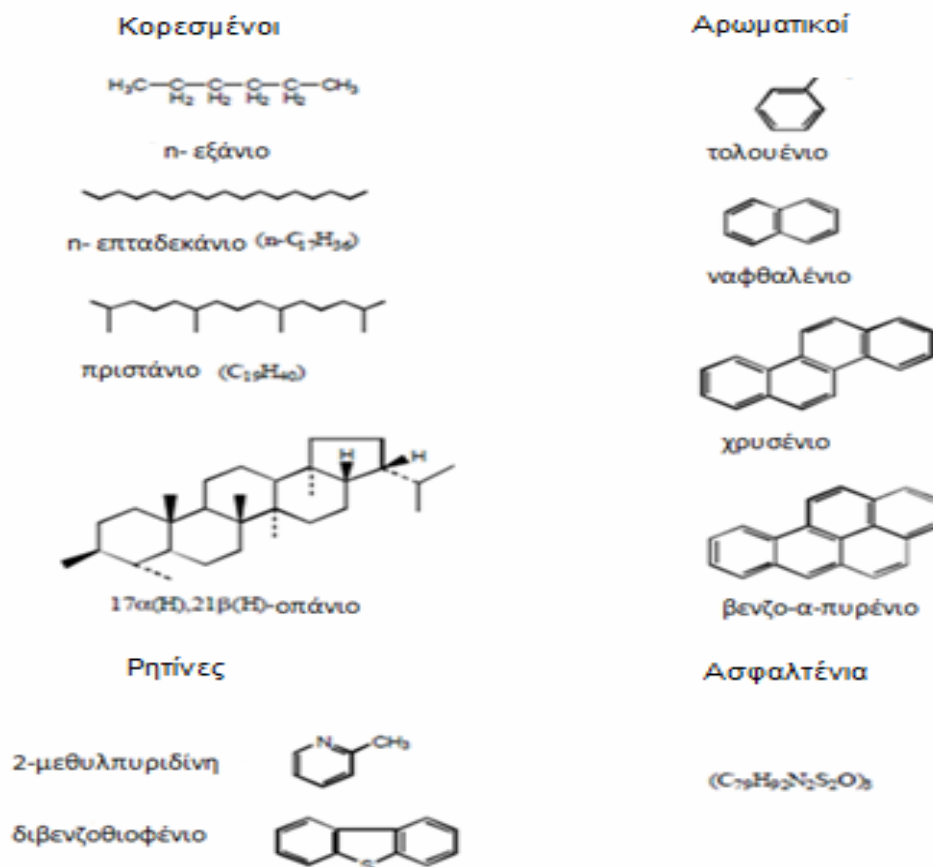
Πίνακας 1.1. Χημικά χαρακτηριστικά 3 διαφορετικών τύπων πετρελαίου

| Χαρακτηριστικά ή συστατικά | Πετρέλαιο Prudhoe bay | Πετρέλαιο South Louisiana | Πετρέλαιο Kuwait |
|---|-----------------------|---------------------------|------------------|
| API βαρύτητα (20°C) | 27,8 | 34,5 | 31,4 |
| Θείο (wt%) | 0,94 | 0,25 | 2,44 |
| Άζωτο (wt%) | 0,23 | 0,69 | 0,14 |
| Νικέλιο (ppm) | 10 | 2,2 | 7,7 |
| Βανάδιο (ppm) | 20 | 1,9 | 28 |
| Τμήμα νάφθα (τμήμα βρασμού 20-205 °C) (wt%) | 23,2 | 18,6 | 28,0 |
| Κορεσμένοι | 19,9 | 16,5 | 20,3 |
| Αρωματικοί | 3,2 | 2,1 | 2,4 |

| | | | |
|--|------|-------|------|
| Ρητίνες και Ασφαλτένια | ---- | ----- | ---- |
| Τμήμα υψηλού βρασμού (πάνω από 205°C)(wt%) | 76,8 | 81,4 | 77,3 |
| Κορεσμένοι | 47,7 | 56,3 | 34,0 |
| Αρωματικοί | 25,0 | 16,5 | 21,9 |
| Ρεσίνια και Ασφαλτένια | 4,1 | 8,6 | 21,4 |

Τα συστατικά του πετρελαίου κατηγοριοποιούνται σε 4 κύριες κατηγορίες (Εικόνα 1.2):

1. **Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες:** Περιλαμβάνουν γραμμικά και διακλαδισμένα αλκάνια με δομή C_nH_{2n+2} (αλειφατικά) και κυκλικά αλκάνια με δομή C_nH_{2n} (αλικυκλικά), τα οποία ποικίλλουν στο μήκος της αλυσίδας που κυμαίνεται από έναν άνθρακα έως 40 άνθρακες. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες συνήθως είναι τα πιο άφθονα συστατικά στο αργό πετρέλαιο
2. **Αρωματικοί υδρογονάνθρακες:** Περιλαμβάνουν μονοκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (π.χ. βενζένιο, τολουένιο, και ξυλένιο) και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Polycyclic aromatic hydrocarbons- PAHs) (πχ ναφθαλένιο, ανθρακένιο και φενανθράνιο), τα οποία έχουν δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Τα PAHs έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των σοβαρών προβλημάτων που προκαλούν όπως η καρκινογένεση.
3. **Ρητίνες:** Περιλαμβάνουν πολικά συστατικά που περιέχουν άζωτο (N), θείο (S) και οξυγόνο (O) (πχ πυριδίνια και θειοφένια). Συχνά αναφέρονται ως συστατικά NSO.
4. **Ασφαλτένια:** Είναι υψηλού μοριακού βάρους ουσίες που περιέχουν υψηλού μοριακού βάρους υδρογονάνθρακες και υψηλού μοριακού βάρους NSOs. Επίσης περιέχουν μέταλλα όπως το νικέλιο, το βανάδιο και ο σίδηρος (Baker *et al*, 1995).



Εικόνα 1.2 Οργανικά συστατικά πετρελαίου, φαίνονται οι τέσσερις κύριες κατηγορίες του πετρελαίου: κορεσμένοι και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ρητίνες και ασφαλτένια

1.1.2 Αλκάνια

Τα αλκάνια είναι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες. Μπορεί να είναι γραμμικά (n-αλκάνια), κυκλικά (κυκλοαλκάνια), ή διακλαδισμένα (ισο-αλκάνια). Τα αλκάνια με 1-4 άτομα άνθρακα είναι πτητικά σε θερμοκρασία ατμόσφαιρας. Αλκάνια με περισσότερα άτομα άνθρακα είναι υγρά ή στερεά. Το αργό πετρέλαιο περιέχει πάνω από 50% ποσοστό σε αλκάνια. Τα αλκάνια βρίσκονται στην φύση αλλά παράγονται επίσης και από πολλούς ζωντανούς οργανισμούς όπως τα φυτά, τα πράσινα φύκη, τα βακτήρια και τα ζώα. Αυτό εξηγεί το γεγονός γιατί τα αλκάνια είναι παρόντα σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα περισσότερα περιβάλλοντα (Rojo Fernando, 2009).

1.2 Αντιμετώπιση πετρελαϊκής ρύπανσης

1.2.1 Συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης της ρύπανσης

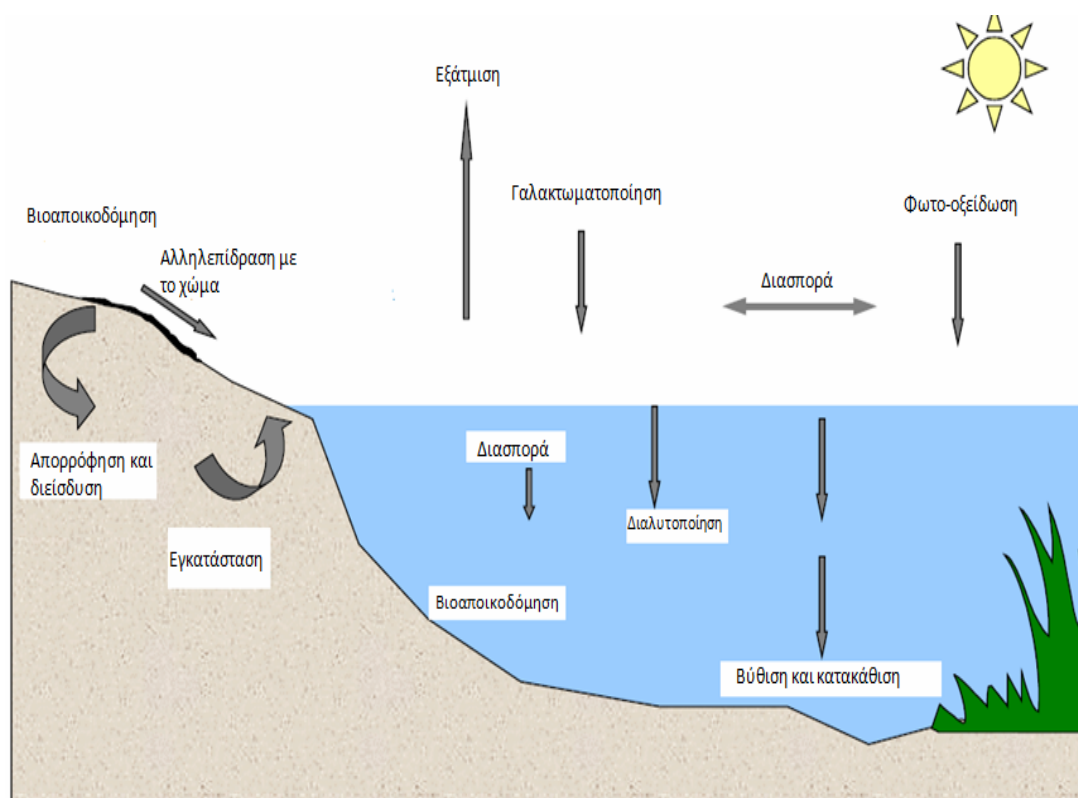
Η αντιμετώπιση της ρύπανσης από το πετρέλαιο γίνεται με τη χρήση συμβατικών μεθόδων, όπως ο φυσικός τρόπος απομάκρυνσης πετρελαίου και διάφορες μηχανικές μεθόδους. Η τεχνολογία που χρησιμοποιείται συχνά για την εξυγίανση περιλαμβάνει μηχανικά συστήματα, θάψιμο, εξάτμιση, διάχυση και πλύσιμο (Atlas *et al*, 1992). Οι μέθοδοι αυτοί κοστίζουν ακριβά και οδηγούν σε μη ολοκληρωμένη αποικοδόμηση καθώς δεν απομακρύνουν πάνω από 10-15% της πετρελαιοκηλίδας. Στόχος λοιπόν είναι η

ανάπτυξη αποτελεσματικών, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών για την αποκατάσταση των ρυπασμένων με πετρέλαιο περιοχών (Atlas, 1981).

1.2.1.1 Φυσικές μέθοδοι αντιμετώπισης της ρύπανσης

Η φυσική ανάκαμψη είναι ένας τρόπος αντιμετώπισης της ρύπανσης με τον οποίο δεν απαιτείται μηχανική επέμβαση στην ρυπασμένη περιοχή, το πετρέλαιο απομακρύνεται και αποικοδομείται με φυσικό τρόπο. Κάποιες πετρελαιοκηλίδες που εντοπίζονται σε απομακρυσμένες και δύσκολα προσβάσιμες περιοχές, όπου οι ρυθμοί απομάκρυνσης και αποικοδόμησης του πετρελαίου είναι αρκετά γρήγοροι, είναι προτιμότερο να απομακρύνονται με αυτόν τον τρόπο.

Κάποιες φυσικές διεργασίες που οδηγούν στην απομάκρυνση του πετρελαίου περιγράφονται παρακάτω. Η εξάτμιση είναι η πιο σημαντική φυσική μέθοδος καθώς απομακρύνεται πάνω από το 50% κάποιων μικρού μοριακού βάρους αλκάνια. Η φωτοοξείδωση είναι η μέθοδος όπου το οξυγόνο αντιδρά με το φως και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των περίπλοκων μειγμάτων σε πιο απλά μόρια τα οποία είναι περισσότερο διαλυτά στο νερό. Τέλος η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης είναι η μέθοδος η οποία επιτυγχάνεται με την δράση ενδογενών μικροοργανισμών (Εικόνα 1.3) (Bragg *et al*, 1994).



Εικόνα 1.3 Σχηματική αναπαράσταση των φυσικών οδών που ακολουθεί το πετρέλαιο σε ρυπασμένες περιοχές με την απορρόφηση, τη διείσδυση, τη διασπορά και τη διαλυτοποίηση να παίζουν το σημαντικότερο ρόλο

1.2.1.2 Μηχανικές μέθοδοι αντιμετώπισης της ρύπανσης

Στις μηχανικές μεθόδους χρησιμοποιούνται διάφορα υλικά μηχανικά μέσα και εργαλεία για την αντιμετώπιση της ρύπανσης (Εικόνα 1.4). Οι κυριότερες μηχανικές μέθοδοι είναι:

1. Μέθοδος ξαφρίσματος (skimming) και φραγμάτων (booming) όπου γίνεται χρήση φραγμάτων για τον έλεγχο της ροής του πετρελαίου
2. Μέθοδος καθαρίσματος με απορροφητικά υλικά
3. Μηχανική αφαίρεση με τη χρήση ειδικών μηχανημάτων για τη συλλογή και απομάκρυνση του πετρελαίου
4. Μέθοδος ξεπλύματος
5. Μέθοδος καψίματος (Doerffer *et al*, 1992)



Εικόνα 1.4 Συμβατικές μέθοδοι ρύπανσης Α. Βιοαποικοδόμηση, Β. Μέθοδος καψίματος, Γ. Μηχανική αφαίρεση με τη χρήση ειδικών μηχανημάτων

1.2.2 Βιοαποκατάσταση- Βιοεξυγίανση

Ο όρος βιοαποκατάσταση ή βιοεξυγίανση ορίζεται ως «η δράση προστιθέμενων υλικών σε ένα ρυπασμένο περιβάλλον που έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας». Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό των συστατικών του πετρελαίου βιοδιασπάται μόνο του στη φύση.

Η βιοαποκατάσταση των περιοχών που έχουν ρυπανθεί από πετρέλαιο γίνεται με την προσθήκη μικροοργανισμών στους ήδη ενδογενείς πληθυσμούς. Δηλαδή η βιοαποκατάσταση με τη μέθοδο της βιοαποικοδόμησης είναι η διαδικασία με την οποία χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που διαθέτουν τα κατάλληλα μεταβολικά μονοπάτια για την αποτοξικοποίηση ή την απομάκρυνση περιβαλλοντικών ρυπαντών συμπεριλαμβανομένου και των προϊόντων της βιομηχανίας πετρελαίου (Prince *et al*, 1993).

Οι ήδη υπάρχοντες ενδογενείς πληθυσμοί δεν μπορούν να αποικοδομήσουν τη μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που υπάρχουν σε ένα τόσο σύνθετο μείγμα όπως το πετρέλαιο ή συνήθως βρίσκονται σε κατάσταση πίεσης ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε αυτό.

Η βιοαποικοδόμηση με τη χρήση ενδογενών βακτηρίων αντιπροσωπεύει έναν από τους κύριους μηχανισμούς με τον οποίο το πετρέλαιο και άλλοι ρυπαντές υδρογονανθράκων μπορούν να απομακρυνθούν από το περιβάλλον και πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνολογιών όσον αφορά στο κόστος και τη διεισδυτικότητα (Das *et al*, 2010). Υπάρχουν δύο βασικές προσεγγίσεις για τη βιοαποκατάσταση των περιοχών αυτών η βιοενίσχυση (biostimulation) και η βιοτόνωση (bioemulsification).

Η επιτυχία της βιοαποκατάστασης εξαρτάται από τη δημιουργία και τη διατήρηση συνθηκών που ενισχύουν τους ρυθμούς αποικοδόμησης του πετρελαίου στο ρυπασμένο περιβάλλον. Αρχικά στο περιβάλλον πρέπει να υπάρχουν οργανισμοί με τα κατάλληλα μεταβολικά μονοπάτια. Στη συνέχεια πρέπει να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες συνθήκες όσον αφορά τις συγκεντρώσεις θρεπτικών, οξυγόνου, pH και θερμοκρασίας ώστε να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες αύξησης των μικροοργανισμών. Τέλος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του πετρελαίου και της επιφάνειας του (Lee *et al*, 1997).

1.2.2.1 Βιοενίσχυση (Biostimulation)

Η βιοενίσχυση είναι η διαδικασία με την οποία βακτήρια που αποικοδομούν το πετρέλαιο προστίθενται στους ήδη υπάρχοντες μικροβιακούς πληθυσμούς. Η βιοενίσχυση υπερτερεί στην κατεργασία των πετρελαιοκηλίδων σε ανοιχτό περιβάλλον. Η βιοενίσχυση μπορεί ακόμα να έχει εφαρμογή στην κατεργασία συγκεκριμένων συστατικών πετρελαίου ή απομονωμένων πετρελαιοκηλίδων.

Η αποτελεσματικότητα της βιοενίσχυσης είναι ειδική για κάθε περιοχή έναντι της βιοτόνωσης. Παραδείγματος χάρη εάν το πετρέλαιο βρίσκεται στην αερόβια ζώνη και τα θρεπτικά συστατικά βρίσκονται σε έλλειψη, τότε η βιοτόνωση είναι πιο αποτελεσματική τεχνική, αντίθετα σε ρύπανση με τολουένιο ή βενζένιο υπερτερεί η βιοενίσχυση (Nikolopoulou *et al*, 2009).

1.2.2.1.1 Ρύπανση με βενζένιο, τολουένιο και ξυλένιο

Στις περισσότερες ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές κάποια υψηλής τοξικότητας παράγωγα όπως το βενζένιο, το τολουένιο και το ξυλένιο (benzene, toluene, xylene BTX) είναι παρόντα. Αυτά τα μονοαρωματικά συστατικά μπορούν να μειώσουν τη ζωτικότητα των βακτηρίων και συνεπώς τη ξενοβιοτική βιοαποικοδόμηση. Μια από τις στρατηγικές που χρησιμοποιείται για να αυξηθεί η βιοαποικοδόμηση είναι η βιοενίσχυση. Η επιτυχής εφαρμογή αυτής της τεχνικής εξαρτάται από την ταυτοποίηση και την απομόνωση κατάλληλων μικροβιακών στελεχών, τα οποία εκτός από την ικανότητα βιοαποικοδόμησης μπορούν να ανταποκρίνονται στις βιοτικές και αβιοτικές πιέσεις στο συγκεκριμένο περιβάλλον (Di Martino *et al*, 2012).

1.2.2.1.2 Προβλήματα βιοενίσχυσης

Η βιοενίσχυση με τη χρήση μικροοργανισμών πολλές φορές αποτυγχάνει γιατί η συγκέντρωση του ρυπαντή είναι πολύ υψηλή για να υποστηρίξει την ανάπτυξη των προστιθέμενων μικροοργανισμών. Επίσης το φυσικό περιβάλλον περιέχει συστατικά που εμποδίζουν την ανάπτυξη ή τη δραστηριότητα του μικροβιακού εμβολίου. Επιπλέον ο ρυθμός ανάπτυξης του εμβολίου μπορεί να περιορίζεται από θηρευτές όπως τα πρωτόζωα. Τέλος οι προστιθέμενοι μικροοργανισμοί πιθανά να χρησιμοποιούν άλλα υποστρώματα στη φύση και όχι τα στοχευμένα υποστρώματα που περιέχονται στο πετρέλαιο.

Είναι σημαντικό για να ξεπεραστούν τα προβλήματα της βιοενίσχυσης οι μικροοργανισμοί που προστίθενται στις ρυπασμένες περιοχές να είναι ικανοί να αποικοδομούν τα περισσότερα συστατικά του πετρελαίου, να διατηρούν τη γενετική σταθερότητα και ζωτικότητα, να επιβιώνουν σε ξένα και εχθρικά περιβάλλοντα, και να ανταγωνίζονται αποτελεσματικά τους ενδογενείς πληθυσμούς (Lee *et al*, 1997).

1.2.2.2 Βιοτόνωση (Bioemulsification)

Βιοτόνωση είναι η διαδικασία όπου η ανάπτυξη των ενδογενών μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πετρέλαιο ενισχύεται με την προσθήκη θρεπτικών ή άλλων υποστρωμάτων που βοηθούν στην ταχύτερη αύξηση τους. Περιοδική προσθήκη κυρίως ανόργανων θρεπτικών έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αποικοδομητικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Das *et al*, 2010).

Θεωρητικά 150 mg αζώτου και 30 mg φώσφορου καταναλώνονται για τη μετατροπή 1 g υδρογονάνθρακα σε κυτταρικό προϊόν. Έτσι μια συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η προσθήκη θρεπτικών σε συγκεντρώσεις που προσεγγίζουν μια στοιχειομετρική αναλογία του C:N:P σε 100:5:1 (Zhu *et al*, 2001). Παρόλα αυτά η πρακτική χρήση αυτής της αναλογίας παραμένει μια πρόκληση. Πρακτικά στις θαλάσσιες ακτές, η διατήρηση αυτής της αναλογίας είναι αδύνατη εξαιτίας της δυναμικής της θάλασσας που είναι αποτέλεσμα της δράσης παλιρροιών και κυμάτων. Τα πιο συχνά διαλυτά στο νερό θρεπτικά που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν ορυκτά θρεπτικών αλάτων και πολλά εμπορικά ανόργανα λιπάσματα.

Η επιτυχία της βιοτόνωσης είναι ειδική κατά περίπτωση, και εξαρτάται από τις ιδιότητες του πετρελαίου, τη φύση των θρεπτικών προϊόντων και τα χαρακτηριστικά του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Όταν το οξυγόνο δεν είναι περιοριστικός παράγοντας, ένα από τα κλειδιά για την επιτυχία της βιοτόνωσης είναι η διατήρηση ενός βέλτιστου θρεπτικού επιπέδου. Σε συνθήκες πεδίου, ειδικά σε πολλά θαλάσσια περιβάλλοντα, απαιτείται συχνά προσθήκη θρεπτικών και λιπασμάτων τα οποία είναι διαλυτά στο νερό.

Η βιοαποκατάσταση με την προσθήκη θρεπτικών έχει αποδειχθεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την κατεργασία ορισμένων ακτών που έχουν ρυπανθεί με πετρέλαιο. Τυπικά χρησιμοποιείται μετά από συμβατικές μηχανικές διαδικασίες για να τελειοποιηθεί η διαδικασία, αν και σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ως πρωταρχικό βήμα (Zhu *et al*, 2001).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων

1.3.1 Βιοδιαθεσιμότητα

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στη βιολογική απομάκρυνση των υδρογονανθράκων από ένα ρυπασμένο περιβάλλον είναι η διαθεσιμότητά τους σε ένα ενεργό μικροβιακό πληθυσμό. Ένας γενικός ορισμός της βιοδιαθεσιμότητας είναι ο βαθμός της αλληλεπίδρασης των χημικών ουσιών όπως τα αλκάνια με τους ζωντανούς οργανισμούς και πιο συγκεκριμένα ο βαθμός με τον οποίο ένας ρυπαντής μπορεί να προσληφθεί γρήγορα από έναν μικροοργανισμό. Η βιοδιαθεσιμότητα του ρυπαντή ελέγχεται από παράγοντες όπως:

- η φυσική μορφή του υδρογονάνθρακα στο πεδίο
- η υδροφοβικότητά του
- η διαλυτότητά του στο νερό
- η προσρόφησή του σε περιβαλλοντικά υλικά όπως το χώμα
- και η διάχυσή του έξω από το υλικό του χώματος

Όταν οι ρυπαντές έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, όπως στην περίπτωση των n-αλκανίων και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs), τα συστατικά της οργανικής φάσης δεν διαχωρίζονται επαρκώς στην υδατική φάση όπου περιέχονται οι μικροοργανισμοί (Abbasnezhad *et al*, 2011).

1.3.2 Φυσικοί παράγοντες

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου είναι το οξυγόνο, το pH, η θερμοκρασία, η αλατότητα κ.α. Πιο αναλυτικά η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι σημαντική για το ρυθμό της βιοαποικοδόμησης επειδή η βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων είναι κυρίως αερόβια διαδικασία. Η βιοαποικοδόμηση επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Ένα παράδειγμα είναι η χρήση της αμμωνίας ως πηγή αζώτου η οποία αναστέλλει την αύξηση των μικροοργανισμών (Kim *et al*, 2005). Επίσης η θερμοκρασία επηρεάζει τις ιδιότητες του πετρελαίου και της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας. Όσο μειώνεται η θερμοκρασία, μειώνεται και η διαλυτότητα και ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης. Στα θαλάσσια περιβάλλοντα η θερμοκρασία κυμαίνεται από 15-20 °C ενώ στα γλυκά νερά από 20-30 °C (Delille *et al*, 2004). Επιπλέον η αλατότητα του περιβάλλοντος έχει σημαντικό ρόλο στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου κυρίως σε θαλάσσιες και παράκτιες περιοχές. Τα θρεπτικά συστατικά κυρίως το άζωτο και το φώσφορο είναι σημαντικά για την επιτυχή βιοαποικοδόμηση γιατί δρουν ως περιοριστικοί παράγοντες στην διαδικασία βιοαποικοδόμησης. Τέλος η φωτο-οξειδωση αυξάνει τη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και κατ'επέκταση τη μικροβιακή δραστηριότητα (Cha[^]ineau *et al*, 2005).

Ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι η παρουσία μικροοργανισμών με τις κατάλληλες μεταβολικές ικανότητες. Εάν αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες τότε οι

βέλτιστοι ρυθμοί ανάπτυξης και βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων μπορούν να επιτευχθούν (Fritsche *et al*, 2000).

1.4 Μικροβιακή αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων πετρελαίου

Η βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων του πετρελαίου είναι μια περίπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από τη φύση και την ποσότητα των υδρογονανθράκων. Το αργό πετρέλαιο είναι ένα περίπλοκο μείγμα υδρογονανθράκων το οποίο αποτελείται από κορεσμένους, αρωματικούς, αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (φαινόλες, λιπαρά οξέα, κετόνες, εστέρες, πορφυρίνες) και ρητίνες (resins) (πυριμιδίνες, κυνολίνες, καρβοζύλια, σουλφοξείδια, αμίδες) (Brusseau *et al*, 1998).

Τα συστατικά των υδρογονανθράκων του πετρελαίου αναμιγνύονται και δύσκολα απομακρύνονται ή αποικοδομούνται. Οι υδρογονάνθρακες διαφέρουν στην τάση τους να υπόκεινται σε μικροβιακή αποικοδόμηση. Η ιεραρχία ως προς την τάση αυτή είναι αρχικά η βιοαποικοδόμηση ευθείας αλυσίδας αλκάνια στη συνέχεια αποικοδομούνται τα διακλαδισμένα αλκάνια, μετά οι μικροί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τέλος τα κυκλικά αλκάνια (Brusseau *et al*, 1998).

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να βιοαποικοδομεί υδρογονάνθρακες εξαρτάται από τη γενετική του σύσταση και την έκφραση της γενετικής πληροφορίας καθώς και από τις ιδιότητες του κάθε υδρογονάνθρακα. Η δυνατότητα εφαρμογής της βιοαποικοδομητικής ικανότητας στο περιβάλλον επηρεάζεται επίσης από τις φυσικοχημικές συνθήκες.

Έτσι οι παράμετροι που επηρεάζουν την επιτυχία της βιοαποκατάστασης μπορούν πιθανά να ταξινομηθούν σε τρεις αλληλοεξαρτώμενες κατηγορίες:

1. Ιδιότητες του μικροοργανισμού ή της κοινότητας των μικροβίων
2. Περιβαλλοντικές συνθήκες που υποστηρίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών
3. Ιδιότητες του υποστρώματος υδρογονάνθρακα (Εικόνα 1.5) (Abbasnezhad *et al*, 2011).

Οι υδρογονάνθρακες στο περιβάλλον αποικοδομούνται αρχικά από τα βακτήρια, τις ζύμες και τους μύκητες. Η ικανότητα βιοαποικοδόμησης είναι από 6-82% για τους μύκητες εδάφους, 0,13-50% για τα βακτήρια εδάφους και 0,003-100% για τα θαλάσσια βακτήρια. Μεικτοί πληθυσμοί με ευρύτερες ενζυματικές ικανότητες απαιτούνται για την αποικοδόμηση περίπλοκων μειγμάτων υδρογονάνθρακων όπως το αργό πετρέλαιο (Adebusoye *et al*, 2007).



Εικόνα 1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση. Υπάρχει αλληλεξάρτηση των τριών συνισταμένων (μικροοργανισμός, περιβάλλον και υδρογονάνθρακας) για την κατάλληλη και επιτυχημένη βιοαποικοδόμηση. Πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπ’ όψιν και οι τρεις παράμετροι για την βιοεξυγίανση των ρυπασμένων περιοχών

1.4.1 Βακτήρια που αποικοδομούν αλκάνια

Οι φυσικές διαδικασίες βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου μπορούν να απομακρύνουν το πετρέλαιο από το θαλάσσιο περιβάλλον, με τα βακτήρια να είναι τα πιο ενεργά στην αποικοδόμηση του πετρελαίου και να θεωρούνται ως οι αρχικοί αποικοδομητές του πετρελαίου στο περιβάλλον (McKew *et al*, 2007). Συνήθως τα αλκάνια δεν προτιμώνται ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων τα οποία χρησιμοποιούν άλλες πηγές άνθρακα πριν καταβολίσουν τα αλκάνια (Rojo Fernando, 2009).

Αρκετά βακτήρια είναι γνωστό ότι τρέφονται με υδρογονάνθρακες όπως για παράδειγμα το *Acinetobacter sp.* το οποίο είναι ικανό να χρησιμοποιεί τα n-αλκάνια με μήκος αλυσίδας C₁₀-C₄₀ ως μοναδική πηγή άνθρακα. Επίσης από ρυπασμένες με πετρέλαιο περιοχές έχουν απομονωθεί τα γένη *Gordonia s.*, *Brevibacterium sp.*, *Aeromicrobium sp.*, *Dietzia sp.*, *Burkholderia sp.* και *Mycobacterium sp* (Harayama *et al*, 2004).

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που βιοαποικοδομούν πετρέλαιο που περιέχει αρωματικούς υδρογονάνθρακες στα θαλάσσια οικοσυστήματα περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Jones *et al* (1983), όπου μελετήθηκε η εκτεταμένη βιοαποικοδόμηση των αλκυλικών αρωματικών υδρογονάνθρακων στα θαλάσσια οικοσυστήματα και ανιχνεύτηκαν μικροοργανισμοί που ανήκουν στα γένη *Arthrobacter sp.*, *Burkholderia sp.*,

Mycobacterium s., *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.* και *Rhodococcus sp.*. Τα στελέχη που ανήκουν στα γένη αυτά εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των αλκυλοκυκλικών υδρογονάνθρακων (Engelhardt *et al*, 2001).

Επίσης έχει αναφερθεί η αποικοδόμηση των πολυαρωματικών υδρογονάνθρακων από είδη του γένους *Sphingomonas sp.* και *Cycloclasticas sp.* ενώ έχει αναφερθεί η αποικοδόμηση του πριστανίου από το γένος *Alcanivorax sp* (Yakimov *et al*, 2009).

1.4.2 Βακτήρια που χρησιμοποιούν ως μοναδική πηγή άνθρακα το πετρέλαιο (Hydrocarbonoclastic Bacteria)

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί μια νέα οικοφυσιολογικά ασυνήθιστη ομάδα θαλάσσιων βακτηρίων που αποικοδομούν το πετρέλαιο - τα υποχρεωτικά hydrocarbonoclastic βακτήρια (Obligate oil-degrading marine bacteria - OHCB) τα οποία επιδεικνύουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική απομάκρυνση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων από τα ρυπασμένα νερά των θαλασσών. Όταν έχουμε εκροή πετρελαίου σε ένα οικοσύστημα σχηματίζονται μικροβιακές κοινότητες που αποτελούνται από τα γένη *Alcanivorax sp.*, *Marinobacter sp.*, *Thalassolituus sp.*, *Cycloclasticus sp.*, τα οποία είναι παρόντα σε χαμηλά μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πριν από τη ρύπανση της περιοχής. Τα γένη των OHCB που επικρατούν εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, την αλατότητα και άλλους φυσικοχημικούς παράγοντες.

Τα βακτηρία που χρησιμοποιούν ως μοναδική πηγή άνθρακα το πετρέλαιο (Hydrocarbonoclastic Bacteria) ανήκουν κυρίως στην κατηγορία, των γ-πρωτεοβακτηρίων. Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί πολλά νέα είδη OHCB από υδάτινα οικοσυστήματα. Τα βακτήρια αυτά παίζουν σπουδαίο ρόλο στην απομάκρυνση των υδρογονανθράκων από τις ρυπασμένες περιοχές (Head *et al*, 2006).

1.4.3 Ομάδες ετερογενών βακτηρίων (consortia)

Η αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων στις πετρελαιοκηλίδες γίνεται κυρίως με την ανάπτυξη ομάδων ετερογενών βακτηρίων (consortia). Κάθε ένα από τα συστατικά του πετρελαίου αποτελεί μια διαφορετική πηγή υδρογονάνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη κάθε βακτηρίου. Σε κάποιες περιπτώσεις οι υδρογονάνθρακες μπορεί να έχουν ανασταλτικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα περισσότερα βακτήρια αποικοδομούν μια μικρής κλίμακας αλειφατικών και αρωματικών συστατικών αν και κάποια βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas sp.* και *Rhodococcus sp.* έχει βρεθεί, ότι αποικοδομούν διαφορετικών ειδών υδρογονάνθρακες.

Ενώ πολλά βακτήρια μπορούν να αποικοδομούν διαφορετικά είδη υδρογονάνθρακων σε καθαρές (αξενικές) καλλιέργειες, στις μεικτές καλλιέργειες ο ανταγωνισμός μέσα στη βακτηριακή κοινότητα πιθανά δεν επιτρέπει σε τέτοια στελέχη να πολλαπλασιαστούν (McKew *et al*, 2007). Λίγα είναι γνωστά για το λειτουργικό ρόλο κάθε βακτηρίου ξεχωριστά μέσα σε μια κοινότητα τέτοιων βακτηρίων. Συμπερασματικά οι διάφορες μικτές βακτηριακές κοινότητες (consortia) μπορούν να αποικοδομούν σε μεγάλο βαθμό το πετρέλαιο αλλά ο ειδικός ρόλος κάθε στελέχους στην διαδικασία της βιοαποικοδόμησης παραμένει ασαφής.

Σε όλους τους μικρόκοσμους η βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων είναι εμφανής τις πρώτες δέκα εβδομάδες όπου αποικοδομείται περίπου το 99% μικρού μοριακού βάρους αλκανίων ($C_{10} - C_{18}$), το 41-84% μεγάλου μοριακού βάρους αλκανίων ($C_{20} - C_{32}$) περιλαμβανομένου και του πριστανίου και 32-88% πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονάνθρακων (PAHs) (Harayama *et al*, 1999).

1.5 Μηχανισμοί αποικοδόμησης των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων

1.5.1 Πρόσληψη n-αλκανίων

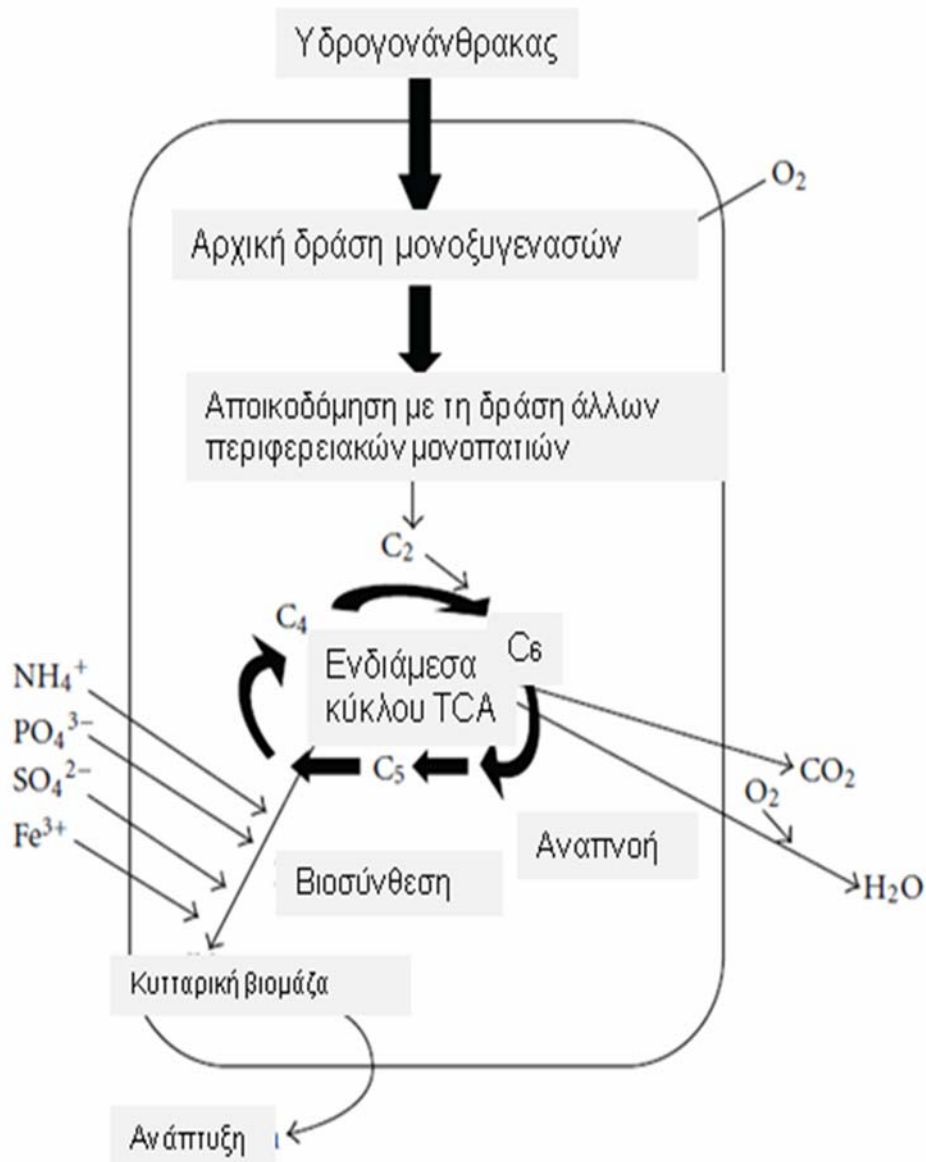
Τα αλκάνια είναι δυσδιάλυτα στο νερό. Η διαλυτότητα τους μειώνεται όσο αυξάνεται το μοριακό τους βάρος. Αυτό εμποδίζει την πρόσληψη των αλκανίων από τους μικροοργανισμούς. Ο μηχανισμός πρόσληψης μπορεί να διαφέρει και εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων, το μοριακό βάρος των αλκανίων και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος. Χαμηλά μοριακού βάρους αλκάνια είναι αρκετά διαλυτά και έτσι μια απευθείας πρόσληψη των αλκανίων μπορεί να βεβαιώσει μια επαρκή μεταφορά μάζας μέσα στο κύτταρο. Για μεσαίας και μακράς αλυσίδας n-αλκάνια, οι μικροοργανισμοί έχουν πρόσβαση είτε μέσω πρόσδεσης σε σταγόνες πετρελαίου-νερού ή μέσω έκλυσης γαλακτωματοποιητών (επιφανειοδραστικών παραγόντων). Τα περισσότερα βακτήρια που αποικοδομούν αλκάνια εκλύουν ποικιλία επιφανειοδραστικών παραγόντων που γαλακτωματοποιούν τους υδρογονάνθρακες (Fernando Rojo, 2009).

1.5.2 Αερόβια αποικοδόμηση των αλκανίων

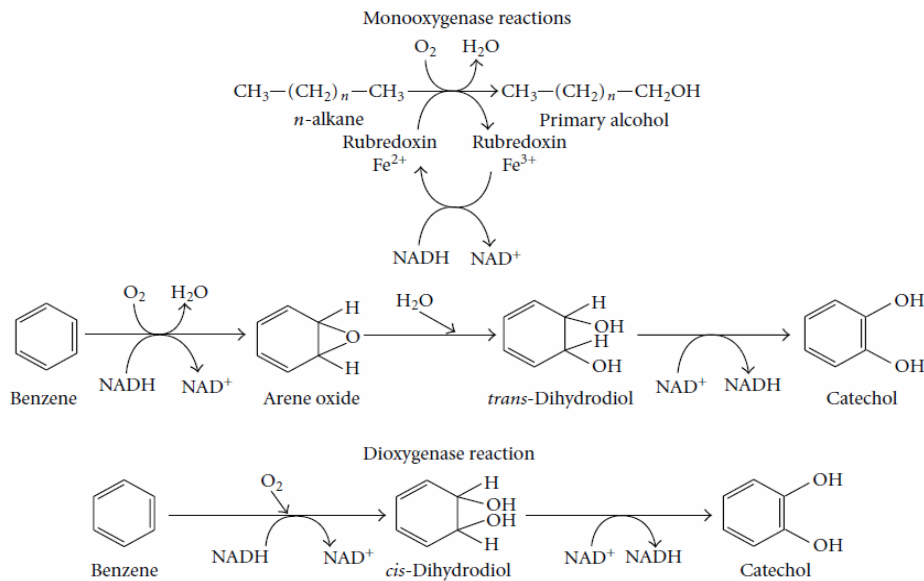
Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το πετρέλαιο χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την αρχική πρόσληψη των αλκανίων με τη χρήση ειδικών ενζύμων που ενεργοποιούν τα αλκάνια και ονομάζονται μονοξυγενάσες (Εικόνα 1.7).

Στην περίπτωση των n-αλκανίων που περιέχουν 2-3 άτομα άνθρακα, η αερόβια αποικοδόμηση συνήθως αρχίζει με την οξειδωση της τελικής μεθυλικής ομάδας η οποία μετατρέπεται σε αλκοόλη, στην συνέχεια σε αλδεΐδη και τελικά σε ένα λιπαρό οξύ. Τα λιπαρά οξέα συνδέονται με το συνένζυμο A και υπόκεινται σε β-οξειδωση για να παραχθεί ακέτυλο - συνένζυμο-A (Εικόνα 1.6).

Ο μηχανισμός που συνδέει την προσκόλληση του κυττάρου στο πετρέλαιο είναι άγνωστος. Το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 φαίνεται να εμπλέκεται στη βιοαποικοδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονάνθρακων (Van Beilen *et al*, 2007).



Εικόνα 1.6. Πορεία βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων μέσα στο κύτταρο. Αρχικά οι υδρογονάνθρακες υφίστανται την δράση μονοξυγενασών, στην συνέχεια μπαίνουν μέσα στο κύτταρο όπου ακολουθούν μεταβολικές πορείες του κυττάρου (κύκλος του Krebs κ.α). Τελικά με την πρόσληψη ιόντων αμμωνίας, φωσφόρου κ.α, οδηγείται το μικροβιακό κύτταρο σε αύξηση της βιομάζας χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα υδρογονάνθρακες



E

ικόνα 1.7. Χημικές αντιδράσεις βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων. Η αρχική πρόσληψη γίνεται με την βοήθεια μονοξυγενασών (monooxygenase)

1.5.3 Προσκόλληση των υδρογονανθράκων στην επιφάνεια του κυττάρου

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να προσκολλώνται στην υδρόφοβη επιφάνεια του κυττάρου οι υδρογονάνθρακες είναι μια κοινή στρατηγική που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για να υπερπηδήσουν το πρόβλημα της περιορισμένης διαθεσιμότητας σε υδρογονάνθρακες. Η προσκόλληση των κυττάρων σε έναν υδρογονάνθρακα δεν σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του να τον χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για την αύξησή του. Κάποιοι επιστήμονες έδειξαν ότι είδη όπως ο *Staphylococcus aureus* και ο *Serratia marcescens* που δεν είναι ικανά να μεγαλώνουν σε υδρογονάνθρακες μπορούν να προσκολλούνται σε αυτούς. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η προσκόλληση σε υδρογονάνθρακες δεν υπονοεί και χρήση τους συγχρόνως από τον μικροοργανισμό (Abbasnezhad *et al*, 2011).

1.5.3.1 Παραγωγή επιφανειοδραστικών παραγόντων από τους μικροοργανισμούς

Μια ακόμα φυσική μικροβιακή απόκριση στην περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα είναι η παραγωγή επιφανειοδραστικών παραγόντων (γαλακτοματοποιητών). Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι μια ετερογενής ομάδα επιφανειακών ενεργών χημικών συστατικών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς. Το γένος *Pseudomonas sp.* είναι το πιο γνωστό βακτήριο ικανό να χρησιμοποιεί υδρογονάνθρακες ως πηγή άνθρακα και ενέργειας και να παράγει επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες αυξάνουν την επιφάνεια του πετρελαίου και το ποσοστό του πετρελαίου που είναι διαθέσιμο στα βακτήρια για να το χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα. Επίσης δρουν ως ενισχυτικοί παράγοντες μειώνοντας την επιφανειακή τάση και σχηματίζοντας σφαιρικές διατάξεις σε υδατικό διαλύτη όπου επιμήκεις αλυσίδες άνθρακα συσσωματώνονται προς σχηματισμό υδρόφοβης σφαίρας ενώ ιοντικά άκρα

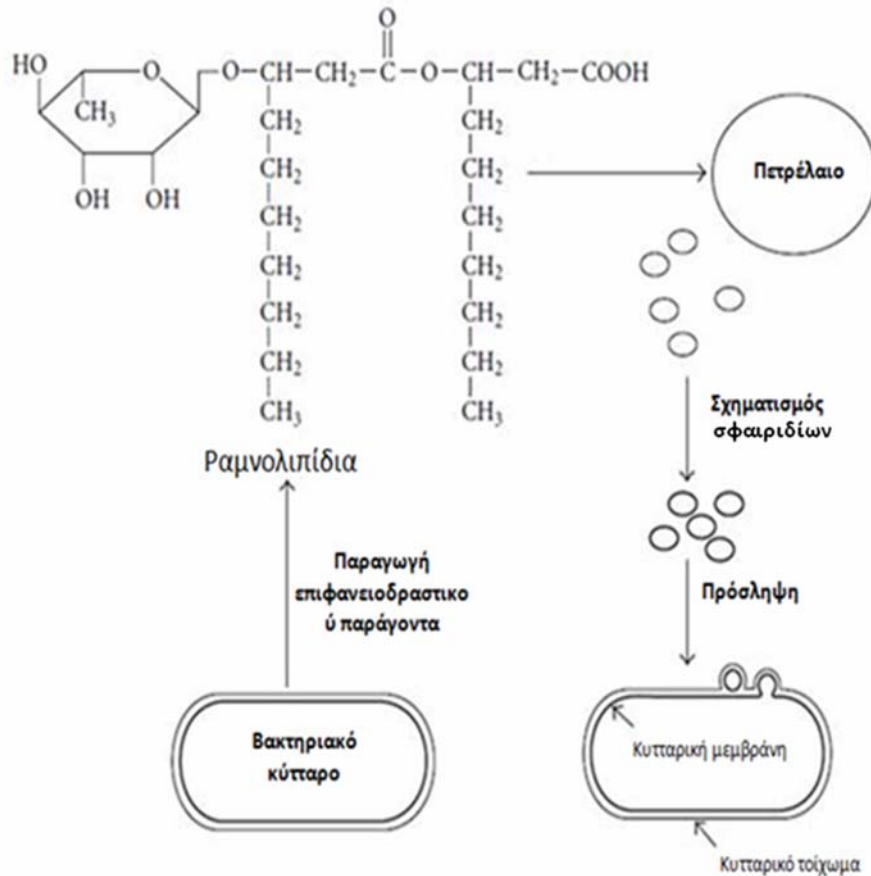
τείνουν προς τα μόρια νερού (micelle), τα οποία στην παρούσα Διπλωματική Εργασία θα αναφέρονται ως σφαιρίδια⁵⁰ (Εικόνα 1.8) (Kumar et al, 2008).

Η παραγωγή των παραγόντων αυτών από μικροοργανισμούς και η εφαρμογή συνθετικών επιφανειοδραστικών παραγόντων στις διαδικασίες βιοαποικοδόμησης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα αρκετοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες να είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο (Πίνακας 1.2). Η προσκόλληση ενός μικροοργανισμού στην επιφάνεια όπου βρίσκεται το πετρέλαιο αυξάνει τον ρυθμό μεταφοράς υδρογονάνθρακων από τη μη υδατική φάση στο κύτταρο. Σε ένα μείγμα νερού - πετρελαίου, ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ότι η προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια πετρελαίου- νερού μπορεί να σταθεροποιεί τους γαλακτοματοποιητές, και έτσι να αυξάνει τη διεπιφανειακή περιοχή πετρελαίου - νερού.

Πίνακας 1.2. Επιφανειοδραστικοί παράγοντες

| Επιφανειοδραστικοί παράγοντες | Μικροοργανισμός |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Σοφορολιπίδια (Sophorolipids) | <i>Candida bombicola</i> |
| Ραμνολιπίδια (Rhamnolipids) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Λιτομανάνη (Lipomannan) | <i>Candida tropicalis</i> |
| Ραμνολιπίδια (Rhamnolipids) | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| Σουρφακτίνη (Surfactin) | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Γλυκολιπίδιο (Glycolipid) | <i>Aeromonas sp</i> |
| Γλυκολιπίδιο (Glycolipid) | <i>Bacillus sp</i> |

⁵⁰ Σφαιρικές διατάξεις σε υδατικό διαλύτη όπου επιμήκεις αλυσίδες άνθρακα συσσωματώνονται προς σχηματισμό υδρόφοβης σφαίρας ενώ ιοντικά άκρα τείνουν προς τα μόρια νερού (micelle)



Εικόνα 1.8 Δράση επιφανειοδραστικών παραγόντων. Αρχικά το βακτηριακό κύτταρο εκλύει ουσίες που ονομάζονται επιφανειοδραστικοί παράγοντες που βοηθούν στον σχηματισμό σφαιριδίων⁵¹ με τους υδρογονάνθρακες. Έτσι είναι πολύ πιο εύκολη η μετέπειτα πρόσληψη των σφαιριδίων αυτών από τα βακτηριακά κύτταρα καθώς μπορούν να ενσωματωθούν εύκολα στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων

1.5.3.2 Μηχανισμοί προσκόλλησης των μικροοργανισμών στους υδρογονάνθρακες

Το εξωτερικό ενός κυττάρου συνήθως αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες, και/ή ολιγοσακχαρίτες τα οποία επηρεάζουν την κυτταρική υδροφοβικότητα και την προσκόλληση σε επιφάνειες. Εξωκυτταρικά υλικά όπως εξωμεμβρανικοί λιποσακχαρίτες και πρωτεΐνες, κάψουλες (capsule), και προσκολλητικά πύλι (adhesive pili), μπορούν να εκτείνουν αρκετά τον κυτταρικό τοίχωμα και έτσι η κυτταρική επιφάνεια να γίνει πιο προσιτή στην επιφάνεια του πετρελαίου.

Η κυτταρική προσκόλληση στους υδρογονάνθρακες πιθανά γίνεται μέσω πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια. Οι πιο εμφανής πρωτεΐνες αυτού του είδους είναι οι κροσσοί [fimbriae(pili)] των Gram αρνητικών βακτηρίων.

⁵¹ βλέπε σελίδα 20, αναφορά 1

Η παρουσία υδρόφιλων λιποπολυσακχαριτών (LPS) στην εξωτερική επιφάνεια των Gram αρνητικών μικροβίων επηρεάζει την προσκόλληση στους υδρογονάνθρακες μέσω της αλλαγής της υδροφοβικότητας της κυτταρικής επιφάνειας. Σύμπλοκα βιοπολυμερών που αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα βρίσκονται συχνά στην κυτταρική επιφάνεια των βακτηρίων και βοηθούν να σταθεροποιηθούν οι σταγόνες πετρελαίου-νερού.

Οι τρόποι πρόληψης που προτείνονται είναι η άμεση πρόσληψη από την υδατική φάση, η πρόσληψη που υποβοηθάτε από επιφανειοδραστικούς παράγοντες οι οποίοι είτε μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα ή να γαλακτωματοποιήσουν τους υδρογονάνθρακες και η απευθείας επαφή, όπου το κύτταρο ενώνεται στο υπόστρωμα στο οποίο οι υδρογονάνθρακες είναι διαλυμένοι

Η μικροβιακή προσκόλληση μπορεί να αυξήσει την ανάπτυξη και τη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων, ειδικά στην περίπτωση υδρογονανθράκων που είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό όπως τα n-αλκάνια και μεγάλοι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες PAHs

Πληθυσμοί που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες μπορεί να είναι ετερογενής όσον αφορά την επιφανειακή υδροφοβικότητα και τις ιδιότητες προσκόλλησης. Έτσι μπορούν να αποκριθούν γρήγορα παρουσία υδρογονανθράκων αλλάζοντας τις ιδιότητες της επιφάνειας. Συνεπώς, κάτω υπό συνθήκες χαμηλής διαλυτότητας υποστρώματος τα κύτταρα με ικανότητα προσκόλλησης ευνοούνται (Harms *et al*, 2010).

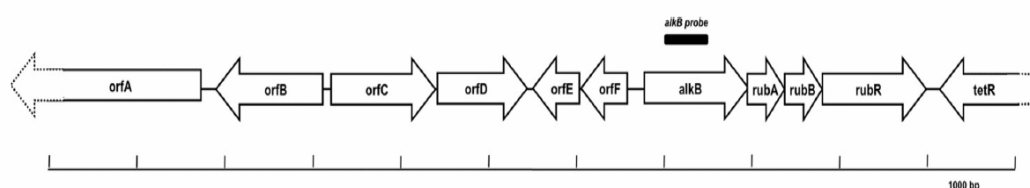
1.5.4 Μεταβολικά μονοπάτια αποικοδόμησης υδρογονανθράκων στα βακτήρια

Το καλύτερα χαρακτηρισμένο μονοπάτι αποικοδόμησης αλκανίων είναι αυτό που κωδικοποιείται από γονίδια που περιέχονται στο OCT πλασμίδιο της *Pseudomonas putida* GPo1. Το πρώτο ένζυμο αυτού του μονοπατιού είναι μια εσωτερική χωρίς αίμη μονοξυγενάση που τοποθετείται στην μεμβράνη και περιέχει 2 άτομα σιδήρου (AlkB) η οποία υδρολύει τα αλκάνια (Wasmund *et al*, 2009). Η πρωτεΐνη AlkB απαιτεί δύο διαλυτές πρωτεΐνες μεταφοράς πρωτονίων που ονομάζονται: ρουμπρεντοξίνη (rubredoxin) (AlkG) και αναγωγία της ρουμπρεντοξίνης (AlkT) (Carpelletti *et al*, 2011). Η πρωτεΐνη AlkT μέσω του συμπαραγόντα FAD, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στη ρουμπρεντοξίνη, η οποία αντίστροφα μεταφέρει ηλεκτρόνια στην πρωτεΐνη AlkB (Rojo Fernando, 2009).

Αν και η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης AlkB δεν είναι διαθέσιμη πιθανά έχει 6 διαμεμβρανικά τμήματα και μια καταλυτική πλευρά προς το κυτταρόπλασμα. Το ενεργό μέρος περιλαμβάνει 4 μοτίβα που περιέχουν αλληλουχίες ιστιδίνης τα οποία είναι συντηρημένα και σε άλλες μονοξυγενάσες υδρογονανθράκων και περικλείουν 2 άτομα σιδήρου. Αυτό το σύμπλεγμα με τα 2 άτομα σιδήρου επιτρέπει την εξαρτώμενη με οξυγόνο

ενεργοποίηση του αλκανίου μέσω ενός βασικού ενδιάμεσου υποστρώματος. Ένα από τα άτομα οξυγόνου μεταφέρεται στην τελική μεθυλομάδα του αλκανίου μετατρέποντας την σε αλκοόλη. Περισσότερα από 60 ομόλογα γονιδίων AlkB έχουν βρεθεί και σε Gram θετικά και σε Gram αρνητικά βακτήρια (Fernando Rojo, 2009).

Η τελική οξείδωση των αλκανίων από τις υδροξυλάσες αλκανίων παράγει αρχικά αλκοόλες που οξειδώνονται περαιτέρω σε αλδεΐδες από μια αλκοολική διυδρογενάση (ADH). Τα γονίδια της διυδρογενάσης βρίσκονται επίσης στο OCT πλασμίδιο της *P. putida* GPO1. Εντούτοις δεν είναι απαραίτητα για τον καταβολισμό των αλκανίων επειδή υπάρχουν παρόμοια ένζυμα και στο χρωμόσωμα (Dinamarca *et al*, 2003).



Εικόνα 1.9 Γενετική διάταξη του οπερονίου που περιέχει το γονίδιο alkB στο OCT πλασμίδιο της *P.putida* GPO1(Dinamarca *et al*, 2003)

1.5.4.1 Οργάνωση των γονιδίων που σχετίζονται με την αποικοδόμηση των αλκανίων

Η οργάνωση των γονιδίων διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα διαφορετικά είδη βακτηρίων που αποικοδομούν τα αλκάνια. Τα γονίδια που αποικοδομούν τα αλκάνια στο OCT πλασμίδιο της *P.putida* GPO1 ομαδοποιούνται σε 2 οπερόνια τα οποία μεταφέρονται οριζόντια σε πολλά βακτήρια (Εικόνα 1.9). Σε κάποιες περιπτώσεις τα γονίδια που κωδικοποιούν για την υδροξυλάση - μονοξυγενάση των αλκανίων βρίσκονται σε διαφορετική θέση από τις βοηθητικές τους πρωτεΐνες ρουμπρεντοξίνη και αναγωγή της ρουμπρεντοξίνης. Όταν σε ένα στέλεχος υπάρχουν πολλές υδροξυλάσες των αλκανίων τοποθετούνται φυσιολογικά σε θέσεις μέσα στο χρωμόσωμα (Kotani *et al*, 2006).

1.5.4.2 Ρύθμιση των μεταβολικών μονοπατιών αποικοδόμησης των αλκανίων στα βακτήρια

Η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην αρχική οξείδωση των αλκανίων ελέγχεται από έναν μεταγραφικό παράγοντα που εξασφαλίζει ότι αυτά θα εκφραστούν μόνο παρουσία των κατάλληλων αλκανίων. Τα αλκάνια είναι μη πολικά μόρια που συνήθως συσσωρεύονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι συνήθως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

Η ρύθμιση των γονιδίων που αποικοδομούν τα αλκάνια μπορεί να γίνεται με πολλούς τρόπους και να προσαρμόζεται στις υπάρχουσες περιβαλλοντικές και φυσιολογικές συνθήκες. Πολλά στελέχη έχουν αρκετά συστήματα αποικοδόμησης αλκανίων το καθένα από τα οποία είναι ενεργό σε συγκεκριμένο τύπο ανθρακικής αλυσίδας ή εκφράζεται κάτω από ειδικές φυσιολογικές συνθήκες. Η διαφορετική ρύθμιση

κατευθύνεται από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που αποκρίνονται σε κάποια ειδική σηματοδότηση.

1.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες βιοαποκατάστασης από μικροοργανισμούς

Οι παράγοντες βιοαποκατάστασης ορίζονται ως καλλιέργειες μικροοργανισμών και ένζυμα τα οποία αυξάνουν σημαντικά τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης. Προς το παρόν στη λίστα με τους παράγοντες βιοαποκατάστασης έχουν συμπεριληφθεί 15 προϊόντα, αλλά ο αριθμός τους έχει ήδη μειωθεί στα 9 γιατί οι απαιτήσεις για να συμπεριληφθεί κάποιο προϊόν στη λίστα έχουν γίνει πιο απαιτητικές.

Ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα στις έρευνες πεδίου είναι η σωστή εκτίμηση της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου. Οι αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα της βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου πρέπει να περιλαμβάνουν τη γρηγορότερη απομάκρυνση του πετρελαίου σε κατεργασμένο πεδίο από ότι σε ακατέργαστο και αποδείξεις ότι η βιοαποικοδόμηση ήταν ο κύριος λόγος για την αύξηση του ρυθμού της απομάκρυνσης του πετρελαίου

Μη - βιοδιασπώμενα ή αργά βιοδιασπώμενα υλικά στο πετρέλαιο, που συχνά καλούνται βιοδείκτες, όπως τα οπάνια και τα στεράνια και σε λιγότερο βαθμό κυκλικό υδρογονάνθρακες όπως το C3- χρυσένιο, είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματικά για τον διαχωρισμό ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση και τις φυσικές ή χημικές απώλειες του πετρελαίου.

Οι μελέτες που συγκρίνουν τη βιοενίσχυση και τη βιοτόνωση προτείνουν ότι η προσθήκη θρεπτικών μόνη της έχει μεγαλύτερο αποτέλεσμα στην βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου από την προσθήκη μικροβιακών προϊόντων όταν η παροχή οξυγόνου δεν είναι περιοριστικός παράγοντας. Αυτό συμβαίνει πιθανά επειδή ο πληθυσμός που αποικοδομεί υδρογονάνθρακες σπάνια είναι περιοριστικός παράγοντας συγκρινόμενος με τα θρεπτικά καθώς το μέγεθος των βακτηρίων που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες συνήθως αυξάνεται γρήγορα κατά την απόκριση στην ρύπανση από το πετρέλαιο (National Environmental Technology Application Center (2003).

1.6.1 Εμπορικά διαθέσιμοι παράγοντες βιοαποκατάστασης

Σύμφωνα με την USEPA οι παράγοντες βιοαποκατάστασης ταξινομούνται σε βιοενισχυτικούς παράγοντες και τονωτικούς παράγοντες βασιζόμενοι στις δύο κύριες προσεγγίσεις στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου. Πολλά προϊόντα βιοαποικοδόμησης έχουν προταθεί και προωθηθεί από τους πωλητές τους ειδικά στις αρχές του 1990, όταν η βιοαποικοδόμηση ήταν διάσημη ως η έσχατη λύση στις πετρελαιοκηλίδες (Floch *et al*, 1999).

Η USEPA συνέθεσε μια λίστα από 15 βιοενισχυτικούς παράγοντες (Πίνακας 1.3) ως μέρος της λίστας της National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan (NCP) Product Schedule.

Πίνακας 1.3. Εμπορικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες βιοεξυγίανσης

| Όνομασία προϊόντος | Τύπος προϊόντος | Κατασκευαστής |
|---|--|--|
| BET BIOPETRO | Μικροβιακή καλλιέργεια | BioEnviro Tech, Tomball, TX |
| BILGEPRO | Θρεπτικό υπόστρωμα | International Environment Products, LLC, Conshohocken, PA |
| INIPOL EAP 22 | Θρεπτικό υπόστρωμα | Societe, CECA S.A., France |
| LAND AND SEA RESTORATION | Θρεπτικό υπόστρωμα | Land and Sea restoration LLC, San Antonio, TX |
| MICRO-BLAZE | Μικροβιακή καλλιέργεια/ ενζυμικό υπόστρωμα | Verde Environmental, Inc., Houston, TX |
| OIL SPILL EATER II | Μικροβιακή καλλιέργεια | Oil Spill Eater International, Corporation Dallas, TX |
| OPPENHEIMER FORMULA | Μικροβιακή καλλιέργεια | Oppenheimer Biotechnology, Inc., Austin, TX |
| PRISTINE SEA II | Μικροβιακή καλλιέργεια | Marine Systems, Baton Rouge, LA |
| STEP ONE | Μικροβιακή καλλιέργεια | B & S Research, Inc., Embarrass, MN |
| SYSTEM E.T. 20 | Μικροβιακή καλλιέργεια | Quantum Environmental Technologies, Inc. (QET), La Jolla, CA |
| VB591 TM WATER VB997 TM SOIL BINUTRIX | Θρεπτικό υπόστρωμα | BioNutraTech, Inc., Houston, TX |
| WMI-2000 | Μικροβιακή καλλιέργεια | WMI International, Inc., Houston, TX |

Τα προϊόντα αυτά ίσως είναι περισσότερο αποτελεσματικά στο εργαστήριο από ότι σε συνθήκες πεδίου. Αυτό συμβαίνει γιατί οι εργαστηριακές έρευνες δεν μπορούν να εξομοιώσουν τις περίπλοκες συνθήκες πεδίου και την περιορισμένη μεταφορά θρεπτικών. Έτσι οι μελέτες πεδίου και οι εφαρμογές στο πεδίο είναι τα καταλληλότερα πειράματα και η πιο πειστική απόδειξη για την αποτελεσματικότητα των βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων.

Πολύ λίγα μικροβιακά προϊόντα έχουν αναπτυχθεί και είναι εμπορικά διαθέσιμα ως παράγοντες βιοεξυγίανσης για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων. Κάποια οργανικά θρεπτικά προϊόντα όπως τα ελαιόφιλα θρεπτικά προϊόντα έχουν εκτιμηθεί ως παράγοντες βιοαποκατάστασης. Στην κατηγορία αυτή ακόμη 2 παράγοντες είναι :

- EAP22
- BIOREN 1 (Das *et al*, 2010)

1.7 Εναλλακτικοί τρόποι αποικοδόμησης υδρογονανθράκων

1.7.1 Περιβαλλοντική φυτοαποκατάσταση για βιοεξυγίανση των ρυπασμένων περιοχών

Η Φυτοαποκατάσταση είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία που χρησιμοποιεί τα φυτά για να διαχειριστεί μια μεγάλη ποικιλία προβλημάτων περιβαλλοντικής ρύπανσης, περιλαμβανόμενο τον καθαρισμό του χώματος και των υπόγειων νερών από υδρογονάνθρακες και άλλα επικίνδυνα συστατικά. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης φυτών είναι το χαμηλό κόστος, τα αισθητικά πλεονεκτήματα και οι μακράς διαρκείας εφαρμογές (Cunningham *et al*, 2006).

1.7.2 Χρησιμοποίηση γενετικά τροποποιημένων βακτηρίων για βιοεξυγίανση

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει εφαρμογές γενετικά τροποποιημένων βακτηρίων στις διαδικασίες βιοεξυγίανσης. Τα βακτήρια αυτά εμφανίζουν μια υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά η χρήση τους εγείρει σοβαρά οικολογικά και περιβαλλοντικά προβλήματα και αυτός είναι από τους κύριους λόγους που εμποδίζεται η εφαρμογή τους σε συνθήκες πεδίου (Das *et al*, 2010).

1.8 Περιοχή Ασπροπύργου – Λίμνη Κουμουνδούρου

1.8.1 Μυθολογικά-Ιστορικά στοιχεία

Η λίμνη Κουμουνδούρου καθώς και η παλαιότερη λίμνη Κεφαλάρι που αποξηράνθηκε, στην αρχαιότητα ήταν γνωστές με την ονομασία Ρειτοί ή λίμνες των Καθαρμών και ήταν συνδεδεμένες με τα Ελευσίνια Μυστήρια, καθώς οι συμμετέχοντες εξαγνίζονταν σε αυτές. Ήταν αφιερωμένες στις θεές της Ελευσίνας, Περσεφόνη και Δήμητρα. Κατά τον Πausανία οι λίμνες αυτές δημιουργήθηκαν από ρέματα που πήγαζαν στις παρυφές του όρους Αιγάλεω και χύνονται στον κόλπο της Ελευσίνας.

Κατά τον 19^ο αιώνα έγιναν έργα επιχωμάτωσης και οδοποιίας μεταξύ της ακτής Σκαραμαγκά και της λίμνης, κατά την διάρκεια της πρωθυπουργίας του Αλέξανδρου Κουμουνδούρου στον οποίο αποδίδεται και η σύγχρονη ονομασία της λίμνης.

1.8.2 Τοπολογικά στοιχεία της λίμνης Κουμουνδούρου

Η λίμνη Κουμουνδούρου αποτελεί μια υφάλμυρη λίμνη, η οποία εντοπίζεται στο νοτιοανατολικό τμήμα του Θριάσιου πεδίου, στο βορειοανατολικό τμήμα του κόλπου της Ελευσίνας. Η λεκάνη απορροής της λίμνης έχει συνολική έκταση 39 km² και μέσο υψόμετρο 136 m. (Εικόνα 1.10). Η λίμνη Κουμουνδούρου είναι ρηχή με βάθος που φθάνει τα - 2,6 m και μέσο βάθος 1,0 m. Τα μεγαλύτερα βάθη εντοπίζονται βορειοανατολικά της λίμνης, όπου εντοπίζονται και οι κύριες πηγές τροφοδοσίας της.

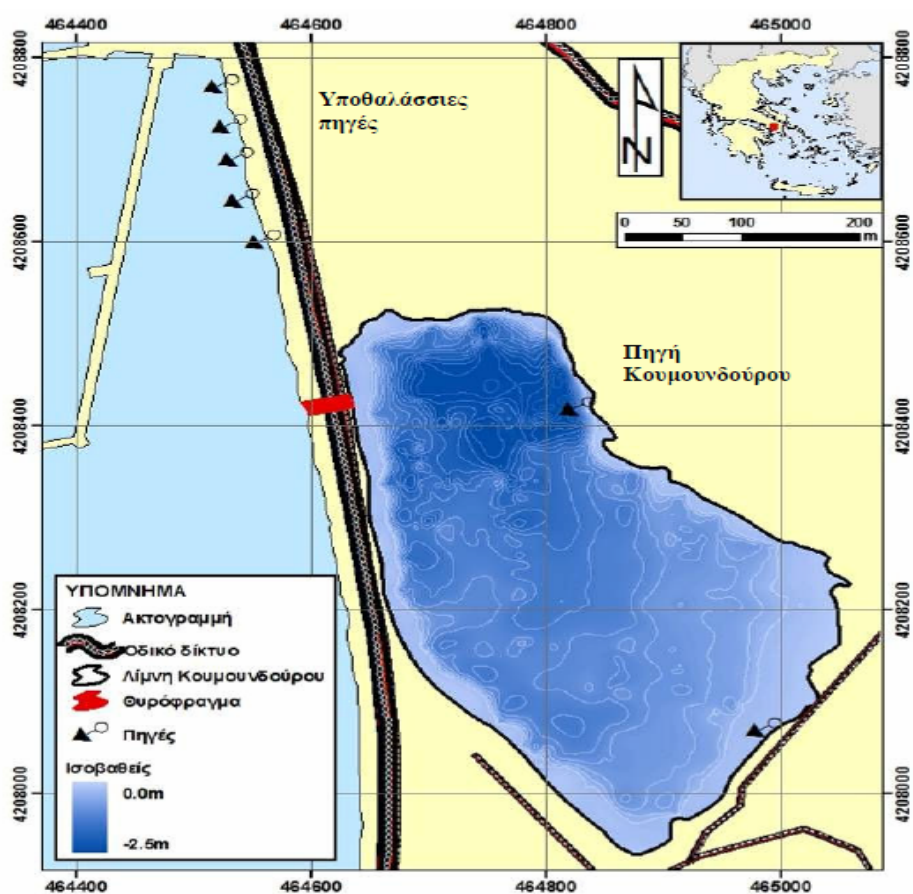
Η ευρύτερη περιοχή μελέτης χαρακτηρίζεται από ήπιους χειμώνες και ζεστά καλοκαίρια. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες σημειώνονται τον Ιούλιο - Αύγουστο και η χαμηλότερες τον Ιανουάριο - Φεβρουάριο.

Η υδρολογική λεκάνη της λίμνης Κουμουνδούρου εντοπίζεται σε μία από τις πιο έντονα βιομηχανοποιημένες και αστικοποιημένες περιοχές της Ελλάδας, το Θριάσιο πεδίο.

Πλήθος βιομηχανιών και βιοτεχνιών επιβαρύνουν την περιοχή. Στην Εικόνα 1.11 παρουσιάζονται διάφορες σημειακές και μη σημειακές πηγές ρύπανσης.

Σήμερα, στο Θριάσιο πεδίο αναπτύσσεται η βιομηχανική ζώνη του Ασπρόπυργου, με πλήθος βιομηχανιών και βιοτεχνιών, μεταξύ των οποίων διυλιστήρια (Ελληνικά Διυλιστήρια Ασπρόπυργου, ΠΕΤΡΟΛΑ, ΜΟΤΟΡΟΙΛ στους Αγίους Θεοδώρους), χαλυβουργία (Χαλυβουργία Ελλάδας, Χαλυβουργική ΑΕ), τσιμεντοβιομηχανίες (ΤΙΤΑΝ), λατομεία, βιομηχανίες πυρομαχικών, μονάδες επεξεργασίας χημικών ουσιών, μονάδες αναγέννησης ορυκτέλαιων κ.α. Παράλληλα, υπάρχουν τέσσερις προβλήτες διακίνησης υγρών και αερίων καυσίμων, ενώ ανατολικά της λίμνης Κουμουνδούρου, σε απόσταση μερικών μέτρων, εντοπίζεται το στρατόπεδο Ταγματάρχη Ξηρογιάννη.

Η λίμνη Κουμουνδούρου και τα περίχωρά της έχουν χαρακτηριστεί ως Τοπία Ιδιαίτερου Φυσικού Κάλλους του Υ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε. (1996-1999, ΑΤ2011014- Λίμνη Κουμουνδούρου και Λόφος Ηχούς), λόγω της ιστορικής και αρχαιολογικής αξίας της περιοχής, όσο και της μεγάλης οικολογικής της σημασίας. Από τη συνολική έκταση της περιοχής το 73% βρίσκεται εντός της υδρολογικής λεκάνης της Λίμνης Κουμουνδούρου (ΕΛΚΕΘΕ, 2012).



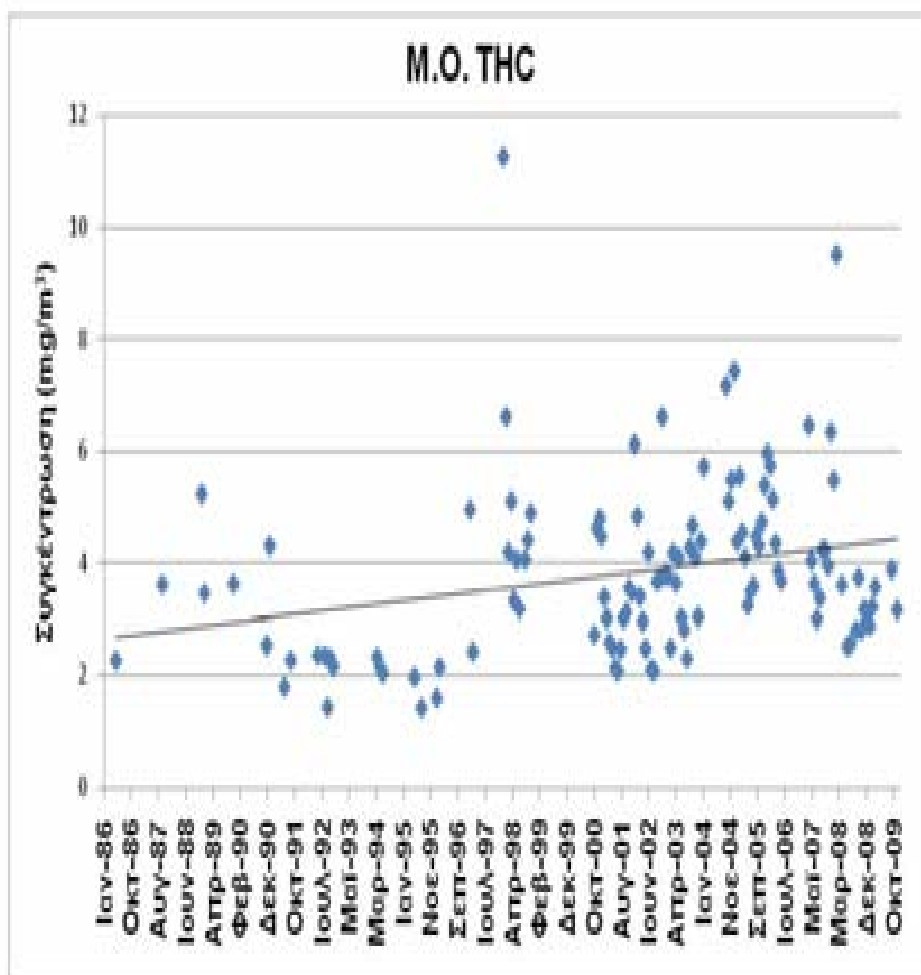
Εικόνα 1.10 Έκταση της λίμνης Κουμουνδούρου στην περιοχή του Ασπρόπυργου.



Εικόνα 1.11 Οι σημαντικότερες ρυπαντικές πιέσεις στην υδρολογική λεκάνη της λίμνης Κουμουνδούρου

Σε μια διαχρονική μελέτη της ποσότητας συσσώρευσης υδρογονανθράκων που πραγματοποιήθηκε από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών παρατηρήθηκε ότι χρόνο με το χρόνο η συγκέντρωση των υδρογονανθράκων σταδιακά αυξήθηκε και οι

υδρογονάνθρακες βρέθηκαν σε αρκετά υψηλά επίπεδα (Εικόνα 1.12). Για τον λόγο αυτό η λίμνη Κουμουνδούρου και γενικότερα η ευρύτερη περιοχή του Ασπροπύργου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανά σημεία συλλογής ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού ικανού να βιοαποικοδομεί και να συμμετέχει στη βιοεξυγίανση ρυπασμένων περιοχών (ΕΛΚΕΘΕ, 2012).



Εικόνα 1.12 Διαχρονική εξέλιξη των υδρογονανθρακών. Παρατηρείτε ότι την τελευταία δεκαετία η συγκέντρωση των υδρογονανθράκων έχει σχεδόν διπλασιαστεί σε σχέση με την δεκαετία 1990 έως 2000. Αυτό οφείλεται κυρίως στην εντατικότερη βιομηχανοποίηση της περιοχής την τελευταία δεκαετία

1.9 Σκοπός της εργασίας

Όπως έχει ειπωθεί υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι βιοεξυγίανσης ρυπασμένων με πετρέλαιο περιοχών. Ανάμεσά τους διακρίνονται οι φυσικές μέθοδοι βιοεξυγίανσης αλλά και διάφορες μηχανικές μέθοδοι. Το ενδιαφέρον όμως της επιστημονικής κοινότητας έχει

στραφεί τα τελευταία χρόνια στην διαδικασία της βιοαποικοδόμησης για την αντιμετώπιση της ρύπανσης από πετρέλαιο.

Η βιοεξυγίανση επιβαρυσμένων περιοχών στηρίζεται στη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα των ενδογενών μικροοργανισμών γιατί είναι πιο αποτελεσματική έναντι άλλων διαδικασιών και πιο φιλική στο περιβάλλον. Μια επιτυχής βιοαποικοδόμηση απαιτεί τη συνεργασία διαφορετικών μικροοργανισμών τα οποία συμμετέχουν σε διαφορετικές μεταβολικές πορείες και την εγκαθίδρυση των κατάλληλων συνθηκών στο συγκεκριμένο περιβάλλον. Συνεπώς για τη διαδικασία της βιοεξυγίανσης απαιτείται η συλλογή και απομόνωση μικροοργανισμών και η μελέτη τους ως προς τη βιοαποικοδομητική τους δραστηριότητα.

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία στοχεύει στην απομόνωση και μελέτη μικροοργανισμών από τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου και τη λίμνη Κουμουνδούρου και τη μελέτη της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών σε πετρελαϊκά απόβλητα και συγκεκριμένα σε αλκάνια.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η ποικιλότητα του βακτηριακού πληθυσμού με εφαρμογή μοριακών και κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών. Επίσης στους απομονωθέντες μικροοργανισμούς εκτιμήθηκε η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα έναντι αλειφατικών υδρογοναθράκων σε υγρές κλειστές καλλιέργειες. Επίσης προσδιορίστηκε η συχνότητα γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοαποικοδόμηση πετρελαϊκών αλειφατικών υδρογονανθράκων καθώς και ο μέσος χρόνος της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας κάποιων επιλεγμένων βακτηρίων σε πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες. Τέλος προσδιορίστηκε η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα σε μικτές υγρές κλειστές καλλιέργειες βακτηρίων.



Υλικά & Μέθοδοι

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχές δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία στην παρούσα Διπλωματική Εργασία έγινε από δύο διαφορετικές οικοθέσεις, τη λίμνη Κουμουνδούρου και την παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου.

Η λίμνη Κουμουνδούρου αντιστοιχεί σε μία περιοχή όπου παρατηρείται διαρροή πετρελαϊκών αποβλήτων. Η λίμνη βρίσκεται δίπλα στην βιομηχανική μονάδα των Ελληνικών Πετρελαίων και έχει υποστεί ρύπανση από α) τα στραγγίσματα των χωματερών των Άνω Λιοσίων και της Φυλής, β) τις διαρροές πετρελαιοειδών των ΕΛΠΕ Ασπροπύργου, τις δεξαμενές ΕΛΙΝΟΙΛ και τις αποθήκες καυσίμων του παρακείμενου στρατοπέδου (Ξηρογιάννη).

Η θαλάσσια παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου βρίσκεται σε απόσταση μισό χιλιομέτρου από την λίμνη Κουμουνδούρου και από το εργοστάσιο των Ελληνικών Πετρελαίων και είναι ακατάλληλη για κολύμπι ή άλλες δραστηριότητες.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από τρεις διαφορετικές περιοχές:

- Παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου
- Λίμνη Κουμουνδούρου
- Περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων μέσα στην Λίμνη Κουμουνδούρου

2.1.1 Τρόπος δειγματοληψίας

Για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας αλλά και την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχθηκαν δείγματα από τις τρεις διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας που αναφέρονται στην παράγραφο 2.1 απόστασης περίπου 1m μεταξύ τους και βάθους μισό μέτρο από την επιφάνεια της θάλασσας σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκάλια των 500 ml τον μήνα Σεπτέμβριο.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εντός μίας εβδομάδας από την στιγμή δειγματοληψίας με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών ενώ η υπόλοιπη ποσότητα συντηρήθηκε στους -4 °C.



Εικόνα 2.1 Α: Οι περιοχές δειγματοληψίας από τη θάλασσα του Ασπροπύργου και τη λίμνη Κουμουνδούρου εμφανίζονται με κόκκινους κύκλους. **Β:** Δειγματοληψία από τη περιοχή εναπόθεσης πετρελαϊκών αποβλήτων στη Λίμνη Κουμουνδούρου

2.1.2 Ανάλυση δειγμάτων

Στα δείγματα του θαλασσινού νερού από την παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά σε βαρέα μέταλλα. Στα δείγματα από την περιοχή της λίμνης Κουμουνδούρου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σε αλλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες με χρήση αέριου χρωματογράφου - φασματογράφου μάζας (GS-MS- Hr6890). Τέλος προσδιορίστηκαν η θερμοκρασία, το pH, και η αλατότητα στα αντίστοιχα σημεία.

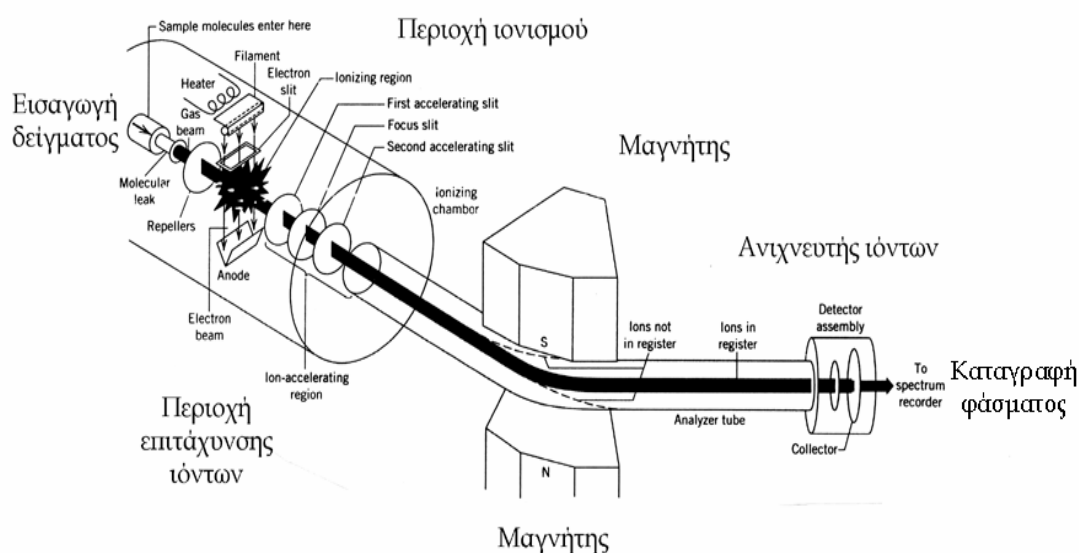
2.1.2.1 Ανάλυση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων έγινε μέτρηση στο πεδίο με φορητό όργανο (Aquameter της εταιρείας Aquaread), στις φυσικοχημικές παράμετροι του νερού. Πριν από κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του οργάνου, όπως απαιτείται από τη διεθνή επιστημονική πρακτική.

Τα δείγματα νερού μεταφέρθηκαν στα εργαστήρια του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών, έγινε διήθηση και στο διαλυτό κλάσμα έγινε προσδιορισμός των θρεπτικών ιόντων με ιοντικό αναλυτή Metrohm, αυτόματο αναλυτή Radiometer και φωτόμετρο Merck Nova 400.

2.2 Προσδιορισμός υδρογονανθράκων από τις περιοχές δειγματοληψίας με χρήση αέριου χρωματογράφου – φασματογράφου μάζας (GC-MS)

Ο Φασματογράφος Μάζων (ΦΜ) είναι ένα όργανο που με τη βοήθεια ηλεκτρονικού βομβαρδισμού τεμαχίζει την ουσία που μελετάται παράγοντας ιόντα. Τα ιόντα αυτά επιταχύνονται με τη βοήθεια ισχυρού μαγνητικού πεδίου και συλλέγονται από τον ανιχνευτή σε διαστήματα ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Εικόνα 2.2)



Εικόνα 2.2 Φασματογράφος μάζων. Σχηματική αναπαράσταση της εισαγωγής του δείγματος, της περιοχής ιονισμού, επιτάχυνση και διαχωρισμό των θραυσμάτων - ιόντων με την επίδραση μαγνητικού πεδίου

Ο φασματογράφος μάζων που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στην Εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3 Φασματοσκοπία μαζών με αέριο χρωματογράφο (GC - MS) και αυτόματη δειγματοληψία πολλών δειγμάτων.

Σε μελέτες βιοαποικοδόμησης και βιοεξυγίανσης τόσο *in situ*, όσο και στο εργαστήριο ο αέριος χρωματογράφος – φασματογράφος μάζας έχει πλεονέκτημα όσον αφορά την εφαρμογή στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό υδρογονανθρακών. Η φασματοσκοπία μαζών με αέριο χρωματογράφο (GC - MS) παρουσιάζει υψηλή διακριτική ικανότητα και ακρίβεια μετρήσεων σε σχέση με το HPLC σε δείγματα αρωματικών και ετεροκυκλικών υδρογονανθρακών, ενώ η επαναληψιμότητα των μετρήσεων παρέχει τη δυνατότητα διακρίβωσης μεθόδων και πρακτικών. Συγκρινόμενος με ανοσοχημικές μεθόδους (ELISA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολυκυκλικών υδρογονανθράκων σε δείγματα επιβαρυμένων εδαφών, ο αέριος χρωματογράφος – φασματογράφος μάζας, παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά σφάλματος και μεγαλύτερη ευαισθησία.

2.2.2 Εκχύλιση πετρελαϊκών υδρογονανθράκων από υδάτινα δείγματα

Δείγματα καλλιέργειας (θαλασσινού νερού με προσθήκη αργού πετρελαίου) όγκου 50 ml εκχυλίστηκαν με 50 ml εξανίου. Τα εκχυλίσματα υπέστησαν ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση σε τελικό όγκο 100 μl. Έγινε ανίχνευση και προσδιορισμός μεμονωμένων

υδρογονανθράκων με χρήση αέριας χρωματογραφίας -φασματομετρίας μαζών (Agilent GC-MSD, 7890A-5975C). Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώθηκαν σε όγκο 5 ml και έγινε προσδιορισμός των ολικών διαλυμένων πετρελαϊκών υδρογονανθράκων σύμφωνα με τη φθορισμομετρική μέθοδο που προτείνεται από τον IOC (IOC, 1986).

Χρησιμοποιήθηκε μήκος κύματος διέγερσης 310 nm και εκπομπής 360 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα χρυσενίου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων έγινε με αέρια χρωματογραφία - φασματοσκοπία μάζας (Hewlett-Packard GC/MS 6890) χρησιμοποιώντας την τεχνική της πλήρους σάρωσης των ιόντων.

2.2.3 Ανάλυση με αέριο χρωματογράφο

Τα κλάσματα των υδρογονανθρακών που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (Hewlett-Packard GC/MS 6890), με φέρον αέριο He, σε στήλη DB5 διαστάσεων 30 m x 0,25 mm i.d και πάχος φιλμ 0,25 μm, ενώ ο βαθμός αυτόματης συμπύκνωσης του δείγματος (split) ήταν 1:10. Η ενέργεια ιονισμού 70 eV και ο ανιχνευτής μάζας ρυθμίστηκε σε αποδοχή σήματος μοναδικού ιόντος. Για το κλάσμα των αλειφατικών υδρογονανθράκων χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα με αρχική θερμοκρασία στήλης 60 °C και σταδιακή αύξηση 15 °C ανά λεπτό μέχρι τους 290 °C βαθμούς. Για το κλάσμα των αρωματικών υδρογονανθράκων ακολούθησε πρόγραμμα με αρχική θερμοκρασία στήλης 80 °C, σταδιακή αύξηση 5 °C ανά λεπτό μέχρι τους 170 °C και αύξηση 6,5 °C ανά λεπτό μέχρι τελική θερμοκρασία 30 °C.

2.3 Ποιοτική ανάλυση ολικού βακτηριακού πληθυσμού με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)

Η μέθοδος DGGE χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό δύο μορίων DNA που διαφοροποιούνται ακόμη και στο επίπεδο μιας μόνο βάσης και στηρίζεται στο γεγονός ότι δύο τμήματα DNA με μεγάλη ομολογία, έχουν συχνά διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης. Μόρια με διαφορετική σύσταση σε βάσεις θα αποδιαταχτούν σε διαφορετικό σημείο του πηκτώματος ακρυλαμίδης με αποτέλεσμα να σταματήσει η κίνηση του μορίου και να σχηματισθεί μια διακριτή ζώνη στο πήκτωμα, η οποία καλείται ριβότυπος.

2.3.1 Απομόνωση ολικού βακτηριακού DNA από υδάτινα δείγματα

Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 °C. Η κατεργασία περιλάμβανε διήθηση υπό κενό από ηθμούς μεγέθους πόρων 0,22 μm (GV, DURAPORE, Millipore-Γαλλία) ώστε να κατακρατηθούν όλα τα βακτηριακά κύτταρα. Στην συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar και επώστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Για την απομόνωση DNA δοκιμάστηκε ένα πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η λυσοζύμη κατά το στάδιο λύσης των κυττάρων με στόχο την απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας και σε περισσότερη ποσότητα. Το πρωτόκολλο περιελάμβανε τα εξής στάδια:

- Μεταφορά με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500 μl διάλυμα Ringer

- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά
- Προσθήκη 500 μl διαλύματος λύσης (βλέπε παράγραφο 2.4)
- Επώαση για 2 ώρες στους 37 °C
- Προσθήκη διαλύματος 125 μl SDS 10%
- Επώαση στους 65 °C για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες
- Προσθήκη 216 μl διαλύματος οξικού καλίου 5 M και άμεση μεταφορά σωλήνων σε πάγο για 45 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες
- Καταβύθιση με προσθήκη 80% ισοπροπανόλης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 13.000 στροφές
- Προσθήκη 500 μl αιθανόλη 70%
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό
- Ξήρανση ιζήματος στους 65 °C για 20 λεπτά και αναδιαλυτοποίηση σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

2.3.2 Ανάλυση ολικού βακτηριακού DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση

Προκειμένου να ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου για το 16S rDNA χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών μορίων με κωδικές ονομασίες F984GC και R1378 το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία από τους Heuer et al (1997). Τα δύο εκκινητικά μόρια ενισχύουν την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 984 και 1378 του γονιδίου για το 16S rDNA. Μια GC ουρά προστέθηκε στο 5' άκρο του εκκινητικού μορίου F984, ώστε να

αποφευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα.

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων του γονιδίου για το 16S rDNA, ήταν η ακόλουθη: 2 μl γενωμικού DNA (περίπου 40 ng), 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 20 nM από κάθε εκκινητή και 5% (w/v) ακεταμίδιο. Ένα αρχικό στάδιο δέκα λεπτών στους 94 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιελάμβαναν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, ένα λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C, όπου οι εκκινητές σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ανάλυση DGGE πραγματοποιήθηκε σε συσκευή BioRad DCODE. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% (w/v). Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης περιείχε συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα (φορμαμίδιο και ουρία) υπό κλίση καλύπτοντας ένα εύρος 40 - 60 % (όπου το 100% του αποδιατακτικού παράγοντα αντιστοιχεί σε 7M ουρία και 40% φορμαμίδιο). Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 60 °C για 4 ώρες υπό τάση 180 V σε διάλυμα 1x TBE. Στα πηκτώματα DGGE για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο χρώσης αργύρου όπως περιγράφεται από τους Riesner και συνεργάτες (1989).

2.3.3 Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου

Μετά την ανάλυση DGGE έγινε απομόνωση των διαφορετικών ριβότυπων με αποστειρωμένο νυστέρι. Οι διαφορετικοί ριβότυποι τοποθετήθηκαν σε σωλήνες όγκου 1,5 ml (ependorfs) και αφού προστέθηκαν 100 μl dd H₂O επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 μέρα στις 250 rpm. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας η οποία περιείχε το DNA των ριβοτύπων.

Κάθε ριβότυπος από το πήκτωμα ακρυλαμίδης ενισχύθηκε με τους αντίστοιχους εκκινητές F984 και R1378. Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων του γονιδίου για το 16S rDNA, ήταν η ακόλουθη: 2 μl γενωμικού DNA (περίπου 40 ng), 10 mM KCl, 10 mM Tris- HCl (pH 9), 0,1% Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 20 nM από κάθε εκκινητή και 5% (w/v) ακεταμίδιο. Ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιελάμβαναν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, ένα λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C, όπου οι εκκινητές σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος έγινε απομόνωση των προϊόντων της

αντίδρασης από το πήκτωμα της αγαρόζης όπως και αλληλούχηση των δειγμάτων αυτών όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.3.2.

2.4 Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα

Διάλυμα λύσης κυττάρων με λυσοζύμη (Rademaker L. W. Jan και συνεργάτες,1997):

Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε: 25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3% sucrose και 10 mg/1ml lysozyme

Διάλυμα Tris-Borate EDTA Buffer (TBE): περιέχει Tris-HCl 1 M 108,0 g, βορικό οξύ 55,0 g και 40 ml EDTA 0,5 M. Για την παρασκευή TBE 0,5x έγινε αραίωση ποσότητας του TBE 50x.

Διάλυμα Ringer (1/4): Περιέχει (g/l): NaCl 2,15 g, KCl 0,15 g, CaCl₂ 0,075 g, K₂HPO₄ 0,5 g.

Διάλυμα γλυκερόλης 20% (w/v): Περιέχει 20,0 g γλυκερόλη σε 100 ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο H₂O.

Θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (g/l)(Metrolab): περιέχει πεπτόνη 5,0, εκχύλιση κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, χλωριούχο νάτριο 5,0, άγαρ 15,0. Διάλυση 13,0 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Broth (g/l)(Metrolab): περιέχει πεπτόνη 5,0, εκχύλιση κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, χλωριούχο νάτριο 5,0. Διάλυση 13,0 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Θρεπτικό υπόστρωμα Walne Medium: (για 1l) 1l θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με 1,3 g FeCl₃ * 6H₂O, 0,36 g MnCl₂ * 4H₂O , 33,6 g H₃BO₃ , 45,0 g EDTA (disodium salt), 20,0 g NaH₂PO₄ * 2H₂O, 100,0 g NaNO₃, 1,0 ml διάλυμα αλάτων A5 (Trace Metal mix)

Διάλυμα αλάτων A5 (για 1l): 2,86 g H₃BO₃, 1,81 g MnCl₂ * 4H₂O, 0,39 g Na₂MoO₄*2H₂O, 0,222 g ZnSO₄*7H₂O, 0,079 g CuSO₄*5H₂O, 0,049 g Co(NO₃)₂*6H₂O

Αργό πετρέλαιο (crude oil): Ο τύπος αργού πετρελαίου που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα στα θρεπτικά υποστρώματα ήταν Iranian heavy. Το αργό πετρέλαιο παραχωρήθηκε από το τμήμα υγιεινής και Περιβάλλοντος των ΕΛΠΕ και οι βασικές φυσικοχημικές του ιδιότητες περιγράφονται στον Πίνακα 2.1. Το πετρέλαιο προστέθηκε απευθείας στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωση και ενώ η θερμοκρασία του ήταν χαμηλότερη των 45 °C.

Πίνακας 2.1 Βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες του αργού πετρελαίου που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα.

| Μετρούμενη ιδιότητα | Μέγεθος |
|-----------------------------|---------|
| Πυκνότητα σε 15 °C (kg/l) | 0,8891 |
| Πυκνότητα σε μονάδες API | 30 |
| Τάση ατμών σε 37,8 °C (psi) | 5,4 |
| Θείο (% w/v) | 1,59 |

| | |
|------------------------|------|
| Σημείο ροής (°C) | -25 |
| Βανάδιο (ppm) | 36 |
| Νικέλιο (ppm) | 14 |
| Νερό και ίζημα (% v/v) | 0,06 |
| Ασφαλτένια (% w/v) | 7 |

2.5 Απομόνωση μικροοργανισμών

Στα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη από τα δείγματα εδάφους αποδόθηκε η ονομασία ΑΣΘ (Ασπρόπυργος – Θάλασσα) για τα στελέχη που απομονώθηκαν από την παράκτια περιοχή του Ασπρόπυργου, ΑΣΚ (Ασπρόπυργος – Κουμουνδούρου) για τα στελέχη που απομονώθηκαν από την λίμνη Κουμουνδούρου και ΚΠ (Κουμουνδούρου-πετρέλαιο) για τα στελέχη που απομονώθηκαν από την λίμνη Κουμουνδούρου στην περιοχή που περιείχε πετρέλαιο.

Ποσότητα 1l από κάθε τοποθεσία δειγματοληψίας διηθήθηκε υπό κενό από ηθμούς μεγέθους πόρων 0,22 μm (GV, DURAPORE, Millipore-Γαλλία) ώστε να κατακρατηθούν όλα τα βακτηριακά κύτταρα. Στην συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar με προσθήκη 5% αργό πετρέλαιο και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Στην συνέχεια ακολούθησε απομόνωση αποικιών με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών και συνεχών ανακαλλιεργειών στο αρχικό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης. Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν στους -20 °C υπό μορφή εναιωρήματος κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης 20% (v/v).

2.6 Ομαδοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο στελεχών

2.6.1 Η μέθοδος BOX-PCR για την ταξινόμηση και διάκριση βακτηριακών στελεχών

2.6.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η διάκριση των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν έγινε με τη μέθοδο της BOX-PCR. Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που έχουν περιγραφεί στο πρακαρυωτικό γονιδίωμα (οι REP, ERIC και BOX αλληλουχίες), οι οποίες περιλαμβάνουν παλίνδρομα τμήματα μεγέθους 35-40 bp. Μόρια εκκινητές συμπληρωματικά με εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες της boxA υπομονάδας του στοιχείου BOX, έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX στοιχείων. Τα ενισχυμένα κομμάτια μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα, μοναδικού για κάθε στέλεχος.

Παρόλα αυτά η φυλογενετική ομοιότητα δυο ή περισσότερων βακτηριακών στελεχών δε σημαίνει απαραίτητα και ταύτιση των βιοτεχνολογικών ιδιοτήτων τους: σε μεταβολικές ικανότητες και δυνατότητες. Ειδικότερα, κατά τη μελέτη του ρόλου των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών στη βιοεξυγίανση επιβαρυσμένων περιοχών, η μέθοδος του BOX-PCR παρέχει σημαντικές πληροφορίες που συμβάλλουν στην εκτίμηση της βιοποικιλότητας. Η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα όμως χρειάζεται να εξετάζεται

χωριστά ακόμα και για φυλογενετικά όμοια στελέχη, αφού συχνά οφείλεται σε μεταλλαγές λόγω προσαρμογής, ή σε μεταβολικές οδούς των οποίων τα γονίδια βρίσκονται σε πλασμίδια.

2.6.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου BOX-PCR στα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη

Ο σχεδιασμός του εκκινητικού μορίου BOXA1R, έγινε με βάση γνωστές αλληλουχίες BOX του προκαρυωτικού γονιδιώματος. Προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο, διότι οι BOX αλληλουχίες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα απαντώνται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Η αλληλουχία του εκκινητικού μορίου είναι η εξής: 5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACC- 3'.

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των BOX αλληλουχιών του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής: 2 μl γενωμικού DNA (περίπου 40ng), 10 mM KCl, 10 mM Tris - HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 20 nM από κάθε εκκινητή και 4% DMSO. Ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C, ακολουθείται από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C, όπου το εκκινητικό μόριο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 8 λεπτά στους 65 °C, όπου σχηματίζονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 65 °C για 16 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % (w/v) στα 50 mA για 5 ώρες και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.7 Ανίχνευση γονιδίου καταβολισμού πετρελαϊκών υδρογονανθράκων

Στα βακτηριακά στελέχη που παρουσίασαν το καλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης ανιχνεύτηκε η παρουσία του γονιδίου alkB. Για την ανίχνευση του γονιδίου της μεταβολικής οδού alk που σχετίζεται με την αποικοδόμηση αλειφατικών υδρογονανθράκων επιλέχθηκε το γονίδιο της ισομεράσης της αλκαλικής μονοξυγενάσης (alkB). Στη συνέχεια, ενισχύθηκε μέρος της αλληλουχίας του alkB γονιδίου με PCR και τη χρήση του ζεύγους εκκινητικών μορίων alkBF (5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA-3') και alkBR (5'-GCRTGRTGRTGARTGNGCGYTG-3') (Tourona *et al*, 2008). Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του τμήματος alkB γονιδίου ήταν η εξής: 2 μl γενωμικό DNA (περίπου 40 ng), 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 20 nM από κάθε εκκινητή και 4 % DMSO.

Ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιελάμβαναν 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 55 °C, όπου το εκκινητικό μόριο σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις μορίων DNA και 1 λεπτό στους 72 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.7.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από καθαρές καλλιέργειες

Το κάθε στέλεχος καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Broth με προσθήκη αργού πετρελαίου 5%(w/v) για 48 ώρες στους 25 °C και 1ml από την καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε σωλήνες τύπου errendorf για 10 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό. Στο ίζημα έγινε προσθήκη διαλύματος λύσης (25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3% (w/v) σακχαρόζη, 10 mg/ml λυσοζύμη) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα SDS 10% (w/v) και το μίγμα επώαστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες errendorfs και έγινε προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου 5M και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο. Μετά από παραμονή 45 λεπτών οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούριους αποστειρωμένους σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση με ισοπροπανόλη για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό. Στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης 70% και μετά από φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, το ίζημα ξηράθηκε και αναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.7.2 Ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA γονιδίου

Γενωμικό DNA (40 ng), από τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rDNA. Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών pA / R1492. Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων 8 έως 1510 του 16S rDNA ήταν η εξής: 2 μl γενωμικού DNA, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% (w/v) Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση, 0.2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, και 20 nM από κάθε εκκινητή.

Ένα αρχικό στάδιο 1 λεπτού στους 94 °C, ακολούθηθηκε από 30 κύκλους που περιλαμβάνουν 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 53 °C όπου το εκκινητικό μόριο σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 7 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nucleosprin Extract kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας (VBC – Αυστρία).

Οι αλληλουχίες στη συνέχεια συγκρίθηκαν με όλες τις βακτηριακές αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στις τράπεζες δεδομένων, με τη χρήση του προγράμματος BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.8 Καλλιέργειες βακτηρίων

2.8.1 Συνθήκες ανάπτυξης των απομονωθέντων βακτηρίων σε υγρές κλειστές καλλιέργειες

Όλα τα απομονωθέντα στελέχη αυξήθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες όγκου 50 ml σε φιάλες Erlenmeyer όγκου 100ml με θρεπτικό υπόστρωμα Walne Medium (2.4) και αποκλειστική πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 5% (w/v). Η ποσότητα του εμβολίου ήταν 10^9 κύτταρα. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση 250 στροφές ανά λεπτό σε μηχανικό αναδευτήρα Flask Shaker SF-1 (Stuart Scientific), στους 25 °C για 14 ημέρες. Στις ίδιες συνθήκες επώαστηκε και φιάλη με θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς προσθήκη μικροοργανισμών η οποία είχε ρόλο αρνητικού μάρτυρα.

2.8.1.1 Προσδιορισμός της βιομάζας σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο

Η εκτίμηση της αύξησης σε καλλιέργειες αργού πετρελαίου έγινε με προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας και του ποσοστού αποικοδόμησης του στερεού υπολείμματος.

Μετά από 14 ημέρες οι καλλιέργειες αναμίχθηκαν με ίσο όγκο n-εξάνιο και μετά από έντονη ανάδευση, φυγοκεντρήθηκαν σε προζυγισμένους σωλήνες για 10 λεπτά σε 12.000 στροφές ανά λεπτό στους 10 °C. Οι σωλήνες με το ίζημα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο 65 °C για 48 ώρες προκειμένου να ξηρανθούν.

Για τον προσδιορισμό της ξηρής μάζας το ξηρό ίζημα από κάθε καλλιέργεια ζυγίστηκε και αφαιρέθηκε από αυτό το βάρος του ιζήματος του αρνητικού μάρτυρα.

2.8.1.2 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος υδρογονανθράκων σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο

Μετά από 14 ημέρες οι καλλιέργειες αναμίχθηκαν με ίσο όγκο n-εξάνιο και μετά από έντονη ανάδευση, φυγοκεντρήθηκαν σε προζυγισμένους σωλήνες για 10 λεπτά σε 12.000 στροφές ανά λεπτό στους 10 °C. Η υπερκείμενη οργανική φάση μεταφέρθηκε σε προζυγισμένους σωλήνες. Οι σωλήνες με το υπερκείμενο τοποθετήθηκαν σε κλίβανο 65 °C για 48 ώρες προκειμένου να ξηρανθούν.

Οι σωλήνες που περιείχαν την ξηρή οργανική φάση της καλλιέργειας ζυγίστηκαν και η αποικοδόμηση εκτιμήθηκε ως επί τοις εκατό διαφορά του βάρους του υπολείμματος στο σωλήνα καλλιέργειας, από το βάρος του υπολείμματος στο σωλήνα του αρνητικού μάρτυρα, προς το βάρος του υπολείμματος στο σωλήνα του αρνητικού μάρτυρα (Jirasripongrun, 2002)

2.8.2 Προσδιορισμός του χρόνου υποδιπλασιασμού με ανάλυση GC-MS σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με μεγάλη βιοαποικοδόμηση

Ο προσδιορισμός της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας στις καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό του χρόνου υποδιπλασιασμού βάσει των συγκεντρώσεων των εναπομεινάντων υδρογονανθράκων που έγινε σε αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας μετά από 6, 8, 10 και 14 ημέρες. Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης υπολογίστηκε βάσει των τύπων:

$$C = C_0 \exp(-kt)$$

$t_{1/2} = 0,693/k$ (Arnot et al, 2005)

Η μέθοδος ανάλυσης, καθώς και τα στοιχεία του χρωματογράφου περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.

2.8.3 Συνθήκες ανάπτυξης των απομονωθέντων βακτηρίων σε μικτές καλλιέργειες (consortia)

Κάθε ομάδα περιελάμβανε 3 βακτηριακά στελέχη. Ίσες ποσότητες εμβολίου από κάθε στέλεχος μεταφέρθηκαν σε φιάλη Erlenmeyer όγκου 100 ml που περιείχε 50 ml διαλύματος Walne Medium και αποκλειστική πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 5% (w/v). Ο τελικός αριθμός κυττάρων στη μικτή καλλιέργεια μετά από εμβολιασμό ήταν 10^9 κύτταρα ανά ml. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση 200 στροφών για 14 ημέρες. Στις ίδιες συνθήκες επώαστηκε και φιάλη με θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς προσθήκη μικροοργανισμών η οποία είχε ρόλο αρνητικού μάρτυρα.

2.8.3.1 Προσδιορισμός των εναπομείναντων υδρογονανθρακών στις μικτές καλλιέργειες

Ο προσδιορισμός της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας στις μικτές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό της συγκέντρωσης των εναπομείναντων υδρογονανθρακών σε αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας μετά το τέλος της καλλιέργειας. Το ποσοστό αποικοδόμησης εκφράστηκε ως το επί τοις εκατό ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης υδρογονανθρακών στην καλλιέργεια σε σχέση με τη συγκέντρωση υδρογονανθρακών στον αρνητικό μάρτυρα.

Η μέθοδος ανάλυσης, καθώς και τα στοιχεία του χρωματογράφου περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3 Αποτελέσματα

3.1. Φυσικοχημικοί παράμετροι της λίμνης Κουμουνδούρου

Στη λίμνη Κουμουνδούρου προσδιορίστηκαν όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.1 διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι. Τα βασικά στατιστικά στοιχεία του συνόλου των φυσικοχημικών και χημικών μετρήσεων που διεξήχθησαν κατά τη δειγματοληψία στη λίμνη Κουμουνδούρου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1

Πίνακας 3.1 Τιμές φυσικοχημικών μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στην λίμνη Κουμουνδούρου

| Παράμετρος | Μονάδες | Μέσος όρος |
|------------|---------|------------|
| pH | - | 8,5 |
| T | °C | 18 |
| Αλατότητα | ppt | 7,2 |
| D.O. | mg/l | 11,1 |

Σε ολόκληρη την περίοδο των μετρήσεων, το pH στην λίμνη Κουμουνδούρου, ήταν ελαφρά όξινο έως βασικό και κυμάνθηκε από 6,7 έως 8,9 με μέση τιμή το 8,5. Με βάση τις μετρήσεις της παρούσας μελέτης το pH ήταν βασικό.

Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου στη λίμνη κυμάνθηκαν από 2,0 έως 24,3 mg / l, με μέση τιμή 11,1 mg / l, η οποία θεωρείται ικανοποιητική δεδομένου του υφάλμυρου χαρακτήρα της λίμνης.

Από τις μετρήσεις του pH κατά τη διάρκεια του έτους (τα αποτελέσματα δεν αναφέρονται) προέκυψε ότι το νερό της λίμνης κατά τους χειμερινούς μήνες είχε χαρακτηριστικά αναερόβιων συνθηκών, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Απρίλιος-Σεπτέμβριος) τα δείγματα είχαν χαρακτηριστικά μεταβατικών συστημάτων από υπόγεια νερά σε θαλασσινό νερό.

Πινάκας 3.2 Τιμές των χημικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στη λίμνη Κουμουνδούρου

| Παράμετρος | Μονάδες | Μέσος όρος |
|-----------------|---------|------------|
| NO ₃ | mg/l | 2,002 |

| | | |
|-------------------------------|------|-------|
| NO ₂ ⁻ | mg/l | 0,081 |
| NH ₄ ⁺ | mg/l | 1,235 |
| PO ₄ ³⁻ | mg/l | 0,006 |

Τα νιτρικά ιόντα είχαν μια μέση τιμή 2,002 mg/l και 0,081 mg/l (Πίνακας 3.2). Οι τιμές αυτές ήταν ικανοποιητικές δεδομένου του έντονου ρυπασμένου χαρακτήρα της λίμνης.

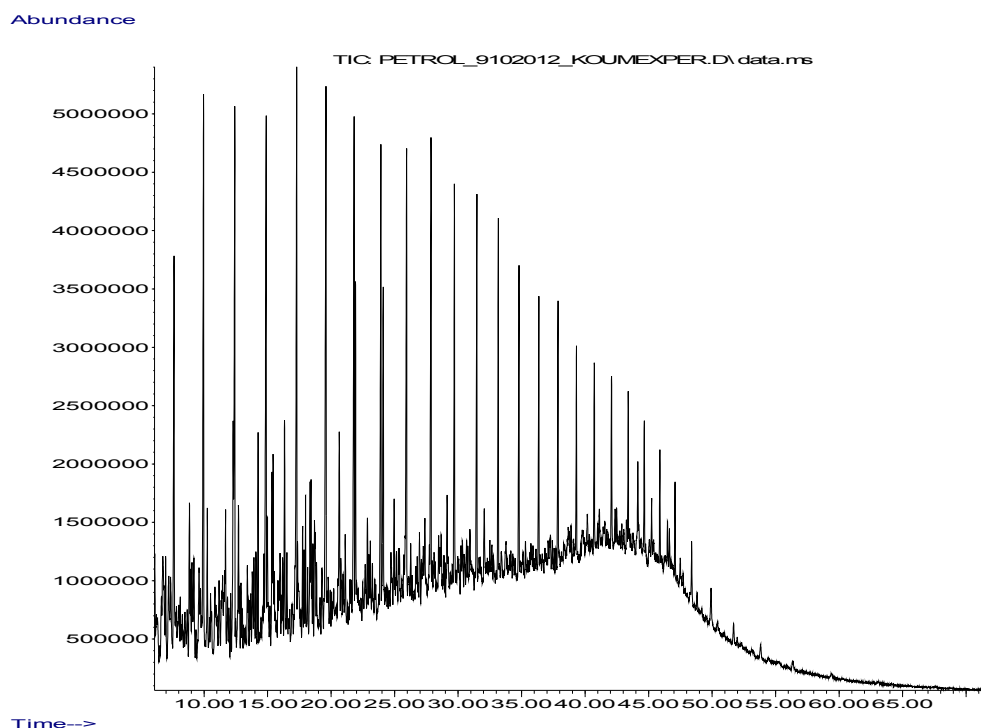
Από τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων (Πίνακας 3.3) προέκυψε ότι εκτός κάποιων εξαιρέσεων οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ήταν σχετικά μικρές. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της διαλυτής και σωματιδιακής φάσης των Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Fe και Hg ήταν μικρότερες από τις ανώτατες επιτρεπτές τιμές πόσιμου νερού που έχουν θεμοθετηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Οδηγία 98/83/ΕΚ) σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας. Υψηλότερες τιμές από τα ανωτέρω όρια συναντήθηκαν στις συγκεντρώσεις Mn, για το οποίο το προτεινόμενο όριο είναι 50 µg/l.

Στα δείγματα της λίμνης Κουμουνδούρου και της θαλάσσιας περιοχής του Ασπροπύργου δεν παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση υδρογονανθράκων. Στη δειγματοληψία από την περιοχή εναπόθεσης πετρελαϊκών αποβλήτων έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών υδρογονανθράκων

Πίνακας 3.3 Συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στο νερό της λίμνης Κουμουνδούρου

| Ημερομηνία | Δείγμα | Cd (μg/l) | Pb (μg/l) | Ni (μg/l) | Cu (μg/l) | Al (μg/l) | Fe (μg/l) | Mn (μg/l) | Hg (μg/l) |
|------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 30/3/2011 | ΑΣΚ1 | 0,027 | 0,435 | 0,774 | 0,182 | 30,29 | 148,89 | 61,5 | 0,169 |
| | ΑΣΚ2 | 0,0091 | 0,384 | 0,821 | 0,144 | 40,8 | 159,9 | 64,5 | 0,17 |
| | ΑΣΚ3 | 0,0091 | 0,359 | 0,829 | 0,175 | 30,59 | 147,06 | 68,18 | 0,216 |
| | ΑΣΚ4 | 0,028 | 0,359 | 0,516 | 0,158 | 36,97 | 113,58 | 40,67 | 0,204 |
| | ΑΣΚ5 | 0,027 | 0,406 | 0,836 | 0,206 | 46,93 | 134,14 | 67,78 | 0,214 |
| 25/7/2011 | ΑΣΚ1 | 0,013 | 2,739 | 0,216 | 0,128 | 11,25 | 0,002 | 18,63 | 0,003 |
| | ΑΣΚ2 | 0,038 | 0,293 | 0,109 | 0,106 | 14,58 | 0,002 | 9,25 | 0,008 |
| | ΑΣΚ3 | 0,017 | 0,234 | 0,136 | 0,106 | 24,11 | 0,5 | 4,26 | 0,032 |
| | ΑΣΚ4 | 0,0091 | 3,495 | 0,149 | 0,106 | 27,74 | 3,06 | 2,55 | 0,292 |
| | ΑΣΚ5 | 0,113 | 0,248 | 0,143 | 0,106 | 37,5 | 1,5 | 3,06 | 0,408 |
| 28/9/2011 | ΑΣΚ1 | 0,014 | 0,094 | 0,078 | 0,106 | 67,78 | 0,002 | 1,33 | 0,016 |
| | ΑΣΚ2 | 0,0091 | 0,094 | 0,119 | 0,106 | 60,75 | 1,88 | 1,8 | 0,093 |
| | ΑΣΚ3 | 0,0091 | 0,094 | 0,172 | 0,106 | 62,02 | 4,18 | 1,69 | 0,1 |
| | ΑΣΚ4 | 0,0091 | 0,118 | 0,086 | 0,106 | 79,26 | 11,56 | 2,22 | 0,596 |
| | ΑΣΚ5 | 0,0091 | 0,141 | 0,181 | 0,106 | 167,41 | 78,89 | 3,11 | 0,283 |
| 18/1/2012 | ΑΣΚ1 | 0,0091 | 0,094 | 0,078 | 0,106 | 0,003 | 0,002 | 1,48 | 0,329 |
| | ΑΣΚ2 | 0,0091 | 0,094 | 0,099 | 0,106 | 0,003 | 0,002 | 2,76 | 0,363 |
| | ΑΣΚ3 | 0,0091 | 0,094 | 0,078 | 0,106 | 0,003 | 0,002 | 0,8 | 0,568 |
| | ΑΣΚ4 | 0,0091 | 0,094 | 0,078 | 0,106 | 0,003 | 0,002 | 1,22 | 0,952 |
| | ΑΣΚ5 | 0,0091 | 0,094 | 0,078 | 0,106 | 0,003 | 0,002 | 1,05 | 0,71 |

Στον Πίνακα 3.4 παρατίθενται αναλυτικά ο λόγος των βασικών συστατικών του αργού πετρελαίου στο παραπάνω δείγμα και στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της GC-MS για το αργό πετρέλαιο.



Εικόνα 3.1 Ανάλυση GC-MS χρωματογραφίας του αργού πετρελαίου

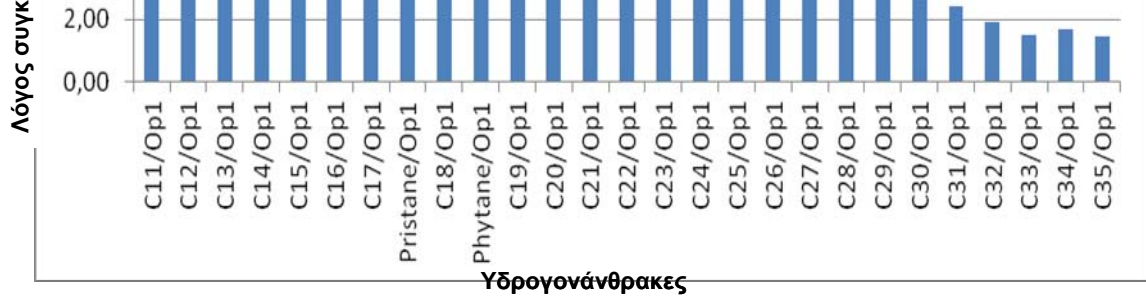
Πίνακας 3.4 Σύσταση του αργού πετρελαίου της λίμνης Κουμουνδούρου σε υδρογονάνθρακες

| Αλκάνια | Λόγος Συγκεντρώσεων | Αλκάνια | Λόγος Συγκεντρώσεων |
|---------|---------------------|---------|---------------------|
| C11/Op1 | 10,42 | C11/Op2 | 12,53 |
| C12/Op1 | 12,99 | C12/Op2 | 15,62 |
| C13/Op1 | 14,60 | C13/Op2 | 17,57 |
| C14/Op1 | 14,14 | C14/Op2 | 17,01 |
| C15/Op1 | 14,06 | C15/Op2 | 16,92 |
| C16/Op1 | 13,24 | C16/Op2 | 15,93 |
| C17/Op1 | 12,12 | C17/Op2 | 14,57 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.4

| | | | |
|--------------|------|--------------|------|
| Pristane/Op1 | 7,69 | Pristane/Op2 | 9,25 |
|--------------|------|--------------|------|

| | | | |
|-------------|-------|-------------|-------|
| C18/Op1 | 11,18 | C18/Op2 | 13,45 |
| Phytane/Op1 | 8,50 | Phytane/Op2 | 10,22 |
| C19/Op1 | 10,04 | C19/Op2 | 12,07 |
| C20/Op1 | 9,34 | C20/Op2 | 11,24 |
| C21/Op1 | 8,34 | C21/Op2 | 10,03 |
| C22/Op1 | 7,66 | C22/Op2 | 9,21 |
| C23/Op1 | 6,46 | C23/Op2 | 7,77 |
| C24/Op1 | 6,06 | C24/Op2 | 7,28 |
| C25/Op1 | 5,26 | C25/Op2 | 6,33 |
| C26/Op1 | 4,98 | C26/Op2 | 5,99 |
| C27/Op1 | 4,06 | C27/Op2 | 4,89 |
| C28/Op1 | 3,53 | C28/Op2 | 4,24 |
| C29/Op1 | 3,03 | C29/Op2 | 3,65 |
| C30/Op1 | 2,65 | C30/Op2 | 3,19 |
| C31/Op1 | 2,43 | C31/Op2 | 2,93 |
| C32/Op1 | 1,90 | C32/Op2 | 2,28 |
| C33/Op1 | 1,52 | C33/Op2 | 1,82 |
| C34/Op1 | 1,67 | C34/Op2 | 2,00 |
| C35/Op1 | 1,46 | C35/Op2 | 1,76 |



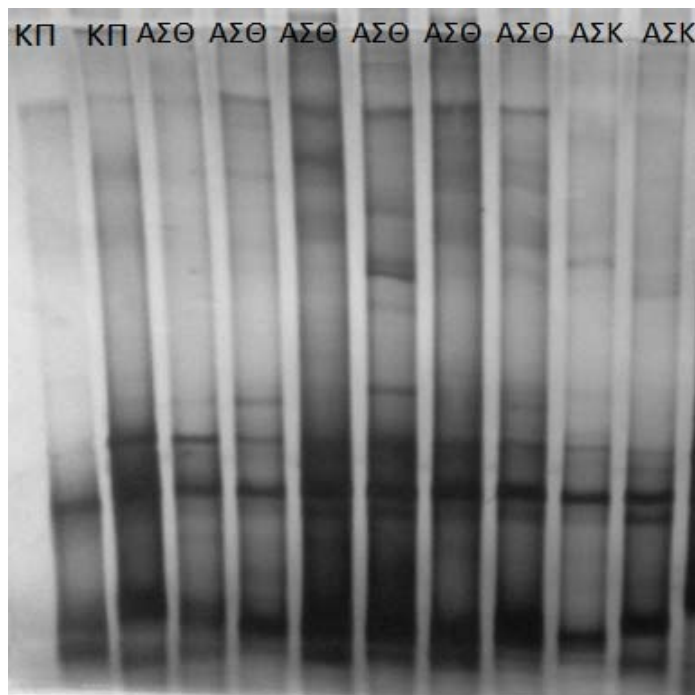
Εικόνα 3.2 Διαγραμματική απεικόνιση της σύστασης του αργού πετρελαίου

Στην περιοχή δειγματοληψίας που παρατηρείται συνεχής εναπόθεση πετρελαϊκών αποβλήτων, παρατηρήθηκε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό σε μικρού μοριακού βάρους αλκάνια, ενώ οι μεγάλοι μοριακού βάρους αλειφατικοί υδρογονάνθρακες βρέθηκαν σε μικρή περιεκτικότητα (Εικόνα 3.2). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε για τον υδρογονάνθρακα με 13 άτομα άνθρακα ενώ η μικρότερη για τον υδρογονάνθρακα με 35 άτομα άνθρακα.

3.2 Ποιοτική ανάλυση ολικού βακτηριακού πληθυσμού

3.2.1 Καταγραφή της ποικιλότητας των βακτηρίων σε μοριακό επίπεδο με την μέθοδο DGGE

Η μελέτη της ποικιλότητας του ολικού βακτηριακού πληθυσμού στις περιοχές δειγματοληψίας, έγινε με εφαρμογή της μεθόδου DGGE. Η χρήση της μοριακής τεχνικής σε συνδιασμό με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές, για τη μελέτη της βιοποικιλότητας στις περιοχές δειγματοληψίας, αποσκοπούσε στον σχηματισμό μιας περισσότερο ολοκληρωμένης εικόνας της ποικιλότητας των βακτηρίων στις περιοχές δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα της καταγραφής της βιοποικιλότητας σε μοριακό επίπεδο με τη μέθοδο DGGE φαίνονται στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3 DGGE ηλεκτροφόρηση σε δείγματα από την θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου (ΑΣΘ), τη λίμνη Κουμουνδούρου (ΑΣΚ) και την περιοχή εκροής πετρελαίου (ΚΠ)

Κατά την ανάλυση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού παρατηρήθηκε ότι η βιοποικιλότητα στα δείγματα της θάλασσας ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη λίμνη Κουμουνδούρου. Επίσης η βιοποικιλότητα από την περιοχή του πετρελαίου μέσα στη λίμνη Κουμουνδούρου είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη βιοποικιλότητα στην υπόλοιπη έκταση της λίμνης Κουμουνδούρου. Τέλος παρατηρήθηκαν αρκετοί όμοιοι ριβότυποι στα δείγματα της περιοχής του Ασπροπύργου και της λίμνης Κουμουνδούρου. Οι ριβότυποι στις χαμηλότερες θέσεις του πηκτώματος αντιστοιχούν σε θετικούς κατά Gram πληθυσμούς, με αυξημένη αναλογία GC στο γονιδίωμά τους. Οι πληθυσμοί αυτοί παρατηρείται ότι είναι εμφανείς σε όλες τις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.

3.2.2 Βακτηριακά στελέχη με ικανότητα βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου

Οι μικροοργανισμοί με ικανότητα αποικοδόμησης πετρελαϊκών υδρογονανθράκων επιλέχθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, βλέπε § 2.4. Ο αριθμός των βακτηριακών στελεχών με ικανότητα αποικοδόμησης πετρελαϊκών υδρογονανθράκων που απομονώθηκαν από την περιοχή της λίμνης Κουμουνδούρου, τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου και την περιοχή εκροής των πετρελαϊκών αποβλήτων στην περιοχή της λίμνης, με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών και των εκλεκτικών υποστρωμάτων (βλέπε § 2.4) φαίνεται στον Πίνακα 3.5. Στον Πίνακα 3.5 φαίνεται ο αριθμός των απομονωθέντων στελεχών που μπορούσαν να αυξηθούν παρουσία αργού πετρελαίου και αντίστοιχα ο αριθμός των στελεχών που αποικοδομούσαν το αργό πετρέλαιο.

Πίνακας 3.5: Αριθμός βακτηρίων που απομονώθηκαν ανά περιοχή δειγματοληψίας

| Περιοχή δειγματοληψίας | Αριθμός βακτηρίων που παρουσιάζουν αύξηση στο αργό πετρέλαιο | Αριθμός βακτηρίων που παρουσιάζουν αποικοδόμηση του αργού πετρελαίου |
|------------------------------|--|--|
| Θάλασσα Ασπροπύργου | 45 | 33 (73,33%) |
| Λίμνη Κουμουνδούρου | 21 | 14 (66,66%) |
| Περιοχή αποβλήτων πετρελαίου | 20 | 19 (95,00%) |

Η θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου παρουσίασε μεγαλύτερη βιοποικιλότητα σε σχέση με τη λίμνη καθώς ο αριθμός των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την θάλασσα ήταν 45 ενώ από τη λίμνη ήταν μόλις 21 βακτήρια. Η θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου είχε μεγάλο αριθμό βακτηρίων που αποικοδομούν το πετρέλαιο. Όμως στο σύνολο των απομονωθέντων βακτηρίων το ποσοστό των συνολικών βακτηρίων που αποικοδομούσαν το πετρέλαιο ήταν μεγαλύτερο στην περιοχή εκροής αποβλήτων πετρελαίου.

3.3 Ομαδοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο στελεχών - Ανίχνευση γονιδίου καταβολισμού πετρελαϊκών υδρογονανθράκων - Ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA γονιδίου

Στο σύνολο των απομονωθέντων βακτηρίων με ικανότητα αύξησης παρουσία αργού πετρελαίου έγινε φυλογενετική διάκριση σε στελέχη με τη μέθοδο BOX-PCR ((βλέπε § 2.6). Σε όλα τα παραπάνω στελέχη έγινε ανίχνευση της παρουσίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την αλκανική μονοξυγενάση (alkB).

Επιπλέον τα ταχύτερα αυξανόμενα σε πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες βακτήρια, τα βακτήρια που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη βιοαποικοδομητική ικανότητα και αυτά που ανιχνεύτηκε το γονίδιο της αλκανικής μονοξυγενάσης, ταυτοποιήθηκαν μοριακά με ενίσχυση εξειδικευμένης περιοχής του 16S rDNA γονιδίου.

Από την περιοχή της θάλασσας του Ασπροπύργου και από τη λίμνη Κουμουνδούρου όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν ήταν κατά Gram αρνητικά.

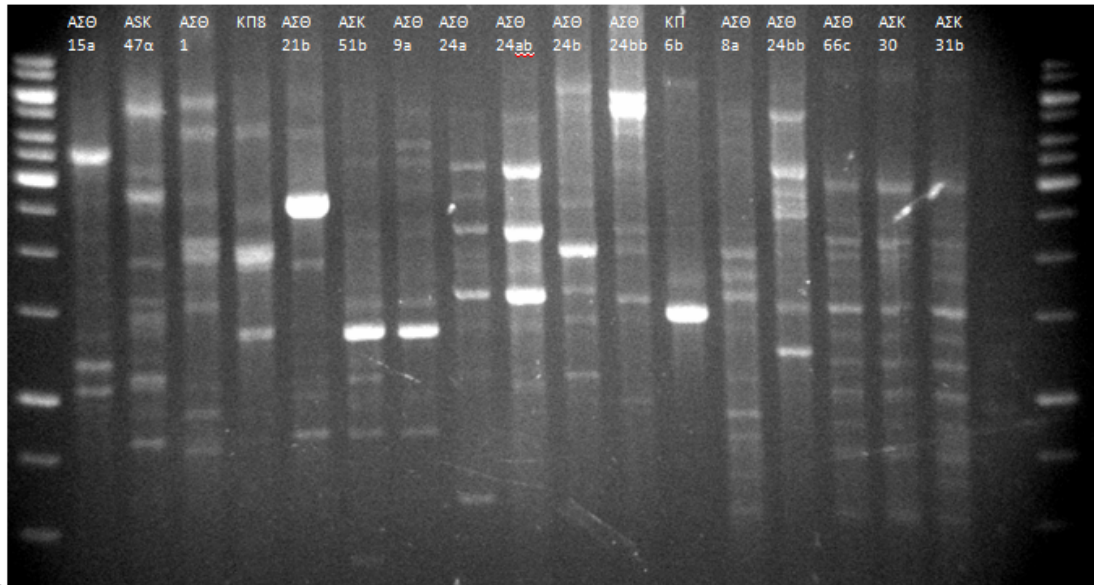
3.3.1 Ομαδοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο στελεχών

Κατά τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε από τις περιοχές της θάλασσας και τις λίμνης (βλέπε § 2.1) απομονώθηκαν συνολικά 88 βακτήρια με ικανότητα αποικοδόμησης πετρελαϊκών υδρογονανθράκων. Από τη σύγκριση των προτύπων BOX (Εικόνα 3.4) των απομονωθέντων βακτηρίων βρέθηκε ότι αυτά αντιστοιχούν σε 33 διαφορετικά φυλογενετικά στελέχη.

Από τα 45 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή της θάλασσας του Ασπροπύργου τα 11 έδωσαν σε αντίδραση BOX-PCR όμοιο πρότυπο με στελέχη της λίμνης Κουμουνδούρου.

Από τα 20 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων, η οποία βρίσκεται στην λίμνη Κουμουνδούρου κανένα δεν έδωσε σε αντίδραση BOX-PCR όμοιο πρότυπο με τα βακτηριακά στελέχη της λίμνης Κουμουνδούρου ή με τα βακτηριακά στελέχη της θάλασσας του Ασπροπύργου.

Τα πρότυπα της αντίδρασης BOX-PCR χρησιμοποιήθηκαν για τη μετέπειτα ταυτοποίηση των επιλεγμένων στελεχών



Εικόνα 3.4 Ενδεικτική εικόνα BOX-PCR των διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων των απομονωθέντων στελεχών

3.3.2 Παρουσία γονιδίων καταβολισμού πετρελαϊκών υδρογονανθράκων

Τα βακτήρια, ακόμα και αυτά που είχαν το ίδιο πρότυπο στην αντίδραση BOX-PCR, μελετήθηκαν ξεχωριστά καθώς τα γονίδια αποικοδόμησης βρίσκονται σε πλασμιδιακούς φορείς.

Το γενικό ζεύγος εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του γονιδίου *alkB*, έδειξε ότι στα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη υπάρχουν πολλά ομόλογα του γονιδίου *alkB*, τα οποία βάσει της βιβλιογραφίας χαρακτηρίζονται ως ομόλογα *alkB1/alkB2/alkB3/alkB4*. Το *alkB1* δίνει μια ζώνη στις 550 βάσεις, το *alkB2* στις 660 βάσεις, το *alkB3* στις 900 βάσεις και το *alkB4* στις 350 βάσεις.

Ομόλογα του γονιδίου *alkB* ανιχνεύτηκαν στο 49% των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών από τη θάλασσα και τη λίμνη Κουμουνδούρου. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων δεν παρουσίασαν ομόλογα του γονιδίου *alkB*. Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται αναλυτικά τα βακτήρια στα οποία ανιχνεύτηκαν τα ομόλογα του γονιδίου *alkB*.

Πίνακας 3.6: αναλυτικός πίνακας παρουσίας ομόλογων γονιδίων *alkB* στα απομονωθέντα βακτήρια

| Βακτήρια | Ομόλογο γονίδιο <i>alkB</i> |
|----------|-----------------------------|
| ΑΣΚ 47α | <i>alkB1</i> |
| ΑΣΘ 24ab | <i>alkB1</i> |

| | |
|----------|-------------|
| ΑΣΘ 24b | alkB1/B2 |
| ΑΣΘ 24bb | alkB1/B2 |
| ΑΣΘ 66c | alkB1/B2/B4 |
| ΑΣΘ 24a | alkB1/B3/B4 |
| ΑΣΚ 26 | alkB2 |
| ΑΣΚ 44a | alkB2 |
| ΑΣΚ 27 | alkB2/B3 |
| ΑΣΘ 17 | alkB2/B3/B4 |
| ΑΣΘ 2a | alkB2/B3/B4 |
| ΑΣΘ 1 | alkB2/B4 |
| ΑΣΘ 15b | alkB2/B4 |
| ΑΣΘ 5 | alkB3/B4 |
| ΑΣΘ 4 | alkB4 |
| ΑΣΘ 6 | alkB4 |
| ΑΣΘ 8b | alkB4 |
| ΑΣΘ14 | alkB4 |
| ΑΣΚ 48b | alkB4 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.6

| | |
|--------|----------------|
| ΑΣΘ 11 | alkB4/B1/B2/B3 |
| ΑΣΘ 12 | alkB4/B1/B3 |
| ΑΣΘ 19 | alkB4/B2 |

3.4 Μελέτη της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών

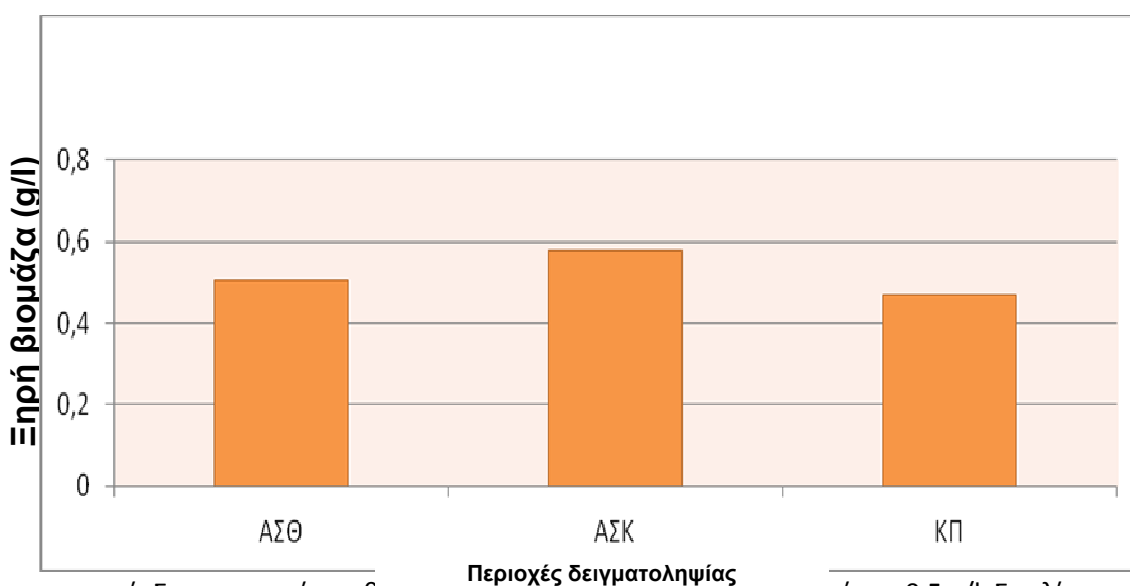
Τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη αυξήθηκαν σε υγρές κλειστές καλλιέργειες, με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο 5% w/v, προκειμένου να εκτιμηθεί η βιοαποικοδομητική τους δραστηριότητα, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8

Στη συνέχεια ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες. Τα ταχύτερα αυξανόμενα στελέχη ταυτοποιήθηκαν και επιλέχθηκαν 3 βακτήρια, ένα από κάθε περιοχή για τα οποία ελέγχθηκε ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης για το κάθε ένα.

Τέλος ομαδοποιήθηκαν και έγιναν μεικτές καλλιέργειες (consortia) στις ίδιες συνθήκες με τις υγρές κλειστές καλλιέργειες. Στις ομάδες των βακτηρίων που προέκυψαν προσδιορίστηκε εκ νέου η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα με πηγή άνθρακα αργό πετρέλαιο όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8.

3.4.1 Αύξηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών σε υγρές κλειστές καλλιέργειες πετρελαϊκών υδρογονανθράκων

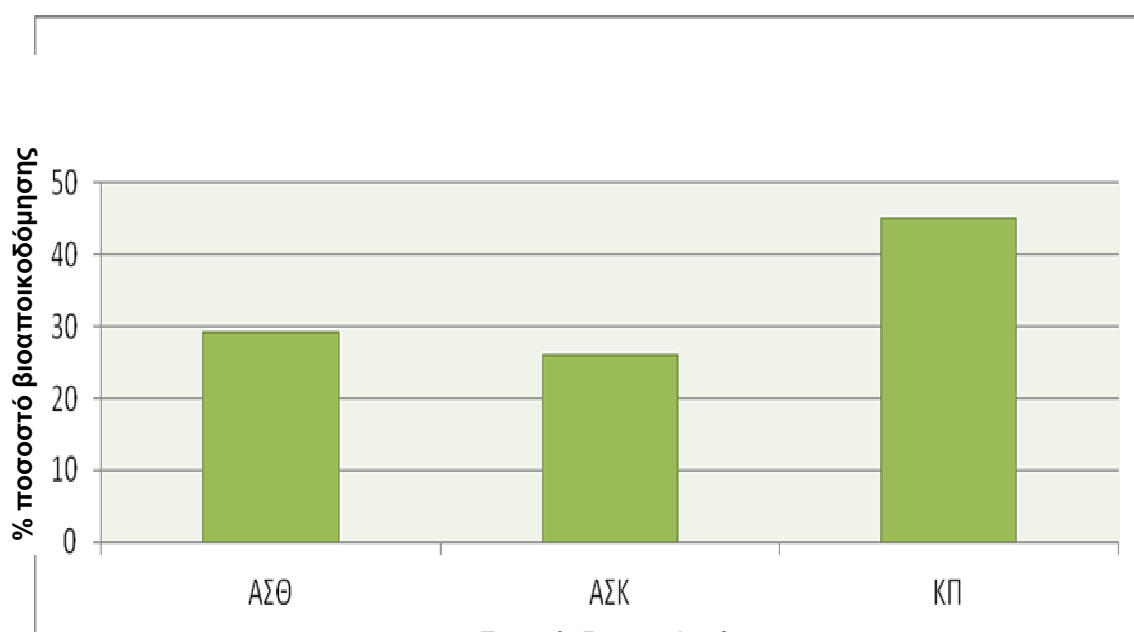
Η αύξηση των βακτηριακών στελεχών σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο εκτιμήθηκε με την παράμετρο της ξηρής βιομάζας (βλέπε § 2.8.1.1) και του ποσοστού αποικοδόμησης με υπολογισμό του στερεού υπολείμματος υδρογονανθράκων (βλέπε § 2.8.1.2) (Πίνακας 3.7).



περιοχή. Στην περιοχή της θαλάσσιας (ΑΣΘ) ο μέσος όρος είναι περίπου 0,5 g/l, Στη λίμνη Κουμουندούρου περίπου 0,6 g/l που είναι η μεγαλύτερη τιμή από όλες τις άλλες περιοχές και στην περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων περίπου 0,45 g/l που παρουσιάζει την πιο μικρή τιμή.

Κατά την αύξηση στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο, τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση με κατά μέσο όρο 0,58 g/l, σε σχέση με το μέσο όρο της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη θάλασσα 0,56 g/l και με τον μέσο όρο των βακτηρίων που

απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαίου 0,47 g/l (Εικόνα 3.5). Παρατηρήθηκε ότι όλες οι τιμές του μέσου όρου ξηρής βιομάζας και των τριών περιοχών είναι σχετικά κοντά και δεν παρουσιάζονται μεγάλες αποκλίσεις. Επίσης όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.7 που περιέχει αναλυτικά για κάθε βακτήριο τον υπολογισμό της ξηρής βιομάζας, το σύνολο των απομονωθέντων βακτηρίων παρουσίασε ικανότητα αύξησης σε καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα το αργό πετρέλαιο.



περιοχές, στην περιοχή εκροής παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό ενώ το μικρότερο παρατηρείται στη λίμνη Κουμουνδούρου (ΑΣΚ). Στην θάλασσα του Ασπροπύργου παρατηρείται ένα αρκετά καλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης

Το ποσοστό αποικοδόμησης αργού πετρελαίου, όπως προσδιορίστηκε με βάση το στερεό υπόλειμμα μετά από χρόνο επώασης 10 ημερών, κυμάνθηκε από 0% έως 68,57%. Το ποσοστό αποικοδόμησης είχε την υψηλότερη μέση τιμή του, 45,06%, για τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων. Στην περιοχή της θάλασσας του Ασπροπύργου το μέσο ποσοστό αποικοδόμησης ήταν 29,18%, και για την λίμνη Κουμουνδούρου 26,12%. Στην Εικόνα 3.6 φαίνεται ο μέσος όρος του ποσοστού βιοαποικοδόμησης ανά περιοχή απομόνωσης.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.7 όπου αναγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για όλα τα απομονωθέντα βακτήρια σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου για 10 ημέρες, παρατηρείται ότι αρκετά βακτήρια έχουν ποσοστό βιοαποικοδόμησης κοντά στο 50%, αλλά η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα δεν συμβαδίζει με τις τιμές ξηρής βιομάζας που καταγράφηκαν.

Πίνακας 3.7: Αναλυτικός πίνακας του υπολογισμού της ξηρής βιομάζας και του ποσοστού βιοποικοδόμησης για κάθε βακτήριο που πραγματοποιήθηκε από υγρές, κλειστές καλλιέργειες των δέκα ημερών που περιείχαν προσθήκη 5% αργού πετρελαίου

| Βακτήρια | Προέλευση | Ξηρή βιομάζα (g/l) | Βιοποικοδόμηση αργού πετρελαίου% |
|----------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| ΑΣΘ 1 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,18 | 51,26 |
| ΑΣΘ 10a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,85 | 1 |
| ΑΣΘ 11 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,63 | 44,87 |
| ΑΣΘ 12 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,30 | 42,69 |
| ΑΣΘ 15a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,43 | 45,22 |
| ΑΣΘ 15b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,34 | 17,08 |
| ΑΣΘ 16 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,46 | 17,71 |
| ΑΣΘ 17 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,36 | 47,89 |
| ΑΣΘ 18 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,38 | 0 |
| ΑΣΘ 19 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,45 | 66,32 |
| ΑΣΘ 21a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,38 | 0 |
| ΑΣΘ 21b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,27 | 18,04 |
| ΑΣΘ 22 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,40 | 52,56 |
| ΑΣΘ 24a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,09 | 44,18 |
| ΑΣΘ 24ab | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,17 | 0 |
| ΑΣΘ 24b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,17 | 42,61 |
| ΑΣΘ 24bb | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,07 | 66,32 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.7

| | | | |
|---------|---------------------|------|-------|
| ΑΣΘ 25a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,11 | 20,23 |
|---------|---------------------|------|-------|

| | | | |
|----------|---------------------|------|-------|
| ΑΣΘ 28 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,31 | 33,08 |
| ΑΣΘ 29 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,50 | 48,87 |
| ΑΣΘ 2a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,50 | 56,03 |
| ΑΣΘ 2b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,20 | 17,09 |
| ΑΣΘ 3 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,03 | 50,38 |
| ΑΣΘ 4 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,27 | 50,04 |
| ΑΣΘ 5 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,33 | 37,84 |
| ΑΣΘ 501 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,43 | 39,11 |
| ΑΣΘ 6 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,01 | 11,24 |
| ΑΣΘ 62Ta | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,04 | 30,55 |
| ΑΣΘ 63Tb | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,14 | 21,99 |
| ΑΣΘ 64b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,28 | 20,99 |
| ΑΣΘ 66c | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,36 | 1 |
| ΑΣΘ 68 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,25 | 66,21 |
| ΑΣΘ 69a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,74 | 0 |
| ΑΣΘ 69b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,43 | 53,93 |
| ΑΣΘ 70b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,60 | 58,57 |
| ΑΣΘ 70c | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,16 | 0 |
| ΑΣΘ 72a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,33 | 2 |
| ΑΣΘ 7a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,21 | 0 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.7

| | | | |
|--------|---------------------|------|-------|
| ΑΣΘ 7b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,09 | 20,84 |
| ΑΣΘ 8a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,28 | 2,66 |
| ΑΣΘ 8b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,82 | 50,2 |
| ΑΣΘ 9a | Θάλασσα Ασπροπύργου | 1,06 | 0 |
| ΑΣΘ 9b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,05 | 44,16 |

| | | | |
|---------|---------------------|------|-------|
| ΑΣΘ10b | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,91 | 0 |
| ΑΣΘ14 | Θάλασσα Ασπροπύργου | 0,17 | 28,39 |
| ΑΣΚ 13b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,77 | 64,45 |
| ΑΣΚ 20 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,35 | 30,18 |
| ΑΣΚ 23 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,61 | 0 |
| ΑΣΚ 26 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,97 | 42,98 |
| ΑΣΚ 27 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,35 | 37,97 |
| ΑΣΚ 30 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,44 | 32,66 |
| ΑΣΚ 31a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,86 | 52,84 |
| ΑΣΚ 31b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,76 | 18,66 |
| ΑΣΚ 31c | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0 | 0 |
| ΑΣΚ 32a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,43 | 23,06 |
| ΑΣΚ 33b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,35 | 29,02 |
| ΑΣΚ 35a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,33 | 0 |
| ΑΣΚ 43 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 1,07 | 20,37 |
| ΑΣΚ 44a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,93 | 0 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.7

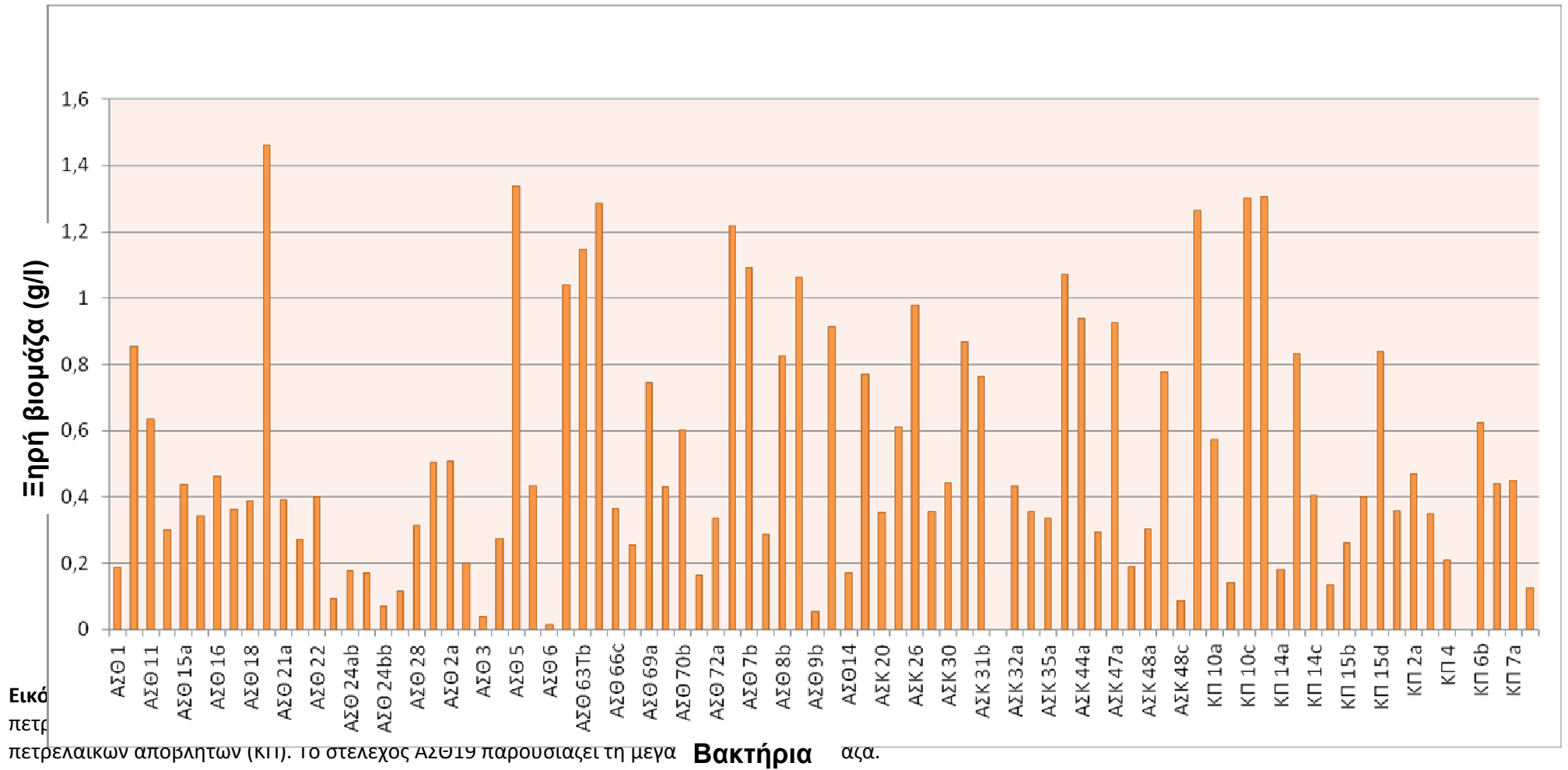
| | | | |
|---------|---|------|-------|
| ΑΣΚ 45 | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,29 | 20,45 |
| ΑΣΚ 47a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,92 | 49,85 |
| ΑΣΚ 47b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,19 | 47,13 |
| ΑΣΚ 48a | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,30 | 49,33 |
| ΑΣΚ 48b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,77 | 0 |
| ΑΣΚ 48c | Λίμνη Κουμουνδούρου | 0,08 | 4,27 |
| ΑΣΚ 51b | Λίμνη Κουμουνδούρου | 1,26 | 25,35 |
| ΚΠ 10a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,57 | 21,27 |
| ΚΠ 10b | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην | 0,14 | 6 |

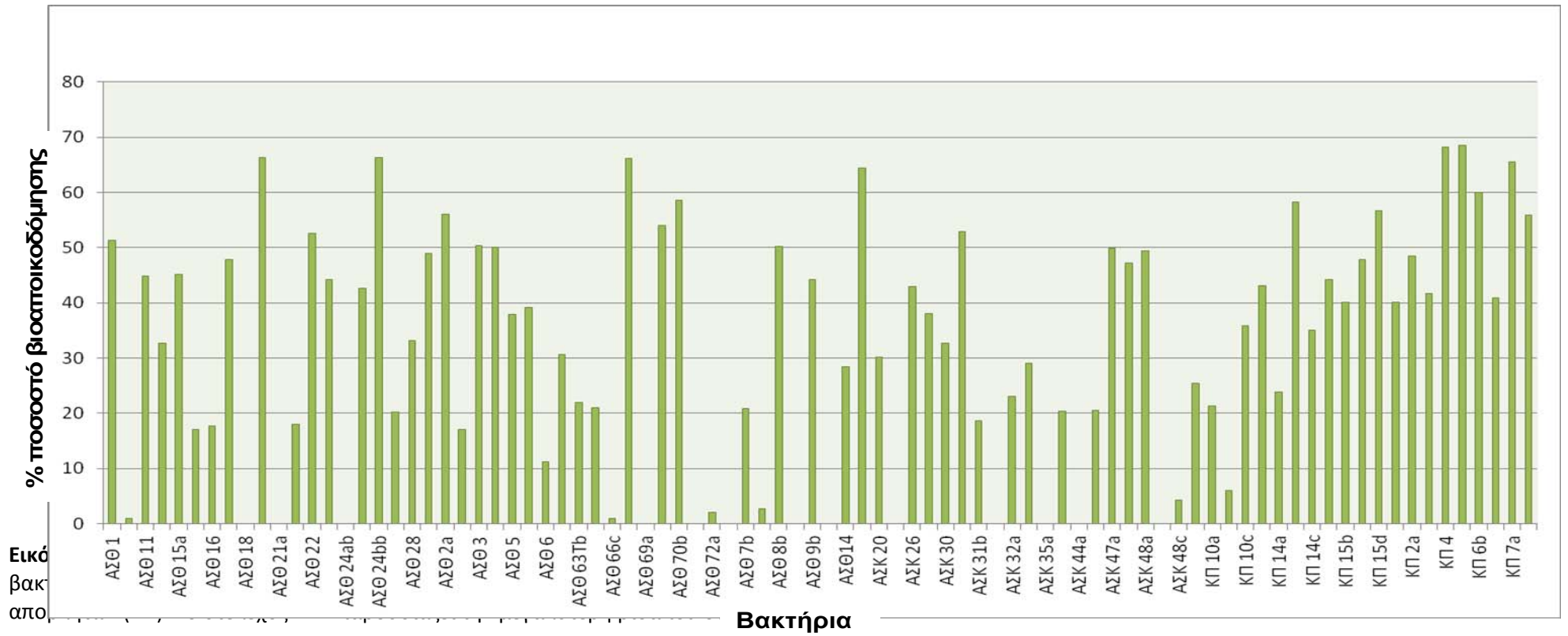
| | | | |
|--------|--------------------------------------|------|-------|
| | λίμνη | | |
| ΚΠ 10c | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 1,30 | 35,87 |
| ΚΠ 12a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 1,30 | 43,06 |
| ΚΠ 14a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,18 | 23,81 |
| ΚΠ 14b | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,83 | 58,21 |
| ΚΠ 14c | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,40 | 35,05 |
| ΚΠ 15a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,13 | 44,16 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.7

| | | | |
|--------|--------------------------------------|------|-------|
| ΚΠ 15b | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,26 | 40,09 |
| ΚΠ 15c | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,40 | 47,85 |
| ΚΠ 15d | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,83 | 56,73 |
| ΚΠ 15e | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,35 | 40,03 |
| ΚΠ 2a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,47 | 48,46 |
| ΚΠ 3 | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,35 | 41,68 |
| ΚΠ 4 | Περιοχή εκροής πετρελαίου | 0,21 | 68,15 |
| ΚΠ 6a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0 | 68,57 |
| ΚΠ 6b | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,62 | 60 |

| | | | |
|-------|--------------------------------------|------|-------|
| ΚΠ 6c | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,43 | 40,95 |
| ΚΠ 7a | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,45 | 65,58 |
| ΚΠ 8 | Περιοχή εκροής πετρελαίου στην λίμνη | 0,12 | 55,86 |





Σύμφωνα με την Εικόνα 3.7 και την Εικόνα 3.8 παρατηρήθηκε ότι σε λίγα στελέχη υπάρχει σύνδεση την υψηλής βιομάζας με τη μεγάλη βιοαποικοδόμηση. Το βακτήριο ΑΣΘ19 παρουσίασε μια υψηλή βιομάζα και ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Το βακτήριο ΑΣΘ5 είχε πολύ υψηλή βιομάζα και καλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Όλα τα βακτήρια που είχαν απομονωθεί από τη λίμνη Κουμουνδούρου (ΑΣΚ) παρουσίασαν χαμηλή ξηρή βιομάζα. Το βακτήριο ΑΣΚ47α παρουσίασε υψηλή βιοαποικοδόμηση και καλή βιομάζα. Όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων (ΚΠ) παρουσίαζαν υψηλή βιοαποικοδόμηση αλλά όχι μεγάλη βιομάζα.

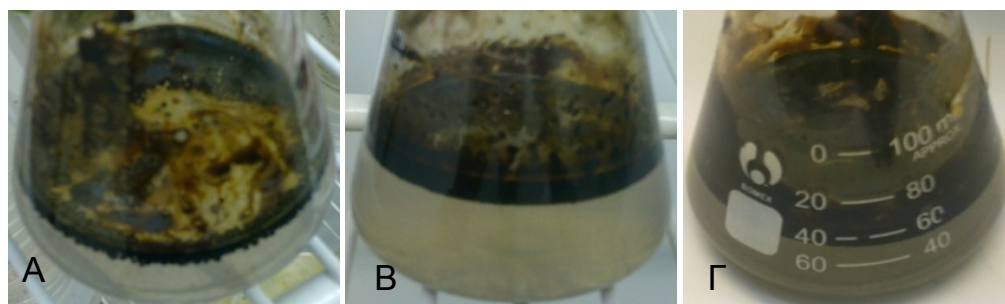
3.4.1.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των υγρών κλειστών καλλιεργειών με τη μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση

Παράλληλα με τη μέτρηση της ξηρής βιομάζας (g/l) και του ποσοστού αποικοδόμησης των υδρογονανθράκων έγινε μια φαινοτυπική ομαδοποίηση των καλλιεργειών καθώς παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικοί φαινότυποι στις υγρές κλειστές καλλιέργειες μετά από δέκα ημέρες:

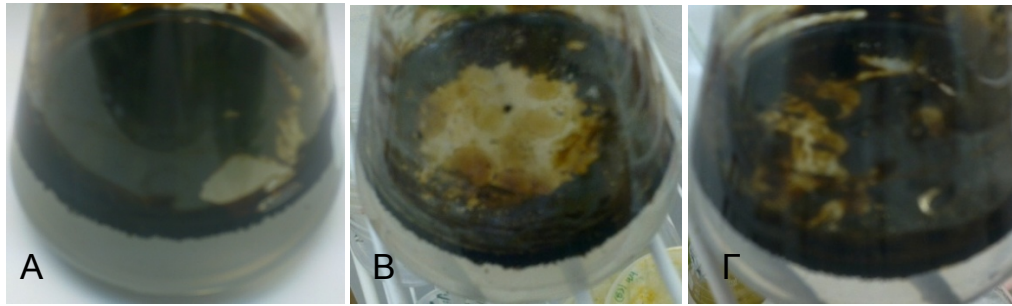
- Καλλιέργειες που εμφανίζουν μεγάλη βιοαποικοδόμηση
- Καλλιέργειες που εμφανίζουν συσσωματώματα πετρελαίου
- Καλλιέργειες που εκλύουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες

3.4.1.1.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καλλιεργειών που εμφανίζουν μεγάλη βιοαποικοδόμηση

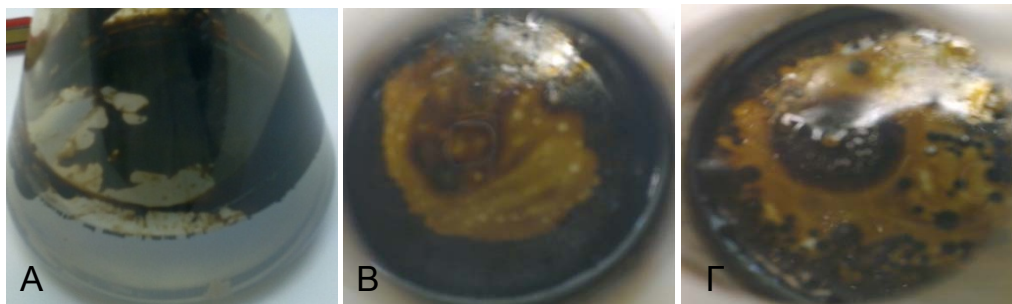
Στο σύνολο των βακτηρίων παρατηρήθηκε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό αποικοδόμησης, το οποίο εκτός από την εκτίμηση του ποσοστού βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.1.2 επιβεβαιώθηκε φαινοτυπικά, με τη μείωση της επιφάνειας διασποράς του αργού πετρελαίου στις καλλιέργειες. Ακολουθούν εικόνες με τις καλλιέργειες βακτηρίων που εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης



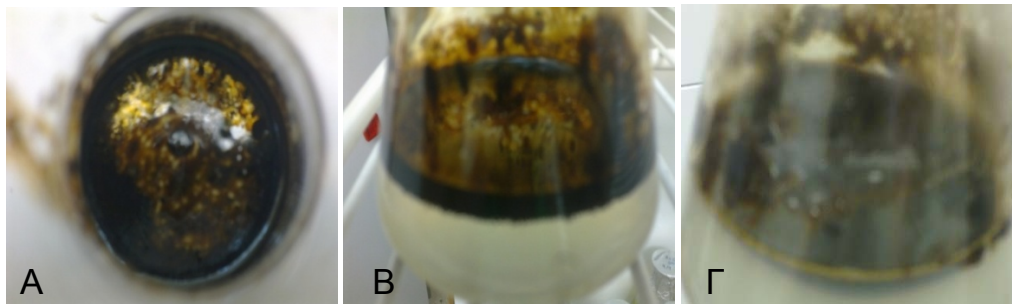
Εικόνα 3.9 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5 % αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:**ΑΣΘ15b **B:** ΑΣΘ19 **Γ:** ΑΣΘ26



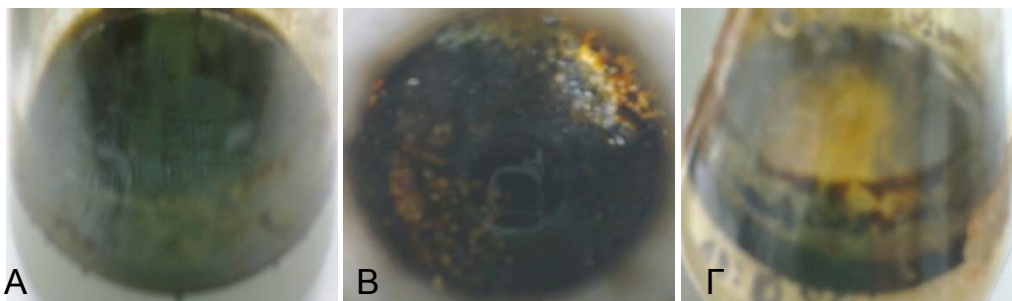
Εικόνα 3.10 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ47b **B:** ΑΣΚ47a **Γ:** ΑΣΘ2a



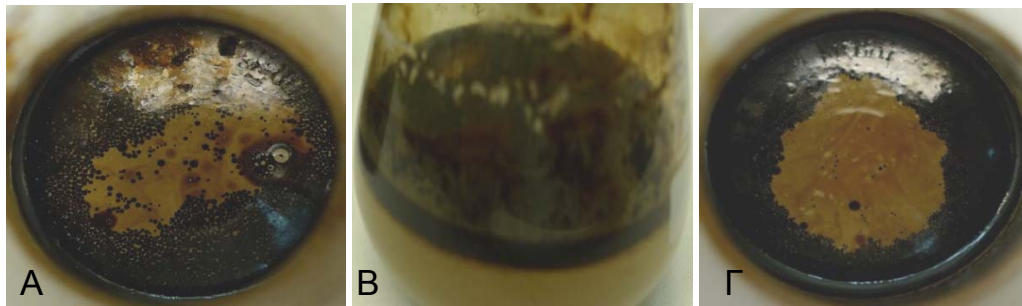
Εικόνα 3.11 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ5 **B:** ΑΣΘ10a **Γ:** ΑΣΘ12



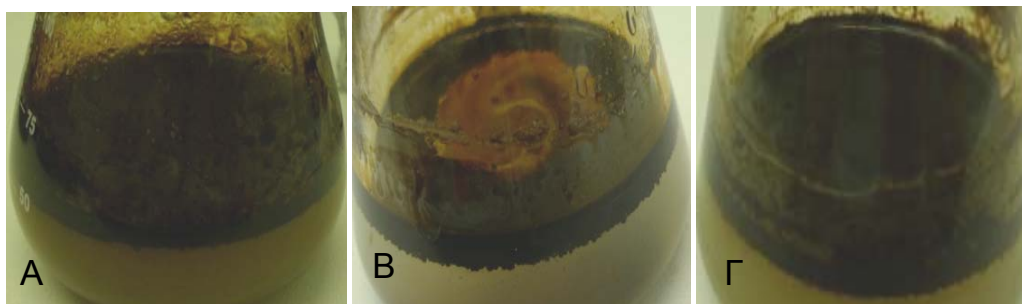
Εικόνα 3.12 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ17 **B:** ΑΣΘ22 **Γ:** ΑΣΘ24b



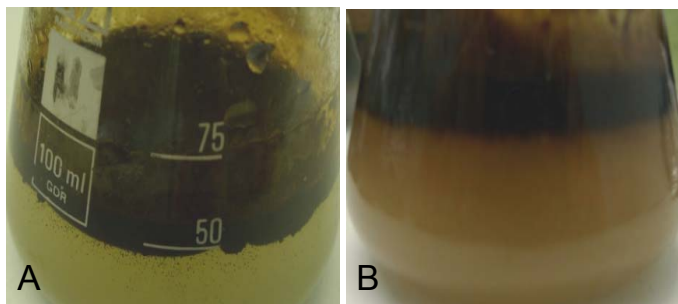
Εικόνα 3.13 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ29 **B:** ΑΣΘ4 **Γ:** ΑΣΘ10a



Εικόνα 3.14 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:**ΑΣΚ70b **B:** ΚΠ6α **Γ:** ΚΠ6α



Εικόνα 3.15 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΚΠ7α **B:** ΚΠ14c **Γ:** ΚΠ15α αντίστοιχα

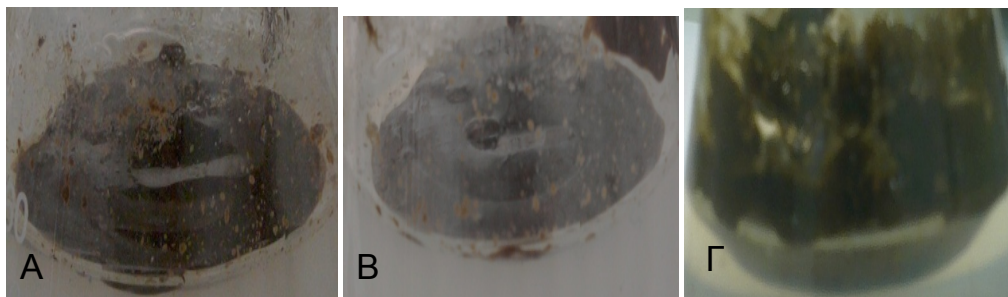


Εικόνα 3.16: Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΚΠ15c **B:** ΚΠ15e

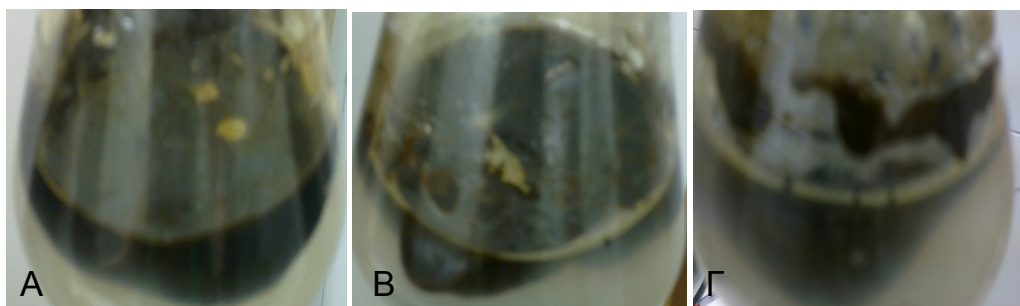
Αρκετά βακτηρια παρουσίασαν υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης και φαινοτυπικά μεγάλη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα. Η μεγαλύτερη παρατηρήθηκε για τα βακτηριακά στελέχη *Nitratireductor sp.*-ΑΣΘ5, *Thalassospira sp.*-ΑΣΘ10a, *Thalassospira sp.*-ΑΣΘ12, *Pseudomonas sp.*-ΑΣΚ 47b και *Rheinheimera aquimaris*-ΚΠ6α. Τα στελέχη αυτά εμφάνισαν μια αρκετά μεγάλη μείωση της επιφάνειας διασποράς του αργού πετρελαίου μετά από δέκα ημέρες η οποία επιβεβαιώθηκε και με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων στις συγκεκριμένες καλλιέργειες.

3.4.1.1.2 Καλλιέργειες που εμφανίζουν συσσωματώματα πετρελαίου

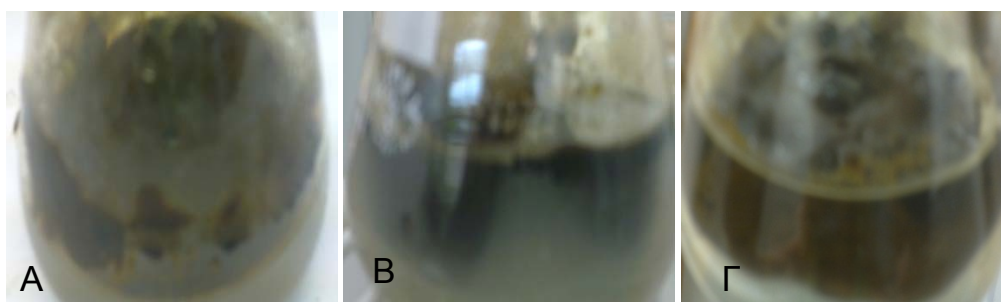
Μια ακόμη σημαντική φαινοτυπική παρατήρηση ήταν το γεγονός ότι σε ορισμένες καλλιέργειες το αργό πετρέλαιο σχημάτιζε συσσωματώματα και δημιουργούσε μια στερεάς μορφής συσσωρευμένη μάζα, όπου πιθανά αποτελείται από τα μεγάλα μοριακού βάρους αλκάνια. Ακολουθούν εικόνες με τις καλλιέργειες βακτηρίων που εμφάνισαν τα συσσωματώματα πετρελαίου.



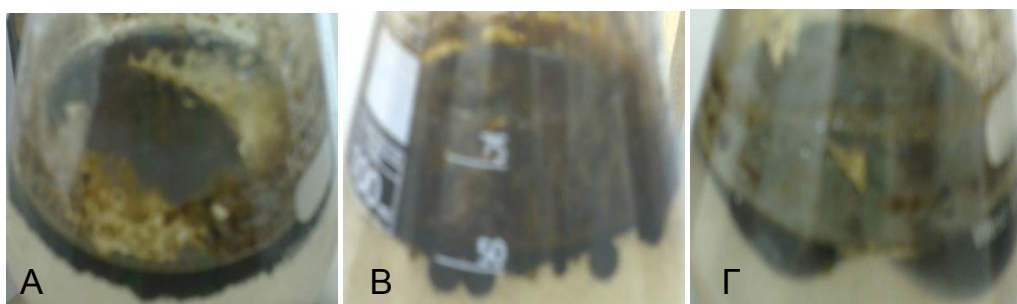
Εικόνα 3.17 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ44a **B:** ΑΣΚ48b **Γ:** ΑΣΘ8b



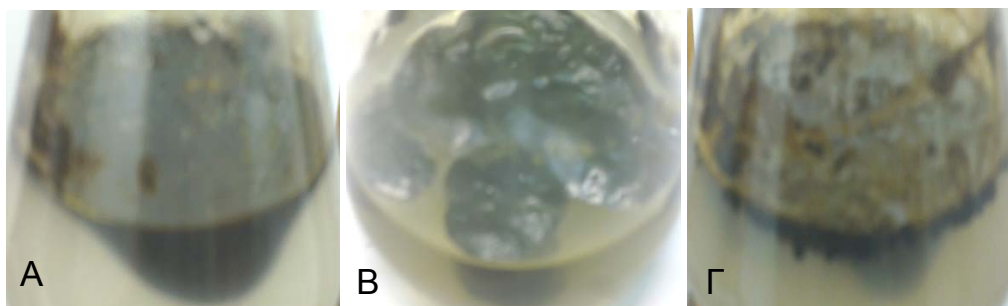
Εικόνα 3.18 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ14 **B:** ΑΣΚ21b **Γ:** ΑΣΚ24a



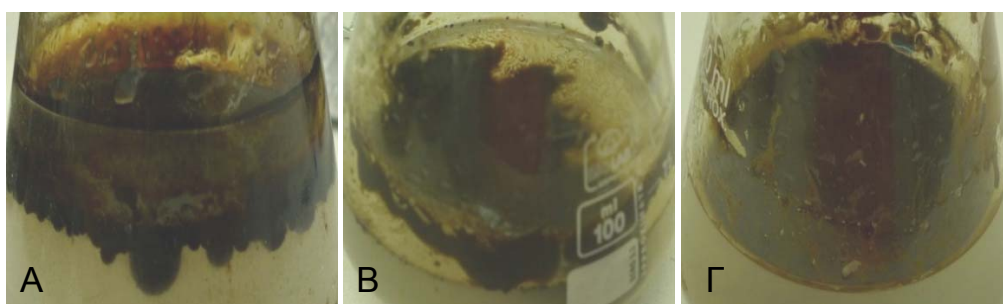
Εικόνα 3.19 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ24ab **B:** ΑΣΘ24bb **Γ:** ΑΣΘ25a



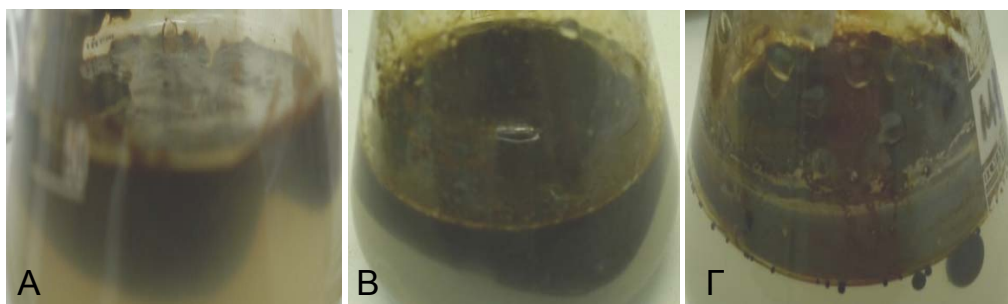
Εικόνα 3.20 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ45 **B:** ΑΣΚ48b **Γ:** ΑΣΚ48c



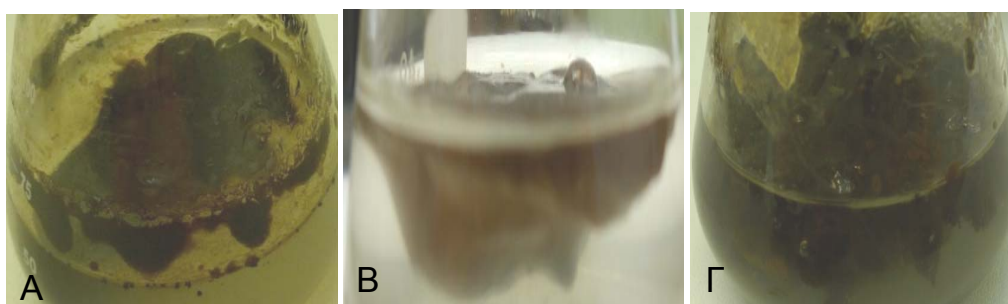
Εικόνα 3.21 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ1 **B:** ΑΣΘ6 **Γ:** ΑΣΘ9b



Εικόνα 3.22 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ62a **B:** ΑΣΚ68 **Γ:** ΑΣΚ69a



Εικόνα 3.23 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ70c **B:** ΑΣΚ72a **Γ:** ΚΠ2a

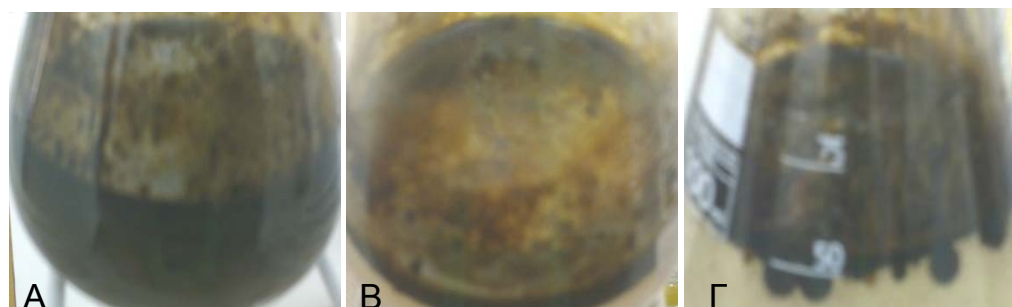


Εικόνα 3.24 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΚΠ6c **B:** ΚΠ15b **Γ:** ΑΣΘ66c

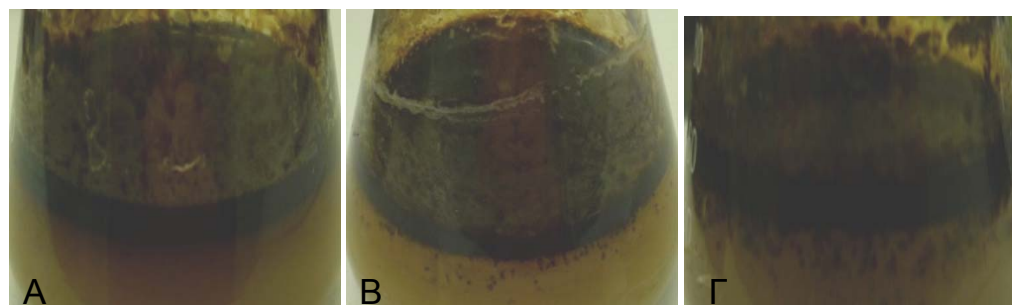
Οι καλλιέργειες με τα βακτήρια ΑΣΘ6, ΑΣΘ8b, ΑΣΘ9b, ΑΣΘ24a, ΑΣΘ24bb, ΑΣΘ70c, ΚΠ2a και ΚΠ15b εμφάνισαν μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης και μεγάλη συσσώρευση του πετρελαίου σε βιοσυσσωματώματα.

3.4.1.1.3 Καλλιέργειες που εκλύουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες

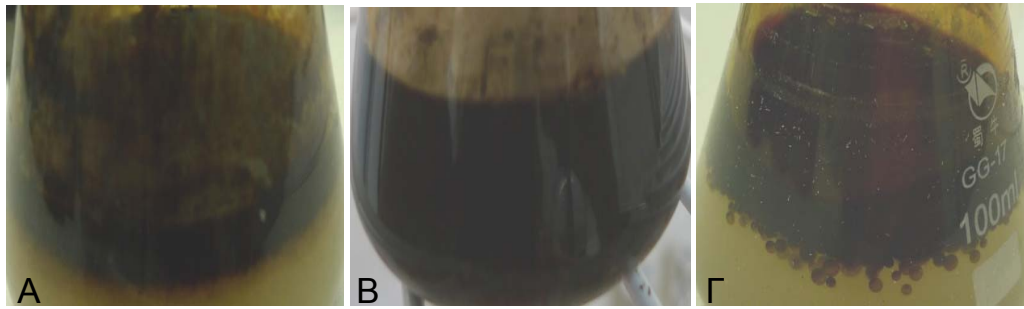
Ακόμα μία κατηγορία που προέκυψε από την φαινοτυπική παρατήρηση των υγρών κλειστών καλλιεργειών ήταν οι καλλιέργειες όπου τα βακτήρια εκλύουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες με αποτέλεσμα να γινόταν διασπορά του πετρελαίου σε όλη το θρεπτικό υπόστρωμα και όχι μόνο στην επιφάνεια και να επιτυγχάνεται ευκολότερα η βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων. Η δράση των επιφανειοδραστικών παραγόντων ήταν εμφανής με τον σχηματισμό μικυλλίων (Εικόνες 3.25-Γ, 3.27-Γ) και με την διασπορά του πετρελαίου σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος της καλλιέργειας (Εικόνες 3.25-A, 3.27-B).



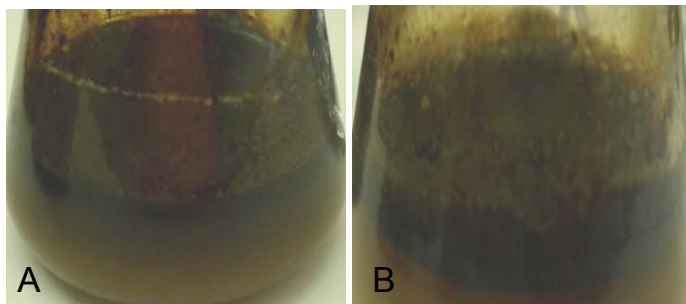
Εικόνα 3.25 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΘ15a **B:** ΑΣΚ27 **Γ:** ΑΣΚ48a



Εικόνα 3.26 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** ΑΣΚ69b **B:** ΑΣΘ501 **Γ:** ΚΠ3



Εικόνα 3.27 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** KΠ4 **B:** KΠ8 **Γ:** KΠ12a



Εικόνα 3.28 Υγρές κλειστές καλλιέργειες των 10 ημερών με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου των βακτηρίων **A:** KΠ14b **B:** KΠ15d

3.4.1.2 Ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων

Τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη που επιδείκνυαν μεγάλη βιοαποικοδομητική ικανότητα σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου (βλέπε παράγραφο 2.8) ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου (βλέπε παράγραφο 2.7.2) (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8: Ταυτοποίηση επιλεγμένων βακτηρίων σύμφωνα με την τράπεζα κατάθεσης αλληλουχιών gene bank.

| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ | ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ | ΒΑΣΕΙΣ |
|----------|---|-----------|--------|
| ΑΣΘ 15a | <i>Erythrobacter</i> FM992771.1 GI:311690770 | 99% | 992 |
| ΑΣΚ 47a | <i>Halomonas</i> JX220838.1 GI:401063580 | 99% | 765 |
| ΑΣΘ 1 | <i>Nitratireductor</i> | | |
| ΑΣΘ 24b | <i>Nitratireductor</i> JN942135.1 GI:375335225 | 99% | 827 |

| | | | |
|----------|---|-----|-----|
| ΑΣΘ 24bb | <i>Nitratireductor</i> | | |
| ΑΣΘ 5 | <i>Nitratireductor</i> JX220867.1 GI:401063609 | 95% | 985 |
| ΑΣΘ 501 | <i>Nitratireductor</i> | | |
| ΑΣΘ 7b | <i>Nitratireductor</i> | | |
| ΑΣΘ 8b | <i>Nitratireductor</i> JX220866.1 GI:401063608 | 96% | 672 |
| ΑΣΚ 45 | <i>Nitratireductor</i> | | |

Συνέχεια του Πίνακα 3.8

| | | | |
|----------|---|-----|-----|
| ΑΣΚ 48a | <i>Nitratireductor</i> | | |
| ΑΣΘ 24a | <i>Photorhabdus luminescens</i> | | |
| ΑΣΘ 24ab | <i>Photorhabdus luminescens</i> AY594267.2 GI:63079103 | 77% | 854 |
| ΑΣΘ 66c | <i>Pseudomonas</i> FJ169986.1 GI:206585036 | 99% | 993 |
| ΑΣΚ 30 | <i>Pseudomonas</i> FJ169986.1 GI:206585036 | 99% | 824 |
| ΑΣΚ 13b | <i>Pseudomonas</i> | | |
| ΑΣΚ 43 | <i>Pseudomonas</i> | | |
| ΑΣΚ 44a | <i>Pseudomonas</i> | | |
| ΑΣΚ 47a | <i>Pseudomonas</i> | | |
| ΑΣΚ 48b | <i>Pseudomonas</i> EU333882.1 GI:164504840 | 99% | 832 |
| ΑΣΚ 51b | <i>Pseudomonas</i> FJ169986.1 GI:206585036 | 99% | 915 |
| ΚΠ 6a | <i>Rheinheimera aquimaris</i> HM596592.1 GI:301790827 | 99% | 768 |

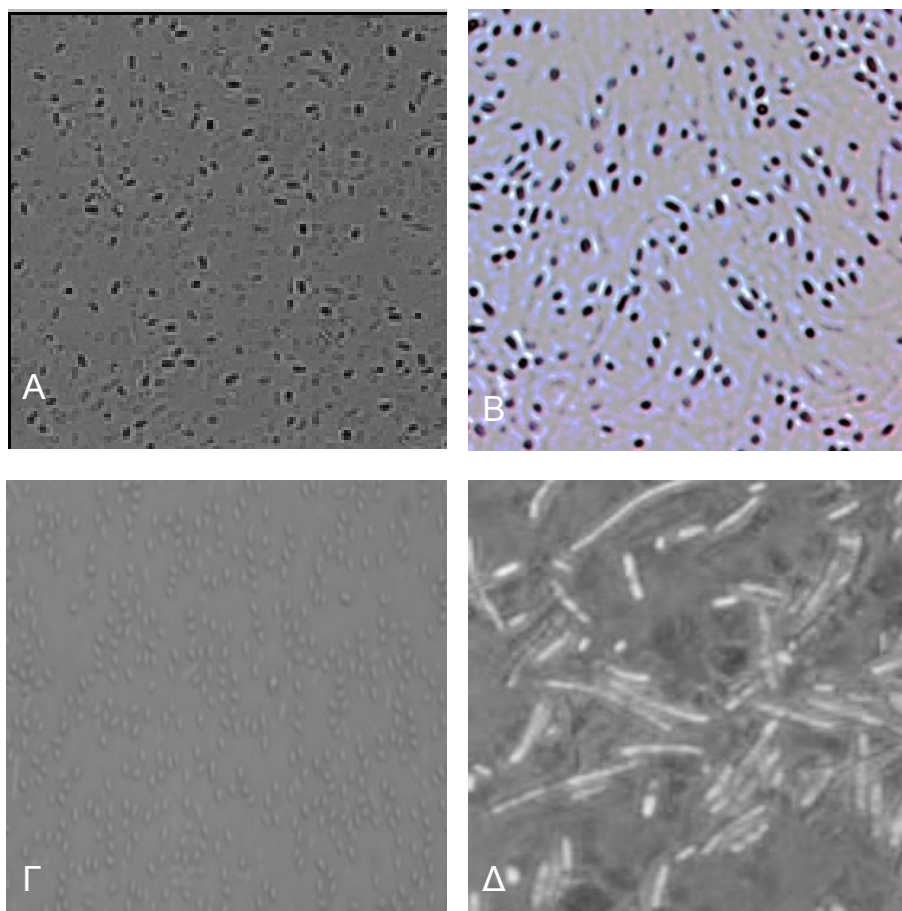
| | | | |
|---------|---|-----|-----|
| ΑΣΘ 12 | <i>Thalassospira</i> AB548215.1 GI:290349755 | 94% | 922 |
| ΑΣΘ 21a | <i>Stappia</i> JF899875.1 GI:335893105 | | |

Συνέχεια του Πίνακα 3.8

| | | | |
|---------|---|-----|-----|
| ΑΣΘ 21b | <i>Stappia</i> | | |
| ΑΣΘ 9a | <i>Stappia</i> AB680962.1 GI:359804240 | 77% | 684 |
| ΚΠ 8 | <i>Stenotrophomonas</i> FJ655828.1 GI:222083978 | 99% | 612 |
| ΑΣΘ 10a | <i>Thalassospira</i> AB548215.1 GI:290349755 | 99% | 911 |
| ΑΣΘ 11 | <i>Thalassospira</i> JX513398.1 GI:410095827 | 99% | 903 |
| ΑΣΘ 2a | <i>Thalassospira</i> JQ253999.1 GI:363542381 | | |
| ΑΣΘ 7a | <i>Thalassospira</i> AB548215.1 GI:290349755 | 93% | 834 |
| ΑΣΚ 31a | <i>Thalassospira</i> | | |
| ΑΣΚ 48c | <i>Thalassospira</i> AB636137.1 GI:381214086 | 99% | 774 |
| ΑΣΘ 17 | <i>Thalassospira profundimaris</i> HQ425693.2 GI:318054047 | 99% | 841 |
| ΑΣΘ 19 | <i>Thalassospira profundimaris</i> AB548215.1 GI:290349755 | 97% | 992 |
| ΑΣΘ14 | <i>Thalassospira profundimaris</i> HQ425693.2 GI:318054047 | 99% | 996 |
| ΑΣΚ 70b | <i>uncultured Limnobacter</i> JF703581.1 GI:333034787 | 99% | 985 |

Τα περισσότερα από τα ταχύτερα αυξανόμενα αρνητικά κατά Gram στελέχη βρέθηκαν να ανήκουν στα γένη *Pseudomonas sp*, *Thalassospira sp*, *Nitratireductor sp*, *Stappia sp*, και *Photorhabdus sp*. και τα είδη *Photorhabdus luminescens* και *Thalassospira profundimaris*.

Τα περισσότερα βακτήρια που απόμονώθηκαν από την θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου (ΑΣΘ) ανήκουν στα γένη *Thalassospira sp* και *Nitratireductor sp*. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου ανήκουν στα γένη *Thalassospira sp* και *Pseudomonas sp*. Δεν ταυτοποιήθηκαν πολλά βακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων (ΚΠ) γιατί δεν ενισχυόταν ικανά το κομμάτι του 16S γονιδίου.



Εικόνα 3.9 Ενδεικτικές φωτογραφίες σε μεγέθυνση 100x των απομονωθέντων στελεχών Α: *Thalassospira sp*, Β: *Pseudomonas sp*, Γ: *Nitratireductor sp*, Δ: *Photorhabdus sp*

3.4.1.3 Βακτήρια που απομονώθηκαν από τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου

Τα βακτηρια που απομονώθηκαν από τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου εμφάνισαν το πιο χαμηλό μέσο όρο ξηρής βιομάζας αλλά ένα αρκετά καλό ποσοστό

βιοαποικοδόμησης υδρογονανθράκων. Στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζεται διαγραμματικά η ξηρή βιομάζα (g/l) και το ποσοστό βιοαποικοδόμησης όλων των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την θαλάσσια περιοχή του Ασπρόπυργου. Σε όλα σχεδόν παρατηρήθηκε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης πάνω από 40%. Η ξηρή βιομάζα αν και είναι χαμηλή σε κανένα δεν είναι μηδενική.

Τα στελέχη που εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης και ξηρής βιομάζας είναι το *Thalassospira profundamaris* ΑΣΘ19, *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5, *Thalassospira sp*ΑΣΘ62Τα και *Nitratireductor sp* ΑΣΘ8b. Τα 10 καλύτερα βακτηριακά στελέχη με το μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης φαίνονται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9: Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή της θάλασσας του Ασπροπύργου, που παρουσίαζαν τα υψηλότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης

| Βακτήρια | Ποσοστό βιοαποικοδόμησης% |
|------------------------------------|---------------------------|
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 8b | 50,20 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 1 | 51,26 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 12 | 52,56 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 2a | 56,03 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 19 | 66,32 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 24bb | 66,32 |

Επίσης έγινε έλεγχος των ταχύτερων βακτηρίων, που βιοαποικοδομούν αργό πετρέλαιο, ως προς την παρουσία του μονοπατιού αποικοδόμησης των αλκανίων για την ύπαρξη ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης (Πίνακας 3.10). Στα περισσότερα βακτήρια ανιχνεύτηκαν ομόλογα του γονιδίου *alkB*. Σημαντικό είναι ότι πολλά από αυτά παρουσίασαν τρία ή και τέσσερα ομόλογα γονίδια του *alkB* όπως τα βακτήρια *Nitratireductor sp* ΑΣΘ1.

Τα βακτηριακά στελέχη της περιοχής του Ασπροπύργου, *Nitratireductor sp*.-ΑΣΘ8b, *Nitratireductor sp* -ΑΣΘ5 και *Thalassospira profundamaris*-ΑΣΘ19 παρουσίασαν υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης, ξηρής βιομάζας και παρουσία τουλάχιστον 2 ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης *alkB*.

Πίνακας 3.10 ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης που ανιχνεύτηκαν στα βακτήρια της θάλασσας του Ασπροπύργου τα οποία εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης

| Βακτήρια | Ομόλογο γονίδιο <i>alkB</i> |
|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 1 | <i>alkB2</i> /B4 |

| | |
|------------------------------------|---------------|
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 12 | alkB4 /B1 /B3 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 17 | alkB2 /B3 /B4 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 19 | alkB4 /B2 |
| <i>Photorhabdus sp</i> ΑΣΘ 24a | alkB1 /B3 /B4 |
| <i>Photorhabdus sp</i> ΑΣΘ 24ab | alkB1 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 24b | alkB1 /B2 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 24bb | alkB1 /B2 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ 2a | alkB2 /B3 /B4 |
| ΑΣΘ 4 | alkB4 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 5 | alkB3 /B4 |
| ΑΣΘ 62Ta | alkB1 /B2 /B4 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΘ 8b | alkB4 /B2 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΘ14 | alkB4 |

Πιο αναλυτικά σύμφωνα με την Εικόνα 3.29 και το Πίνακα 3.10:

Το στέλεχος *Thalassospira sp* ΑΣΘ19 παρουσίαζε υψηλή βιομάζα (1,42 g/l) και ποσοστό βιοαποικοδόμησης (66,3%) αλλά δεν ανιχνεύτηκαν γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης.

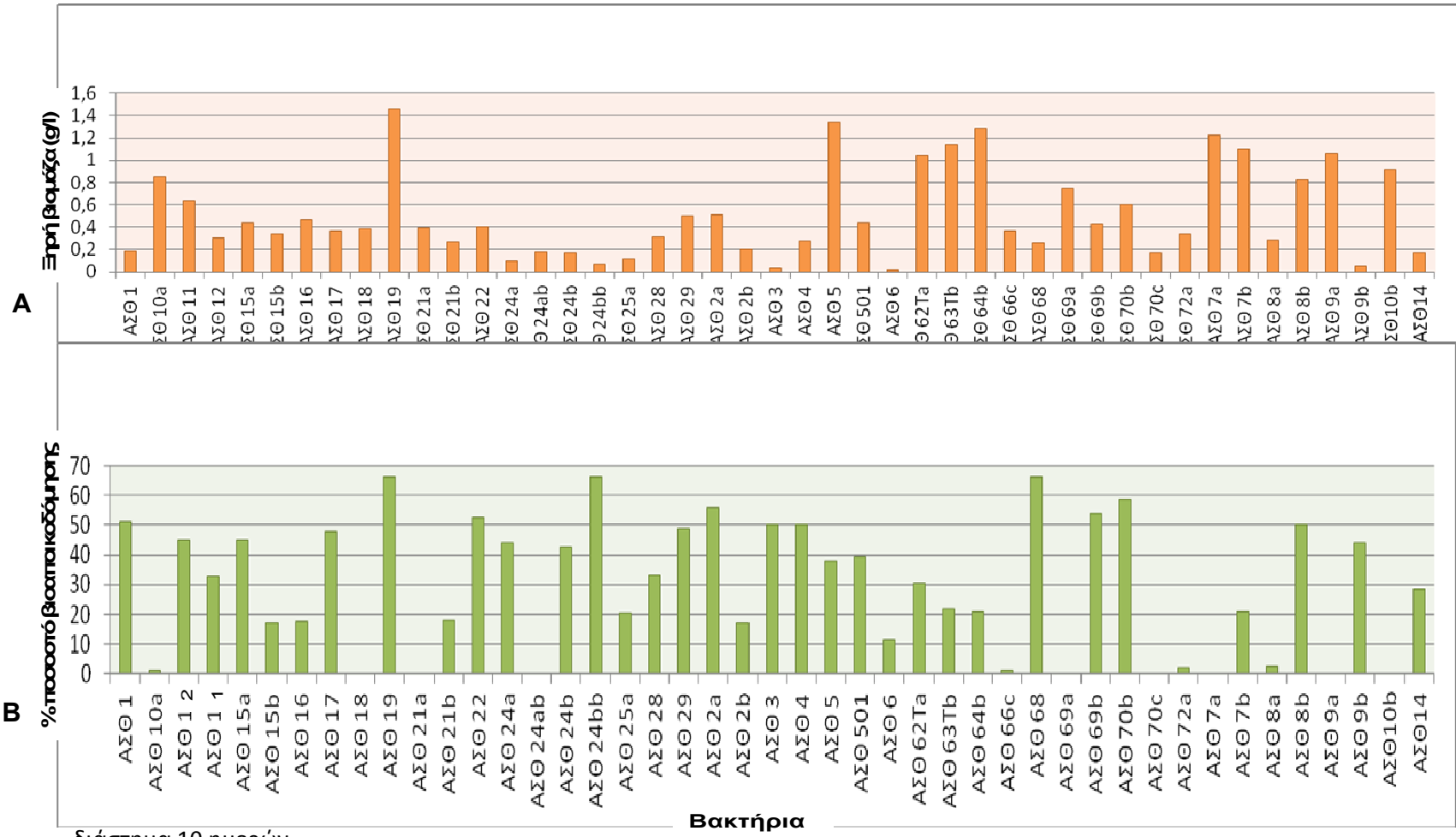
Το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 παρουσίαζε πολύ υψηλή ξηρή βιομάζα (1,38 g/l) και ποσοστό βιοαποικοδόμησης περίπου 40% και την ανίχνευση 2 ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης. Επίσης φαινοτυπικά υπάρχει μεγάλη μείωση της διασποράς του πετρελαίου σύμφωνα με την Εικόνα 3.11 Α.

Το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ24bb εμφάνιζε μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης και τον σχηματισμό συσσωμάτων σύμφωνα με την Εικόνα 3.19 Β και την ύπαρξη 2 ομόλογων του γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης, αλλά έχει πολύ μικρή ξηρή βιομάζα (περίπου 0,1 g/l)

Το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ8b εμφάνιζε καλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα (50,2%) και ξηρή βιομάζα (0,8 g/l). Φαινοτυπικά σχημάτιζε συσσωματώματα (Εικόνα 3.17 Α) ενώ ανιχνεύτηκαν παράλληλα δύο ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης.

Το στέλεχος *Thalassospira sp* ΑΣΘ12 παρουσίαζε μια καλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα κοντά στο 50%, πολύ μικρή ξηρή βιομάζα (περίπου 0,4 g/l) και φαινοτυπικά

μεγάλη μείωση της διασποράς του πετρελαίου όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.11 Γ. Επίσης ανιχνεύτηκαν τρία ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης.



ων που
αι επώαστηκαν για

διάστημα 10 ημερών

3.4.1.4 Βακτήρια της λίμνης Κουμουνδούρου

Τα βακτηρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου καλλιεργήθηκαν για δέκα ημερες σε κλειστές καλλιέργειες νε προσθήκη 5% αργό πετρέλαιο. Εμφάνιζαν σχεδόν όλα μια καλή ανάπτυξη (καλές τιμές ξηρής βιομάζας) στο αργό πετρέλαιο αλλά όχι αρκετά καλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης. Τα βακτηριακά στελέχη που παρουσίαζαν ποσοστό βιοαποικοδόμησης πάνω από 40% φαίνονται στον Πίνακα 3.11. Τα καλύτερα βακτηριακά στελέχη που εμφάνιζαν τις υψηλότερες τιμές ξηρής μάζας και βιοαποικοδόμησης (Εικόνα 3.30) είναι τα *Pseudomonas sp.* ΑΣΚ13b, *Thalassospira sp.* ΑΣΚ31a, *Nitratireductor sp* ΑΣΚ48a και *Pseudomonas s-* ΑΣΚ47a.

Πίνακας 3.11: Τα βακτήρια με τα υψηλότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης από την περιοχή της λίμνης Κουμουνδούρου

| Βακτήρια | Ποσοστό βιοαποικοδόμησης% |
|-----------------------------------|---------------------------|
| ΑΣΚ 26 | 42,98 |
| ΑΣΚ 47b | 47,13 |
| <i>Nitratireductor sp</i> ΑΣΚ 48a | 49,33 |
| <i>Pseudomonas sp</i> ΑΣΚ 47a | 49,85 |
| <i>Thalassospira sp</i> ΑΣΚ 31a | 52,84 |
| <i>Pseudomonas sp</i> ΑΣΚ 13b | 64,45 |

Τα ταχύτερα βακτηριακά στελέχη βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου ελέγχθησαν για την παρουσία ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.12 κάποια έχουν τουλάχιστον ένα ομόλογο γονίδιο, το *Pseudomonas sp* ΑΣΚ 47a έχει δύο ομόλογα ενώ στα υπόλοιπα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου δεν ανιχνεύτηκαν ομόλογα του γονιδίου *alkB*.

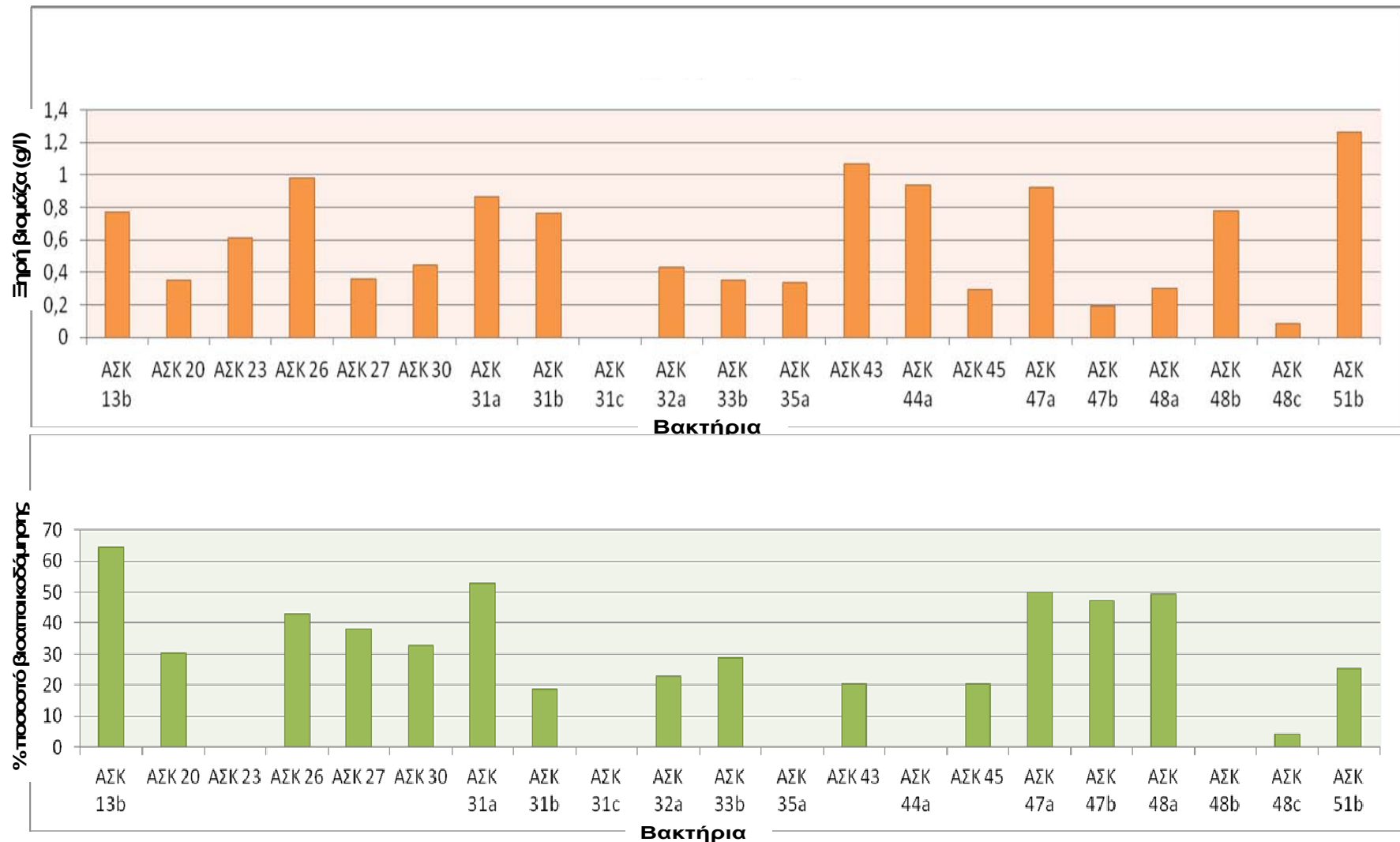
Πίνακας 3.12: Ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης που ανιχνεύτηκαν στα βακτήρια της λίμνης Κουμουνδούρου τα οποία εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης

| Βακτήρια | Ομόλογο γονιδίου <i>alkB</i> |
|-------------------------------|------------------------------|
| <i>Pseudomonas sp</i> ΑΣΚ 47a | <i>alkB2/B3</i> |
| <i>Pseudomonas sp</i> ΑΣΚ 44a | <i>alkB2</i> |

| | |
|-----------------------------------|-------|
| <i>Nitratireductor</i> sp ΑΣΚ 48a | alkB4 |
|-----------------------------------|-------|

Πιο αναλυτικά σύμφωνα με την Εικόνα 3.30, το στέλεχος *Pseudomonas* sp ΑΣΚ13b παρουσίαζε ένα υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης (περίπου 60%) και ξηρής βιομάζας (περίπου 0,8 g/l) αλλά δεν ανιχνεύτηκαν ομόλογα της αλκανικής μονοξυγενάσης. Το βακτήριο ΑΣΘ 26 και *Thalassospira* sp ΑΣΚ 31a εμφάνισαν καλή ξηρή βιομάζα (περίπου 0,9 g/l) και καλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης (περίπου 45%) αλλά δεν ανιχνεύτηκαν ομόλογα του γονιδίου alkB ούτε παρουσίασαν ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Τα βακτηριακά στελέχη της λίμνης Κουμουνδούρου, *Pseudomonas* sp ΑΣΚ47a και *Nitratireductor* sp ΑΣΚ48a παρουσίασαν υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης. Το στέλεχος *Pseudomonas* sp ΑΣΚ47a είχε 50% βιοαποικοδόμηση και περίπου 1 g/l ξηρή βιομάζα, ενώ φαινοτυπικά παρουσίασε μεγάλη μείωση της διασποράς πετρελαίου (Εικόνα 3.10 Β) και ανιχνεύτηκε η παρουσία έως και 2 ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης alkB. Το στέλεχος *Nitratireductor* sp ΑΣΚ48a είχε 50% βιοαποικοδόμηση και φαινοτυπικά σύμφωνα με την Εικόνα 3.25 Γ, είχαμε την έκλυση επιφανειοδραστικών παραγόντων.



Εικόνα 3.30: Διάγραμμα απεικόνισης **A:** της ξηρής βιομάζας (g/l) και **B:** του ποσοστού βιοαποικοδόμησης του πετρελαίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου (ΑΣΚ). Οι υγρές κλειστές καλλιέργειες περιείχαν προσθήκη 5% αργού πετρελαίου και επώαστηκαν για διάστημα 10 ημερών

3.4.1.5 Βακτηρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων

Τα βακτηρια που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων της λίμνης Κουμουνδούρου εμφάνιζαν όλα πολύ καλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα στο αργό πετρέλαιο με αρκετά μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης (Εικόνα 3.31) αλλά όχι καλές τιμές ξηρής βιομάζας (Εικόνα 3.31). Τα βακτηρια που εμφανιζαν ταυτόχρονα υψηλές τιμές ξηρής βιομάζας και βιοαποικοδόμησης είναι τα ΚΠ12α, ΚΠ14b, ΚΠ15d, ΚΠ4. Τα βακτηρια ελέγχθησαν ως προς την ύπαρξη του γονιδίου αλκανική μονοξυγενάση (alkB) και κανένα από αυτά δεν έδωσε θετική αντίδραση

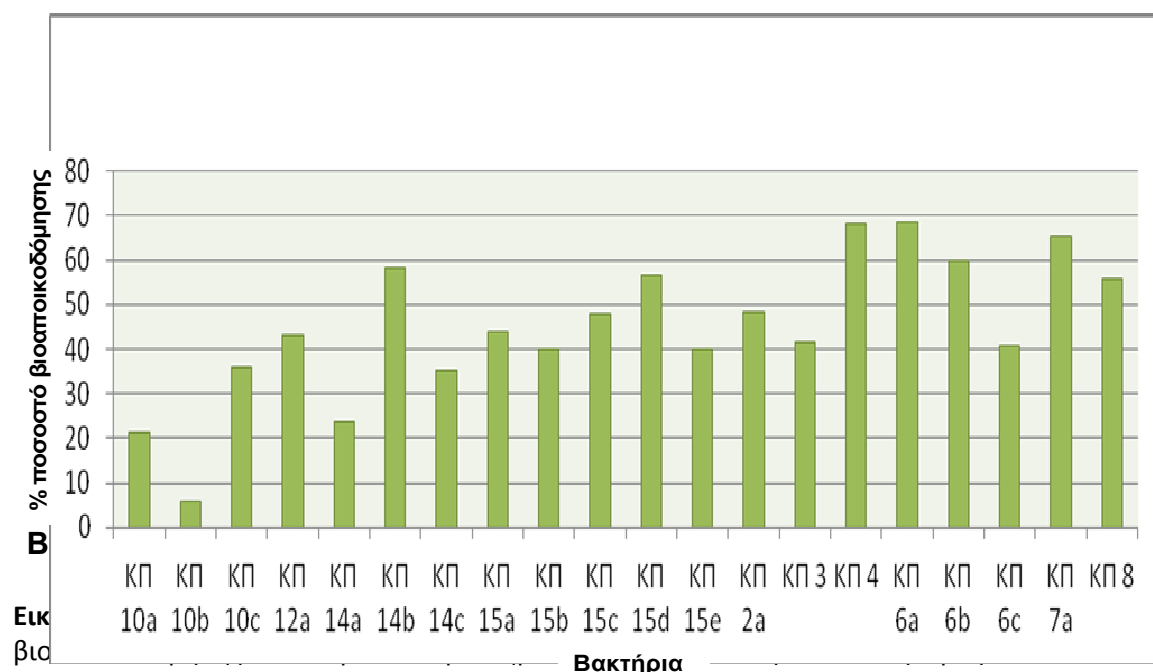
Τα βακτήρια που παρουσίασαν την καλύτερη βιοαποικοδόμηση καταγράφονται στον Πίνακα 3.13. Παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια ΚΠ4 και ΚΠ6α παρουσίασαν περίπου 68% βιοαποικοδόμηση και το ΚΠ4 είχε έκλυση επιφανειοδραστικών παραγόντων (Εικόνα 3.27 Α).

Πίνακας 3.13: Τα βακτήρια με τα υψηλότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων της λίμνης Κουμουνδούρου

| Βακτήρια | Ποσοστό βιοαποικοδόμησης% |
|----------|---------------------------|
| ΚΠ 8 | 55,86 |
| ΚΠ 15d | 56,73 |
| ΚΠ 14b | 58,21 |
| ΚΠ 6b | 60 |
| ΚΠ 7a | 65,58 |
| ΚΠ 4 | 68,15 |
| ΚΠ 6a | 68,57 |

Όλα σχεδόν τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων εμφάνισαν υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης (Εικόνα 3.31) αλλά σε κανένα δεν ανιχνεύτηκε το γονίδιο της αλκανικής μονοξυγενάσης και πιθανά να εμπλέκονται σε άλλες βιοαποικοδομητικές πορείες πέρα από αυτή της βιοαποικοδόμησης των αλκανίων. Επίσης δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση των περισσότερων βακτηρίων που απομονώθηκαν οπότε πιθανά η μη επιτυχής ανίχνευση των γονιδίων alkB και 16S να συνδέονται μεταξύ τους.

A



Β
Εικ
βιο

Κουμουνδούρου στην περιοχή εκροής πετρελαϊκών απορλήτων (ΚΠ). Οι υγρές κλειστές καλλιέργειες περιείχαν 5% αργό πετρέλαιο και επώαστηκαν για 10 ημέρες

3.4.3 Ρυθμός βιοαποικοδόμησης σε αξενικές καλλιέργειες απομονωθέντων βακτηρίων

Τρία βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν για 10 ημέρες σε διάλυμα που περιείχε Walne Medium με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.4. Στην συνέχεια έγινε ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο - φασματογράφο μάζας ανά τακτά χρονικά διαστήματα (0, 2, 6, 8 και 10 ημέρες) από κάθε επιλεγμένη καλλιέργεια.

Η επιλογή των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αξενικές καλλιέργειες ήταν 2 βακτηριακά στελέχη από την θάλασσα του Ασπροπύργου:

- ΑΣΘ5: πολύ καλή ανάπτυξη και βιοαποικοδόμηση / ομόλογα του γονιδίου *alkB* / γένος *Nitratireductor sp.*
- ΑΣΘ12: χαμηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης / πολλά ομόλογα του γονιδίου *alkB* / γένος *Thalassospira sp.*

Ένα βακτήριο από τη λίμνη Κουμουνδούρου :

- ΑΣΚ47α: πολύ καλή ανάπτυξη / πολλά ομόλογα του γονιδίου alkB/ γένος *Pseudomonas sp.*

Στους Πίνακες 3.14/ 3.15/ 3.16 εμφανίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων αλκανίων προς οπάνια όπως μετρήθηκαν μετά από ανάλυση χρωματογραφίας GC-MS για τις καλλιέργειες *Nitratireductor sp* -ΑΣΘ5, *Thalassospira sp* -ΑΣΘ12 και *Pseudomonas sp* -ΑΣΚ47α

Πίνακας 3.14: Αποτελέσματα ανάλυσης GC-MS για το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5

| Αλκάνια | ΑΣΘ5_ t=0 | ΑΣΚΘ5 t=2 | ΑΣΘ5 t=6 | ΑΣΘ5 t=8 | ΑΣΘ5 t=10 |
|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| C11/Op1 | 10,4 | 8,2 | 6,3 | 1,3 | 0,9 |
| C12/Op1 | 12,9 | 9,65 | 8,5 | 2,55 | 1,7 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.14

| | | | | | |
|--------------|------|-------|------|------|-----|
| C13/Op1 | 14,6 | 10,3 | 6,3 | 4,25 | 3,8 |
| C14/Op1 | 14,1 | 10,95 | 10,7 | 5,85 | 5,7 |
| C15/Op1 | 14 | 11,35 | 11,2 | 7,3 | 7,3 |
| C16/Op1 | 13,2 | 11,1 | 10,8 | 7,5 | 7,4 |
| C17/Op1 | 12,1 | 10,55 | 10,5 | 7,4 | 7,2 |
| Pristane/Op1 | 7,6 | 7,1 | 7,4 | 4,95 | 4,9 |
| C18/Op1 | 11,1 | 9,5 | 9,4 | 6,8 | 6,7 |
| Phytane/Op1 | 8,5 | 7,7 | 7,55 | 5,3 | 5,1 |
| C19/Op1 | 10 | 8,95 | 8,75 | 6,2 | 6,1 |
| C20/Op1 | 9,3 | 8,15 | 8,1 | 5,95 | 5,9 |
| C21/Op1 | 8,3 | 7,6 | 7,8 | 6,05 | 5,8 |
| C22/Op1 | 7,6 | 7,2 | 7,4 | 5,5 | 5,4 |
| C23/Op1 | 6,4 | 6 | 6,15 | 4,5 | 4,4 |
| C24/Op1 | 6 | 5,85 | 5,95 | 4,45 | 4,3 |
| C25/Op1 | 5,2 | 4,95 | 4,9 | 3,7 | 3,6 |

| | | | | | |
|---------|-----|------|------|-----|-----|
| C26/Op1 | 4,9 | 4,3 | 4,2 | 3,2 | 3,2 |
| C27/Op1 | 4 | 3,25 | 3,35 | 2,5 | 2,4 |
| C28/Op1 | 3,5 | 2,95 | 3,05 | 2,2 | 2,1 |
| C29/Op1 | 3 | 2,35 | 2,6 | 1,9 | 2 |
| C30/Op1 | 2,6 | 2,15 | 2,2 | 1,7 | 1,5 |
| C31/Op1 | 2,4 | 1,9 | 1,9 | 1,3 | 1,3 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.14

| | | | | | |
|---------|-----|------|------|------|-----|
| C32/Op1 | 1,9 | 1,6 | 1,65 | 1,2 | 1 |
| C33/Op1 | 1,5 | 1,25 | 1,25 | 0,95 | 0,9 |
| C34/Op1 | 1,6 | 1,05 | 0,95 | 0,65 | 0,7 |
| C35/Op1 | 1,4 | 0,95 | 1 | 0,6 | 0,6 |

Πίνακας 3.15: Αποτελέσματα ανάλυσης GC-MS για το στέλεχος *Thalassospira sp* -ΑΣΘ12

| Αλκάνιο | ABK_12 | ABK_12_ | ABK_12 | ABK_12 | ABK_12_ |
|--------------|--------|---------|--------|--------|---------|
| | t=0 | t=2 | t=6 | t=8 | t=10 |
| C11/Op1 | 10,4 | 8,35 | 5,55 | 1,3 | 0,7 |
| C12/Op1 | 12,9 | 9,85 | 7,55 | 2,65 | 1,5 |
| C13/Op1 | 14,6 | 10,55 | 9,15 | 4,35 | 3,2 |
| C14/Op1 | 14,1 | 11,2 | 9,55 | 5,95 | 5,1 |
| C15/Op1 | 14 | 11,6 | 9,95 | 7,4 | 6,3 |
| C16/Op1 | 13,2 | 11,35 | 9,95 | 7,65 | 6,5 |
| C17/Op1 | 12,1 | 10,75 | 9,35 | 7,55 | 6,5 |
| Pristane/Op1 | 7,6 | 7,25 | 6,55 | 5 | 4,2 |
| C18/Op1 | 11,1 | 9,7 | 8,55 | 6,95 | 5,8 |
| Phytane/Op1 | 8,5 | 7,8 | 6,7 | 5,45 | 4,9 |
| C19/Op1 | 10 | 9,15 | 7,75 | 6,35 | 5,5 |

| | | | | | |
|---------|-----|-----|------|-----|-----|
| C20/Op1 | 9,3 | 8,3 | 7,25 | 6,1 | 5,1 |
|---------|-----|-----|------|-----|-----|

Συνέχεια του Πίνακα 3.15

| | | | | | |
|---------|-----|------|------|------|-----|
| C21/Op1 | 8,3 | 7,8 | 6,95 | 6,15 | 5 |
| C22/Op1 | 7,6 | 7,35 | 6,6 | 5,55 | 4,6 |
| C23/Op1 | 6,4 | 6,15 | 5,45 | 4,6 | 3,9 |
| C24/Op1 | 6 | 6 | 5,35 | 4,45 | 3,7 |
| C25/Op1 | 5,2 | 5,05 | 4,4 | 3,75 | 3,1 |
| C26/Op1 | 4,9 | 4,35 | 3,75 | 3,2 | 2,7 |
| C27/Op1 | 4 | 3,3 | 3 | 2,55 | 2,1 |
| C28/Op1 | 3,5 | 3 | 2,75 | 2,25 | 1,8 |
| C29/Op1 | 3 | 2,6 | 2,3 | 1,95 | 1,7 |
| C30/Op1 | 2,6 | 2,2 | 1,95 | 1,7 | 1,3 |
| C31/Op1 | 2,4 | 1,9 | 1,65 | 1,35 | 1,1 |
| C32/Op1 | 1,9 | 1,65 | 1,45 | 1,15 | 0,9 |
| C33/Op1 | 1,5 | 1,25 | 1,15 | 0,95 | 0,8 |
| C34/Op1 | 1,6 | 1,05 | 0,85 | 0,65 | 0,6 |
| C35/Op1 | 1,4 | 0,95 | 0,85 | 0,65 | 0,5 |

Πίνακας 3.16: Αποτελέσματα ανάλυσης GC-MS για το στέλεχος *Pseudomonas sp* -ΑΣΚ47α.

| Αλκάνιο | ΑΣΚ47_a_ | ΑΣΚ_47_a | ΑΣΚ_47_a | ΑΣΚ_47_a_ | ΑΣΚ_47_a |
|---------|----------|----------|----------|-----------|----------|
| | t=0 | t=2 | t=6 | t=8 | t=10 |
| C11/Op1 | 10,4 | 8,1 | 6,65 | 1,75 | 1,4 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.16

| | | | | | |
|---------|------|------|-----|---|-----|
| C12/Op1 | 12,9 | 9,95 | 8,1 | 4 | 3,6 |
|---------|------|------|-----|---|-----|

| | | | | | |
|--------------|------|-------|-------|------|-----|
| C13/Op1 | 14,6 | 10,85 | 9,2 | 5,9 | 5,5 |
| C14/Op1 | 14,1 | 11,35 | 10 | 6,9 | 6,4 |
| C15/Op1 | 14 | 11,75 | 10,6 | 7,85 | 7,5 |
| C16/Op1 | 13,2 | 11,35 | 10,55 | 7,7 | 7,6 |
| C17/Op1 | 12,1 | 10,65 | 10,35 | 7,15 | 7,1 |
| Pristane/Op1 | 7,6 | 7,35 | 6,85 | 5,25 | 5,2 |
| C18/Op1 | 11,1 | 9,55 | 9,25 | 6,75 | 6,6 |
| Phytane/Op1 | 8,5 | 7,4 | 7,3 | 5,85 | 5,6 |
| C19/Op1 | 10 | 8,8 | 8,65 | 6,4 | 5,7 |
| C20/Op1 | 9,3 | 8 | 7,85 | 5,9 | 5,8 |
| C21/Op1 | 8,3 | 7,7 | 7,85 | 5,7 | 5,5 |
| C22/Op1 | 7,6 | 7,05 | 7 | 5 | 4,8 |
| C23/Op1 | 6,4 | 6,1 | 6,75 | 4,5 | 4,2 |
| C24/Op1 | 6 | 5,75 | 5 | 4,2 | 3,9 |
| C25/Op1 | 5,2 | 4,9 | 4,8 | 3,55 | 3,7 |
| C26/Op1 | 4,9 | 4,2 | 5,8 | 3 | 2,9 |
| C27/Op1 | 4 | 3,3 | 4,9 | 2,4 | 2,3 |
| C28/Op1 | 3,5 | 2,9 | 3,05 | 2,1 | 2,1 |
| C29/Op1 | 3 | 2,6 | 2,55 | 1,9 | 1,9 |
| C30/Op1 | 2,6 | 2,35 | 2,3 | 1,5 | 1,5 |

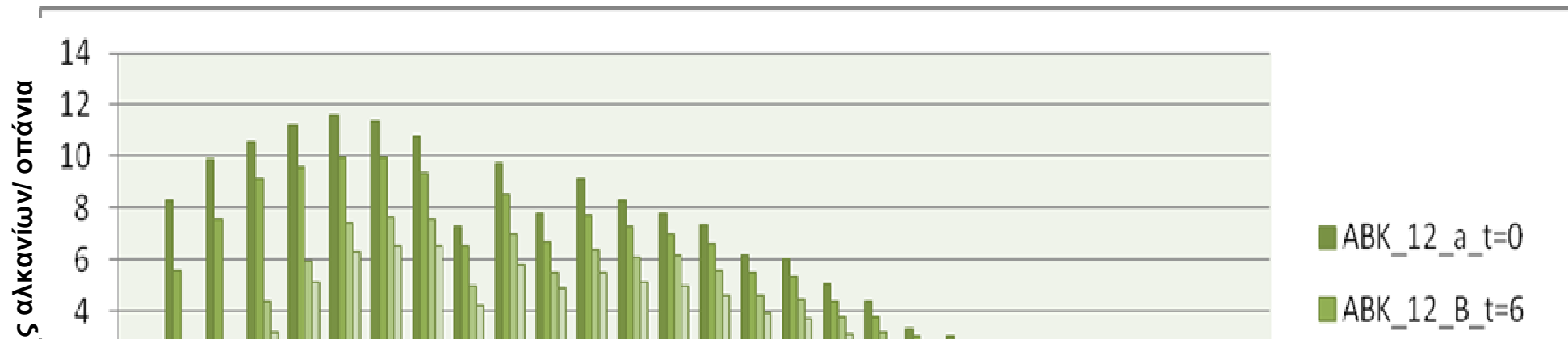
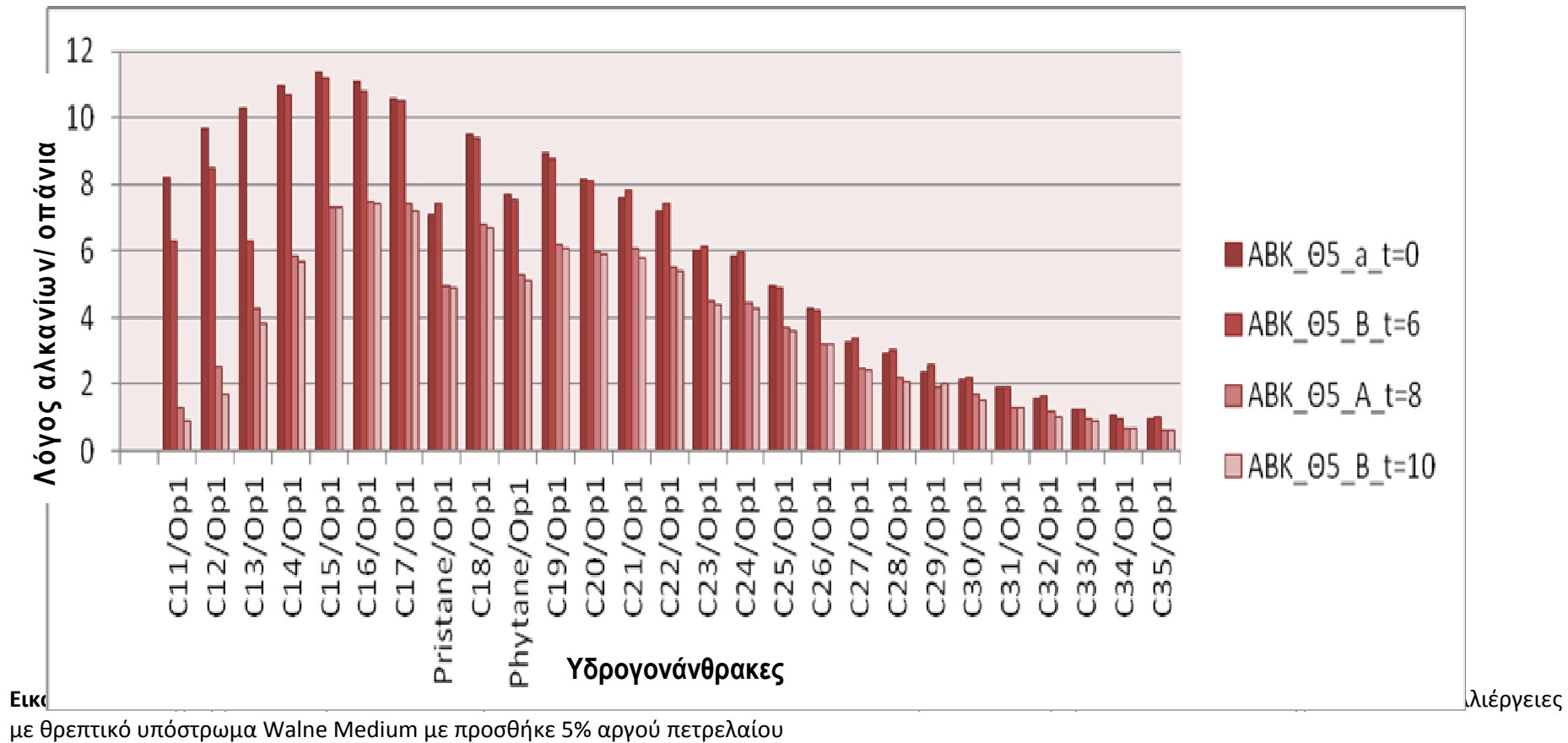
Συνέχεια του Πίνακα 3.16

| | | | | | |
|---------|-----|------|------|------|-----|
| C31/Op1 | 2,4 | 1,9 | 2 | 1,4 | 1,4 |
| C32/Op1 | 1,9 | 1,55 | 1,55 | 1,2 | 1,1 |
| C33/Op1 | 1,5 | 1,25 | 1,25 | 0,95 | 0,9 |
| C34/Op1 | 1,6 | 0,95 | 1 | 0,75 | 0,7 |
| C35/Op1 | 1,4 | 1,05 | 1,55 | 0,6 | 0,4 |

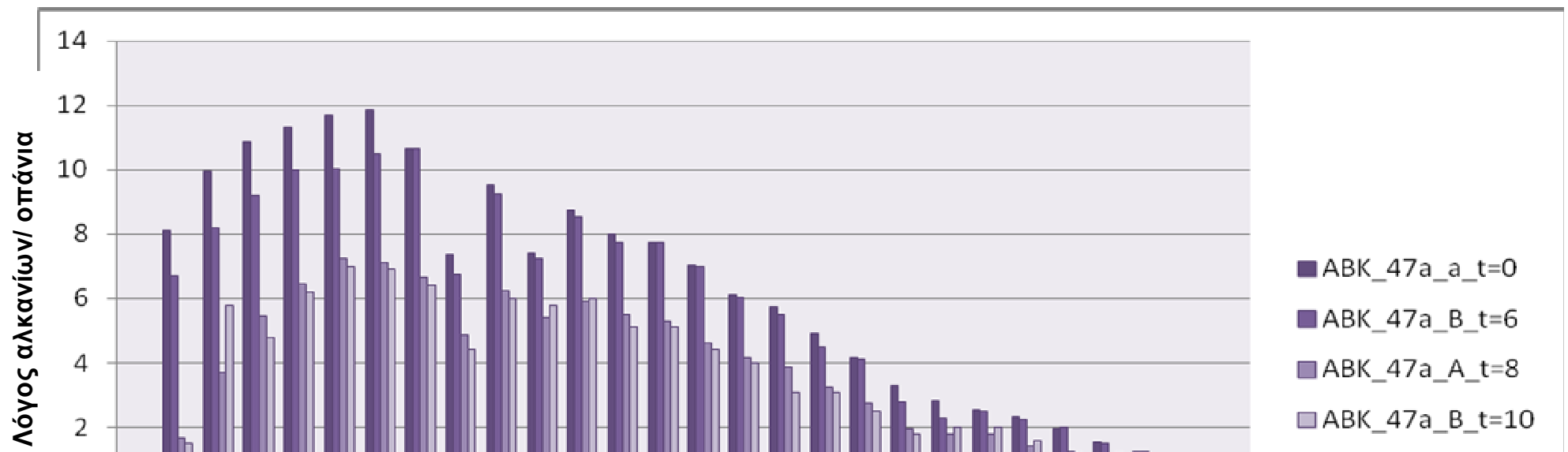
Οι τιμές του λόγου της συγκέντρωσης αλκανίων/ οπάνια ανά 0, 6, 8, 10 ημέρες για κάθε στέλεχος ξεχωριστά απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα για να είναι πιο εύκολη η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στις Εικόνες 3.32, 3.33, 3.34 παρουσιάζεται διαγραμματικά η συγκέντρωση των υδρογονανθράκων για κάθε στέλεχος στις 0, 6, 8 και 10 ημέρες. Σε όλα τα στελέχη παρατηρείται μια αρκετά μεγάλη μείωση από την έκτη στην όγδοη μέρα για τα αλκάνια μοριακού βάρους από έντεκα έως 26 άτομα άνθρακα.

Και τα τρία στελέχη αποικοδομούν σε μεγάλο ποσοστό τα μικρού μήκους αλυσίδας αλκάνια. Το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 εμφάνισε την μεγαλύτερη αποικοδόμηση στα αλκάνια μεγέθους C11-C21 (Εικόνα 3.32), ενώ το στέλεχος *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47a εμφάνισε την μεγαλύτερη αποικοδόμηση στα αλκάνια μεγέθους C21-C35 σύμφωνα με την Εικόνα 3.34.



Εικόνα 3.33: Διαγραμμα του λόγου αλκανίων προς οπάνια του στελέχους *Thalassospira sp* ΑΣΘ12, τις ημέρες 0, 6, 8 και 10 σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα Walne Medium με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου



Εικόνα 3.34: Διαγραμμα του λόγου αλκανίων προς σπάνια του στελέχους *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47α τις ημέρες 0, 6, 8 και 10 σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα Walne Medium με προσθήκη 5% αργού πετρελαίου

Στον Πίνακα 3.17 παρουσιάζεται συνοπτικά ο μέσος όρος αποικοδόμησης κάθε στελέχους. Τα τρία στελέχη που επιλέχθηκαν παρουσιάζουν αρκετά υψηλό βιοαποικοδόμησης μικρού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων. Παρατηρείται ότι το βακτηριακό στέλεχος *Nitratireductor sp.*-ΑΣΘ5 παρουσιάζει τα πιο υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης και σε μικρού μοριακού βάρους και σε μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλκάνια. Αυτό επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη του ομόλογου γονιδίου *alkB3* και *alkB4*.

Πίνακας 3.17 Μέσος όρος ποσοστού βιοαποικοδόμησης σε μικρού και μεγάλου μήκους αλκάνια των 3 επιλεγμένων στελεχών

| ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ | ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ% των αλκανίων C ₁₁ -C ₂₁ | ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ% των αλκανίων C ₂₂ -C ₃₅ |
|----------------------------------|--|--|
| <i>Nitratireductor sp.</i> -ΑΣΘ5 | 47 | 20 |
| <i>Thalassospira sp.</i> -ΑΣΘ12 | 45 | 27,7 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> -ΑΣΚ47a | 43 | 28,1 |

Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός του ρυθμού βιοαποικοδόμησης δηλαδή του χρόνου υποδιπλασιασμού της συγκέντρωσης των αλκανίων (Πίνακας 3.18) για τα τρία βακτηριακά στελέχη βάσει του τύπου που περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.2

Πίνακας 3.18 Υπολογισμός του χρόνου υποδιπλασιασμού (σε ημέρες) για κάθε αλκάνιο για τα στελέχη *Nitratireductor sp.* ΑΣΘ5, *Thalassospira sp.* ΑΣΘ12 και *Pseudomonas sp.* ΑΣΚ47a

| Αλκάνια | <i>Nitratireductor sp.</i> ΑΣΘ5/ $t_{1/2}$ | <i>Thalassospira sp.</i> ΑΣΘ12/ $t_{1/2}$ | <i>Pseudomonas sp.</i> ΑΣΚ47a/ $t_{1/2}$ |
|---------|--|---|--|
| C11/Op1 | 2,47 | 2,57 | 3,36 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.18

| | | | |
|---------|------|-------|-------|
| C12/Op1 | 3,28 | 3,33 | 5,33 |
| C13/Op1 | 4,02 | 4,78 | 7,14 |
| C14/Op1 | 6,7 | 6,93 | 8,88 |
| C15/Op1 | 10,6 | 9 | 11,18 |
| C16/Op1 | 11,9 | 10,19 | 12,37 |

| | | | |
|--------------|-------|-------|-------|
| C17/Op1 | 13,3 | 11,55 | 12,83 |
| Pristane/Op1 | 15,4 | 11,94 | 16,9 |
| C18/Op1 | 13,86 | 11,36 | 13,33 |
| Phytane/Op1 | 13,32 | 12,6 | 17,33 |
| C19/Op1 | 13,86 | 11,75 | 13,08 |
| C20/Op1 | 15,4 | 12,16 | 15,07 |
| C21/Op1 | 20,38 | 14,74 | 16,9 |
| C22/Op1 | 19,8 | 14,44 | 14,74 |
| C23/Op1 | 18,23 | 14,44 | 16,9 |
| C24/Op1 | 20,38 | 14,74 | 15,4 |
| C25/Op1 | 18,23 | 13,86 | 18,73 |
| C26/Op1 | 16,11 | 12,38 | 14,74 |
| C27/Op1 | 14,74 | 11,95 | 14,44 |
| C28/Op1 | 14,43 | 11,55 | 14,14 |
| C29/Op1 | 18,73 | 12,83 | 15,06 |
| C30/Op1 | 14,14 | 11,36 | 12,16 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.18

| | | | |
|---------|-------|-------|-------|
| C31/Op1 | 11,55 | 9,76 | 13,59 |
| C32/Op1 | 12,16 | 10,04 | 13,86 |
| C33/Op1 | 14,44 | 12,15 | 14,43 |
| C34/Op1 | 8,5 | 7,45 | 9,9 |
| C35/Op1 | 8,77 | 7,62 | 6,47 |

Τα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια έχουν μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού και μεγάλο ρυθμό αποικοδόμησης. Τα αλκάνια με 11 άτομα άνθρακα αποικοδομούνται σε 3 μέρες κατά μέσο όρο και από τα τρία στελέχη. Όσο αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας είναι πολύ πιο δύσκολο να βιοαποικοδομηθούν οι υδρογονάνθρακες και μεγαλώνει ο χρόνος υποδιπλασιασμού. Συνοπτικά παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.19 ο μέσος

όρος του χρόνου υποδιπλασιασμού για το κάθε στέλεχος στα μικρού μήκους αλκάνια (C11-C21) και στα μεγάλου μήκους αλκάνια (C22-C35).

Πίνακας 3.19 μέσος όρος του χρόνου υποδιπλασιασμού για το κάθε στέλεχος στα μικρού μήκους αλκάνια (C11-C21) και στα μεγάλου μήκους αλκάνια (C22-C35)

| Αλκάνια | ΑΣΘ5 | ΑΣΘ12 | ΑΣΚ47a |
|---------|-------|-------|--------|
| C11-C21 | 8,30 | 9,45 | 11,82 |
| C22-C35 | 15,01 | 11,75 | 13,89 |

Το στέλεχος *Nitratireductor sp.*-ΑΣΘ5 διασπά αρκετά γρήγορα τα μικρής αλυσίδας αλκάνια ενώ τα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας διασπούνται πιο αργά. Το στέλεχος *Thalassospira sp.*-ΑΣΘ12 αποικοδομεί αρκετά γρήγορα και τις δύο κατηγορίες αλκανίων ενώ το στέλεχος *Pseudomonas sp.*-ΑΣΘ47a διασπά καλύτερα τα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας αλκάνια.

3.4.4 Ανάπτυξη των απομονωθέντων βακτηρίων σε μικτές καλλιέργειες (consortia)

Οι ομάδες συστάθηκαν προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος της ποικιλομορφίας και ποικιλότητας του μικροβιακού πληθυσμού στην απόδοση της διαδικασίας βιοεξυγίανσης επιβαρυσμένων περιοχών, αλλά και να συγκριθεί η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα των στελεχών ανάλογα με την περιοχή προέλευσης και τα ταξινομικά τους χαρακτηριστικά.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις υγρές κλειστές καλλιέργειες των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών συστάθηκαν 3 ομάδες και αυξήθηκαν σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα 5% αργό πετρέλαιο (βλέπε παράγραφο 2.8.3)

Η ομάδα ΑΣ-1 περιελάμβανε 3 στελέχη που παρουσίαζαν μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης (*Thalassospira sp* ΑΣΘ12, *Pseudomonas sp* ΑΣΘ47b, *Rheinheimera aquimaris* ΚΠ6a). Η ομάδα ΑΣ-2 περιελάμβανε στελέχη με μεγάλο και μικρό ποσοστό βιοαποικοδόμησης (*Thalassospira profundimaris* ΑΣΘ19, *Nitratireductor* ΑΣΘ5, *Stenotrophomonas* ΚΠ8). Η ομάδα ΑΣ-3 περιελάμβανε 3 στελέχη με μικρότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (*Erythrobacter* ΑΣΘ15a, *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47a, *Rheinheimera sp* ΚΠ7a).

Όλες οι ομάδες είχαν αντιπροσωπευτικά στελέχη και από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας δηλαδή την θάλασσα του Ασπροπύργου (ΑΣΘ), τη λίμνη Κουμουνδούρου (ΑΣΚ) και την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων (ΚΠ).

Παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις ομάδες βακτηρίων παρουσίαζαν ένα υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης σε σχέση με το μάρτυρα (Εικόνα 3.35) που κυμαίνεται από 71,12% έως 78,75% σε μικρής ανθρακικής αλυσίδας αλκάνια. Στα μεγάλου μήκους αλκάνια το ποσοστό βιοαποικοδόμησης κυμαίνεται από 45,48% έως 60,9%.

Στον Πίνακα 3.20 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης GC-MS ως ο λόγος αλκανίων προς οπάνια και των τριών ομάδων (ΑΣ-1, ΑΣ-2 και ΑΣ-3) αλλά και του μάρτυρα (control) που δεν περιείχε βακτήρια.

Πίνακας 3.20 λόγος των συγκεντρώσεων αλκανίων προς οπάνια για τις ομάδες βακτηρίων και το δείγμα control μετά από ανάλυση GC-MS

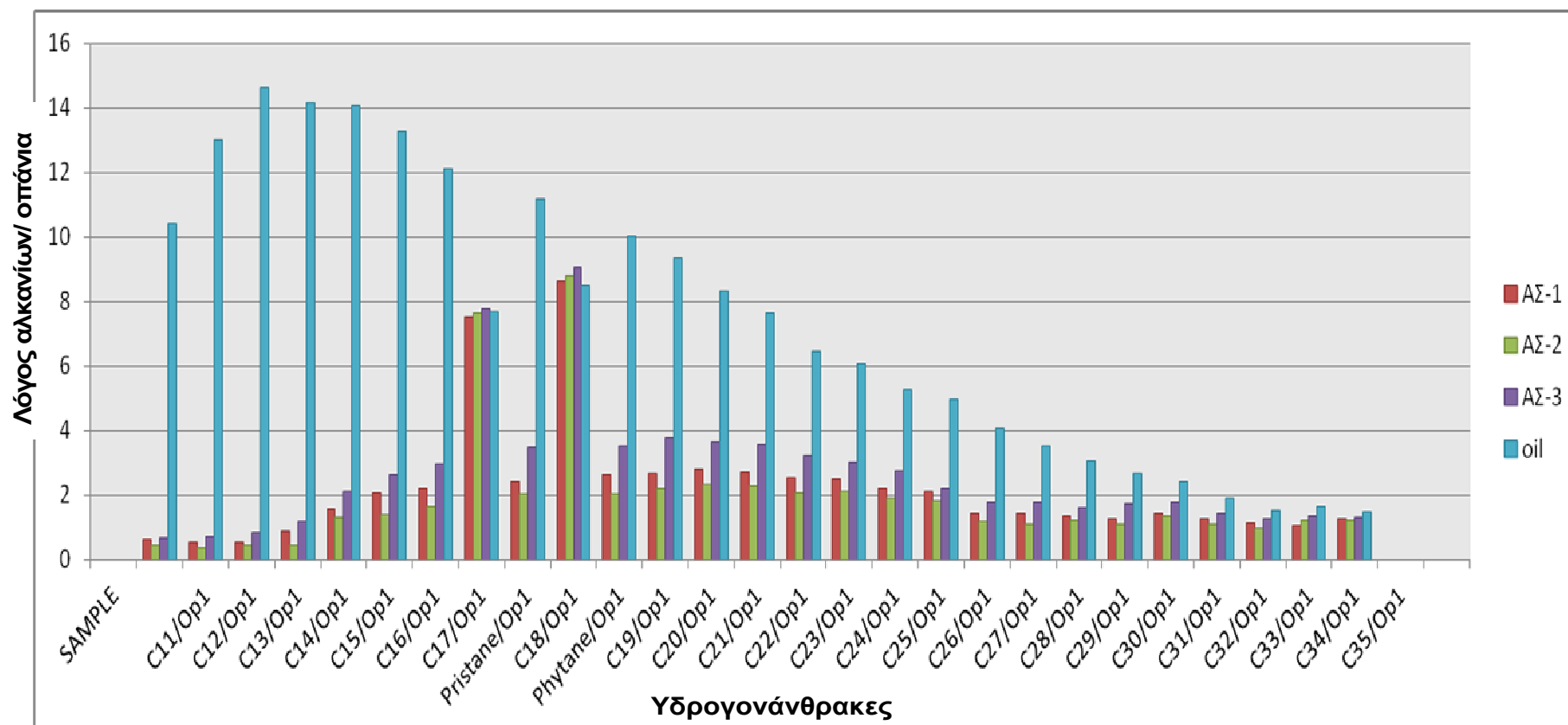
| Αλκάνια/οπάνιο | ΑΣ-1 | ΑΣ-2 | ΑΣ-3 | control |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| C11/Op1 | 0,64 | 0,46 | 0,69 | 10,42 |
| C12/Op1 | 0,53 | 0,36 | 0,73 | 12,99 |
| C13/Op1 | 0,54 | 0,46 | 0,82 | 14,61 |
| C14/Op1 | 0,88 | 0,48 | 1,18 | 14,15 |
| C15/Op1 | 1,57 | 1,32 | 2,12 | 14,07 |
| C16/Op1 | 2,08 | 1,41 | 2,63 | 13,25 |
| C17/Op1 | 2,21 | 1,65 | 2,98 | 12,12 |
| Pristane/Op1 | 7,53 | 7,63 | 7,77 | 7,69 |
| C18/Op1 | 2,40 | 2,05 | 3,48 | 11,18 |
| Phytane/Op1 | 8,64 | 8,81 | 9,05 | 8,50 |
| C19/Op1 | 2,64 | 2,04 | 3,51 | 10,04 |
| C20/Op1 | 2,67 | 2,19 | 3,76 | 9,35 |
| C21/Op1 | 2,79 | 2,32 | 3,64 | 8,34 |
| C22/Op1 | 2,73 | 2,29 | 3,57 | 7,66 |
| C23/Op1 | 2,54 | 2,07 | 3,23 | 6,46 |
| C24/Op1 | 2,50 | 2,12 | 3,03 | 6,06 |
| C25/Op1 | 2,19 | 1,89 | 2,76 | 5,26 |
| C26/Op1 | 2,10 | 1,80 | 2,20 | 4,99 |
| C27/Op1 | 1,46 | 1,16 | 1,79 | 4,07 |

Συνέχεια του Πίνακα 3.20

| | | | | |
|---------|------|------|------|------|
| C28/Op1 | 1,45 | 1,09 | 1,78 | 3,53 |
| C29/Op1 | 1,36 | 1,23 | 1,61 | 3,04 |
| C30/Op1 | 1,28 | 1,11 | 1,75 | 2,66 |
| C31/Op1 | 1,45 | 1,36 | 1,77 | 2,44 |
| C32/Op1 | 1,27 | 1,11 | 1,42 | 1,90 |
| C33/Op1 | 1,15 | 0,98 | 1,28 | 1,52 |
| C34/Op1 | 1,06 | 1,20 | 1,36 | 1,67 |
| C35/Op1 | 1,28 | 1,24 | 1,29 | 1,46 |

Για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν διάγραμμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.35 όπου παρουσιάζονται οι διαφορές του λόγου των συγκεντρώσεων αλκανίων προς οπάνια ανάμεσα στις ομάδες βακτηρίων και του μάρτυρα σε μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια. Επίσης υπολογίστηκε το ποσοστό (%) βιοαποικοδόμησης για κάθε ομάδα βακτηρίων στα μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια.

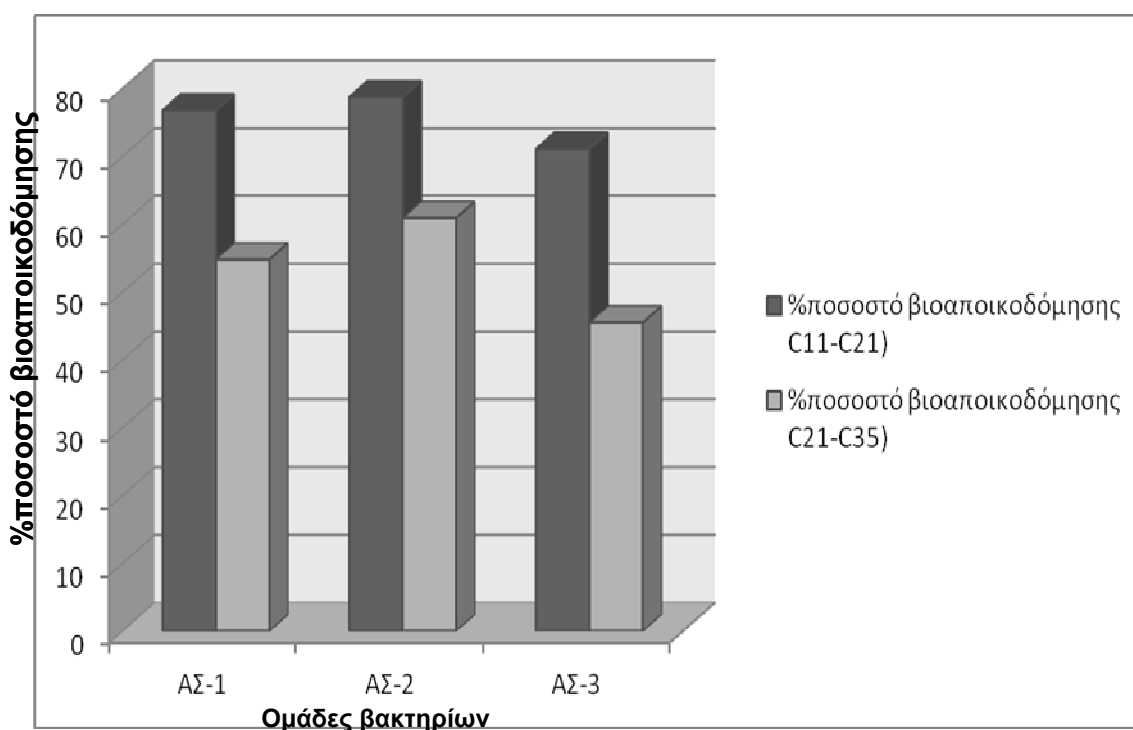
Το ΑΣ-1 παρουσίαζε 76,79% ποσοστό βιοαποικοδόμησης για αλκάνια αλυσίδας 11 έως 21 άτομα άνθρακα. Για αλκάνια 22 έως 35 άτομα άνθρακα παρουσίαζε χαμηλότερο ποσοστό που κυμαίνεται στο 54,79% (Πίνακας 3.21, Εικόνα 3.36). Το ΑΣ-2 το οποίο αποτελείται από βακτηριακά στελέχη που είχαν μεγάλο ρυθμό βιοαποικοδόμησης σε υγρές κλειστές καλλιέργειες αλλά όχι το υψηλότερο ρυθμό όπως στην ομάδα ΑΣ-1, είχε τα μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης και για μικρού και για μεγάλου μήκους αλκάνια. Το ποσοστό βιοαποικοδόμησης για αλκάνια αλυσίδας 11 έως 21 άτομα άνθρακα είναι 78,75% και για αλκάνια 22 έως 35 άτομα άνθρακα 60,9% (Πίνακας 3.21, Εικόνα 3.36). Το ΑΣ-3 παρουσίαζε τα μικρότερα ποσοστά από τις τρεις ομάδες. Η βιοαποικοδόμηση για αλκάνια αλυσίδας 11 έως 35 άτομα άνθρακα ήταν η μικρότερη από όλες τις ομάδες όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.35.



Εικόνα 3.35 Διαγραμμα του λόγου αλκανίων προς σπάνια των τριών ομάδων βακτηρίων [AΣ-1, AΣ-2, AΣ-3 και του μάρτυρα (oil)] σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα Walne Medium και προσθήκη 5% αργού πετρελαίου μετά από δέκα ημέρες

Πίνακας 3.21 Ποσοστό βιοαποικοδόμησης (%) των τριών ομάδων βακτηρίων στα μικρού και μεγάλου μήκους αλκάνια

| Ομάδες | ποσοστό βιοαποικοδόμησης% (C ₁₁ -C ₂₁) | ποσοστό βιοαποικοδόμησης% (C ₂₁ -C ₃₅) |
|--------|--|--|
| ΑΣ-1 | 76,79 | 54,79 |
| ΑΣ-2 | 78,75 | 60,9 |
| ΑΣ-3 | 71,12 | 45,48 |



Τα στελέχη, *Nitratireductor sp*-ΑΣΘ5, *Thalassospira sp.*- ΑΣΘ12, και *Pseudomonas sp*-ΑΣΚ47α που χρησιμοποιήθηκαν στα consortium, ΑΣ-2, ΑΣ-1 και ΑΣ-3 αντίστοιχα, συγκρινόμενα με τις υγρές κλειστές καλλιέργειες μετά από δέκα μέρες επώασης έχουν μια πολύ μεγάλη διαφορά στο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (Πίνακας 3.21, Εικόνα 3.37).

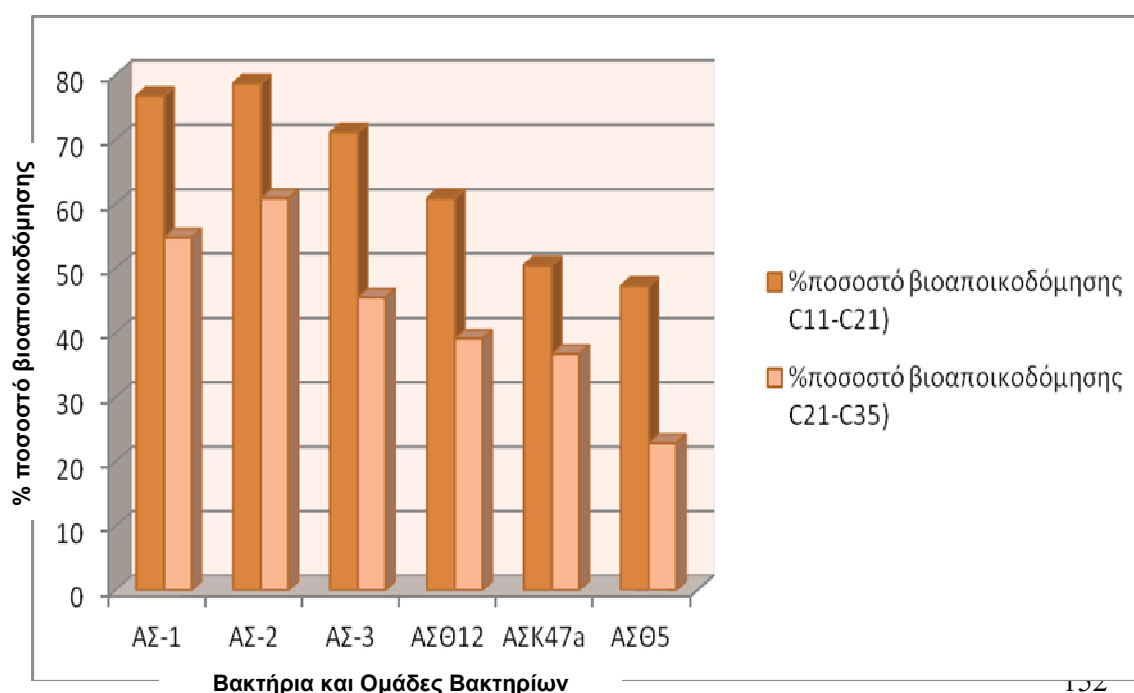
Κατά την ανάλυση της οργανικής φάσης της μικτής καλλιέργειας σε αέριο χρωματογράφο- φασματογράφο μάζας διαπιστώθηκε ο κατά μέσος όρος αποικοδόμησης των αλειφατικών υδρογονανθράκων από 11 έως 21 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 76,79% ενώ το στέλεχος *Thalassospira sp* ΑΣΘ12 σε αξενική καλλιέργεια παρουσίαζε αποικοδόμηση των αλειφατικών υδρογονανθράκων από 11 έως 21 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 60,9%.

Αντίστοιχα για τους υδρογονάνθρακες από 22 έως 35 άτομα άνθρακα το ΑΣ-1 παρουσίαζε ποσοστό 54,79 ενώ το *Thalassospira sp* ΑΣΘ12 ποσοστό 39,1% (Πίνακας 3.22).

Η ομάδα ΑΣ-2 κατά την ανάλυση με αέριο χρωματογράφο- φασματογράφο μάζας διαπιστώθηκε ότι ο κατά μέσος όρος αποικοδόμηση των αλειφατικών υδρογονανθράκων από 11 έως 21 άτομα άνθρακα ήταν σε ποσοστό 78,75 ενώ σε αξενική καλλιέργεια το *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 παρουσίαζε αντίστοιχα ποσοστό 47,29. Τα αλκάνια με 21 έως 35 άτομα άνθρακα σε μικτή καλλιέργεια είχαν ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό αποικοδόμησης, 60,9 ενώ αντίστοιχα η καλλιέργεια με το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 είχε ποσοστό 22,87% (Πίνακας 3.21). Το ίδιο παρατηρείται για τις ομάδες ΑΣ-3 και την αξενική καλλιέργεια *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47α όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.22.

Πίνακας 3.22 Ποσοστό βιοαποικοδόμησης (%) των τριών ομάδων βακτηρίων και των τριών αξενικών καλλιεργειών σε μικρού και μεγάλου μήκους αλκάνια

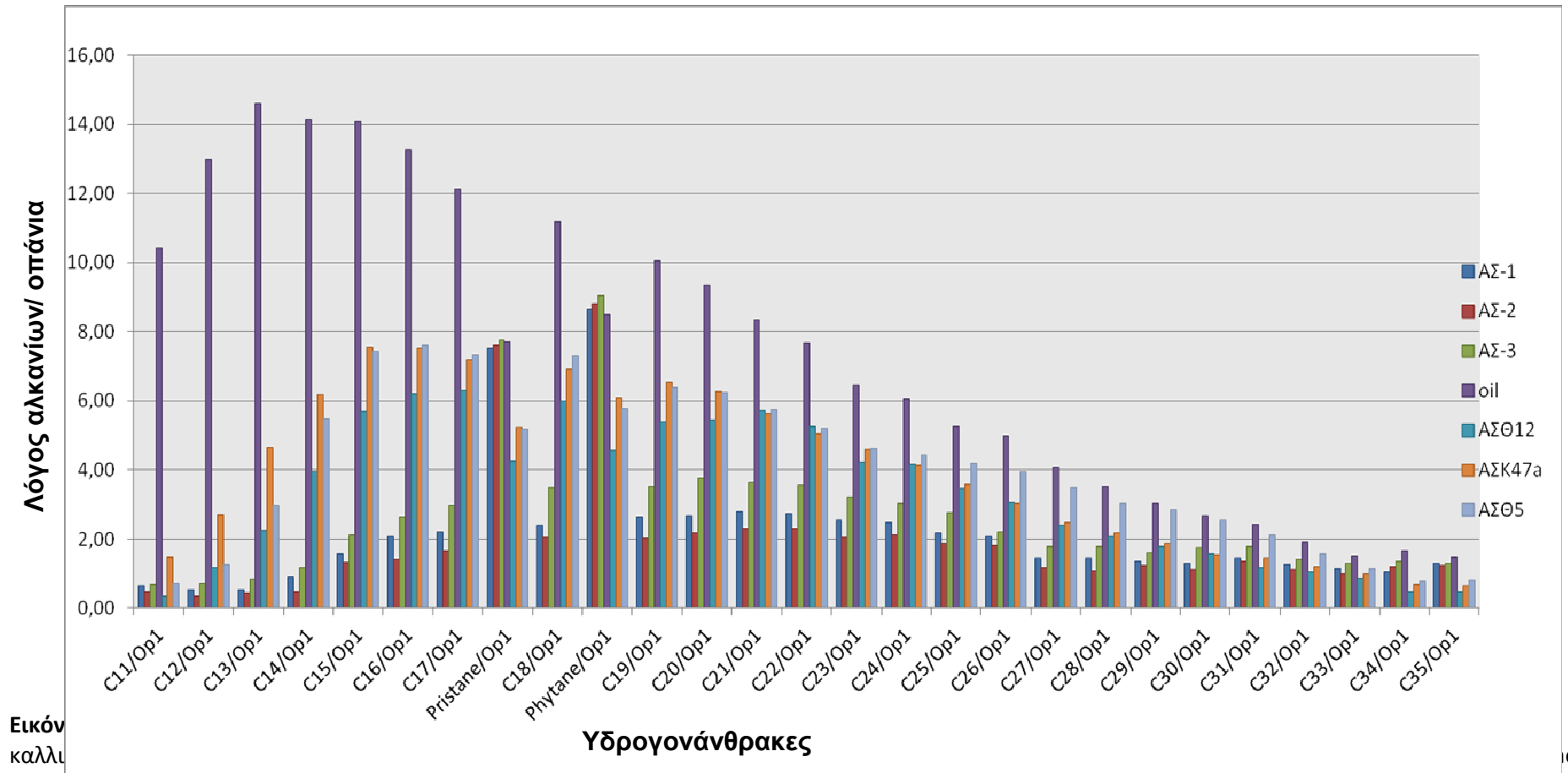
| Στέλεχος | ποσοστό βιοαποικοδόμησης% (C ₁₁ -C ₂₁) | ποσοστό βιοαποικοδόμησης% (C ₂₂ -C ₃₅) |
|----------|--|--|
| ΑΣ-1 | 76,79 | 54,79 |
| ΑΣ-2 | 78,75 | 60,9 |
| ΑΣ-3 | 71,12 | 45,48 |
| ΑΣΘ12 | 60,9 | 39,1 |
| ΑΣΚ47α | 50,49 | 36,71 |
| ΑΣΘ5 | 47,29 | 22,87 |



Εικόνα 3.37: Διάγραμμα απεικόνισης του ποσοστού βιοαποικοδόμησης (%) των τριών ομάδων βακτηρίων και των τριών αξενικών καλλιέργειών σε μικρού μοριακού βάρους αλκάνια και σε μεγάλου μήκους αλυσίδας αλκάνια

Όπως παρατηρείται από το Πίνακα 3.22 και τις Εικόνες 3.37 και 3.38 τα στελέχη *Thalassospira sp* ΑΣΘ12, *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47α και *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 όταν καλλιεργήθηκαν σε μεικτές καλλιέργειες μαζί με άλλα βακτήρια, στις μεικτές καλλιέργειες παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης σε σχέση με τις καθαρές κλειστές υγρές καλλιέργειες. Τέλος η ομάδα ΑΣ-2 παρουσίασε τα μεγαλύτερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης.

Στις μεικτές καλλιέργειες τα στελέχη βακτηρίων, που όταν ήταν σε αξενικές καλλιέργειες, μπορεί να παρουσιάζουν είτε μεγάλα είτε μικρά ποσοστά βιοαποικοδόμησης, είναι πιο αποδοτικά, καθώς παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης σε σχέση με τις αξενικές υγρές κλειστές καλλιέργειες





4 Συμπεράσματα - Συζήτηση

4.1 Φυσικοχημικοί παράμετροι

Το υδάτινο περιβάλλον της περιοχής του Ασπροπύργου και της λίμνης Κουμουνδούρου όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών παραμέτρων ήταν κατάλληλο για την ύπαρξη σημαντικής μικροβιακής ποικιλότητας και δραστηριότητας. Η τιμή του pH, προσέγγιζε την ουδετερότητα και ήταν αρκετά ευνοϊκή για τη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα μεγάλου αριθμού βακτηριακών ειδών έναντι πληθώρας υδρογονανθράκων. Επιπλέον η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του έτους είχε ιδανικές τιμές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα υδάτινα και θαλάσσια οικοσυστήματα (Zhu *et al*, 2001).

Όσον αφορά στις συγκεντρώσεις οξυγόνου στην παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου και στη λίμνη Κουμουνδούρου όπως φαίνονται από τον Πίνακα 3.1 οι τιμές ήταν επαρκείς για την αερόβια βιοαποικοδόμηση των μικροοργανισμών. Οι αερόβιοι αποικοδομητές χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την πρόσληψη των αλκανίων καθώς τα ένζυμα που ενεργοποιούνται στα αρχικά στάδια της βιοαποικοδόμησης ανήκουν στην οικογένεια των μονοξυγενάσων (Wasmund *et al*, 2009).

Σε ότι αφορά στο επίπεδο των νιτρικών ιόντων, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και για την ενίσχυση της βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας (Das *et al*, 2011) οι συγκεντρώσεις ήταν αρκετά υψηλές. Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών ιόντων κυρίως του αζώτου και του φώσφορου ήταν σημαντικά για την επιτυχή βιοαποικοδόμηση γιατί δρουν ως περιοριστικοί παράγοντες στη διαδικασία βιοαποικοδόμησης (Zhu *et al*, 2001). Επίσης οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων είναι σε φυσιολογικά επίπεδα με αποτέλεσμα να μην εμποδίζεται η δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Duhalt R., 1989).

4.2 Ποιοτική ανάλυση μικροβιακού φορτίου

Η ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου έγινε με τη μέθοδο της DGGE. Η

μεγαλύτερη βιοποικιλότητα μικροοργανισμών παρατηρήθηκε στην παράκτια περιοχή της θάλασσας του Ασπροπύργου. Σύμφωνα με τους Yakimov *et al* (2007), οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε αργό πετρέλαιο και/ ή να το διασπούν προέρχονται κυρίως από τις θαλάσσιες περιοχές και λιγότερο από άλλα υδάτινα οικοσυστήματα όπως οι λίμνες. Η λίμνη Κουμουνδούρου έχει άμεση επαφή με τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου μέσω της ύπαρξης ενός θυροφράγματος (ΕΛΚΕΘΕ, 2012). Για τον λόγο αυτό η λίμνη είχε υφάλμυρο χαρακτήρα και αρκετά όμοιους ριβότυπους κατά την ανάλυση DGGE.

Από τα αποτελέσματα στην παράγραφο 3.2 φάνηκε ότι η περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων παρουσίασε την πιο μικρή ποικιλότητα σε μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τις άλλες δύο περιοχές. Η συγκέντρωση αργού πετρελαίου στο σημείο αυτό ήταν πολύ υψηλή και οι μικροοργανισμοί που κατάφεραν να επιβιώσουν σε ένα τόσο ρυπασμένο περιβάλλον ήταν πολύ λίγοι.

4.3 Βακτήρια με ικανότητα βιοαποικοδόμησης αργού πετρελαίου

Η θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου όπως αναφέρθηκε (4.2) παρουσίαζε τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα και ήταν ελαφρώς λιγότερο ρυπασμένη σε σχέση με τη λίμνη Κουμουνδούρου. Το ποσοστό των απομονωθέντων βακτηρίων από τη θαλάσσια περιοχή του Ασπροπύργου που αποικοδομούσαν πετρέλαιο ήταν 73,33% στο σύνολο των απομονωθέντων βακτηρίων ενώ της λίμνης Κουμουνδούρου 66,66%. Δηλαδή τα βακτήρια της θάλασσας του Ασπροπύργου εμφάνιζαν καλύτερη προσαρμοστικότητα όσον αφορά την ανάπτυξη και την αποικοδόμηση παρουσία αργού πετρελαίου. Σύμφωνα με τους Harayama *et al*, (2004) τα περισσότερα στελέχη με ικανότητα βιοαποικοδόμησης πετρελαίου προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον.

Επίσης σχεδόν σε όλα τα απομονωθέντα βακτήρια της θάλασσας του Ασπροπύργου ανιχνεύτηκε το γονίδιο της αλκανικής μονοξυγενάσης το οποίο σε ακραίες συνθήκες, όπως κατά την εκροή πετρελαϊκών αποβλήτων, παρουσιάζει έντονη οριζόντια μεταφορά (Liu *et al*, 2009). Το γονίδιο βρίσκεται στο πλασμίδιο OCT της *Pseudomonas putida* και φέρει επιπλέον βοηθητικά γονίδια για την αποικοδόμηση των αλκανίων για τον λόγο αυτό η προσαρμοστικότητα των βακτηρίων της θάλασσας είναι ταχύτατη και υποβοηθάται εξελικτικά (Sauret *et al*, 2012).

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την περιοχή της λίμνης Κουμουνδούρου που περιέχει απόβλητα πετρελαίου αποικοδομούσαν σχεδόν όλα το πετρέλαιο (95% στο σύνολο των απομονωθέντων βακτηρίων) και εμφάνιζαν σχεδόν όλα υψηλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Δεν ανιχνεύτηκαν όμως γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης οπότε το συγκεκριμένο μονοπάτι βιοαποικοδόμησης των αλκανίων δεν χρησιμοποιείται από τα βακτήρια αυτά. Είναι αναμενόμενο τα βακτήρια από τη συγκεκριμένη περιοχή να αποικοδομούν το πετρέλαιο γιατί είναι η μόνη περιοχή που περιέχει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις πετρελαίου οπότε όλα τα βακτήρια είναι ικανά να αναπτύσσονται και να συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση του αργού πετρελαίου (Rojo F., 2009).

4.3.1 Βακτήρια της παράκτιας περιοχής του Ασπροπύργου

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την παράκτια περιοχή του Ασπροπύργου παρουσίασαν καλή ανάπτυξη σε καλλιέργειες που περιείχαν αργό πετρέλαιο και καλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα. Επίσης ανιχνεύτηκαν σε αρκετά στελέχη γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης.

Πιο αναλυτικά παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος ΑΣΘ19 που ταυτίζεται με το γένος *Thalassospira sp.* εμφάνιζε την πιο υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα και αποικοδομούσε το 66,32% του συνολικού πετρελαίου. Αυτό ενισχύθηκε από την ύπαρξη των ομόλογων γονιδίων *alkB2* και *alkB4*. Το γονίδιο *alkB2* εμπλέκεται στην αρχική οξειδωση αλκανίων με μήκος αλυσίδας 12 έως 16 άτομα άνθρακα ενώ το *alkB4* σε μεγαλύτερου μήκους αλκάνια έως και 36 άτομα άνθρακα (Kyung-Hwa Baek *et al*, 2007). Σε πειράματα απομόνωσης και κλωνοποίησης των ομόλογων γονιδίων *alkB* σε ετερόλογα συστήματα δεν παρατηρήθηκε λειτουργία μονοξυγενάσης των γονιδίων *alkB3* και *alkB4*. Οπότε παραμένει άγνωστη ακόμα η λειτουργία των γονιδίων χωρίς να αποκλείεται η δραστηριότητά τους ως αλκανική μονοξυγενάση (Whyte *et al*, 2002). Σύμφωνα λοιπόν με τους Kyung-Hwa Baek και Whyte (2007, 2002) η ύπαρξη των αντίστοιχων ομόλογων του *alkB* γονιδίου εμπλέκεται στην βιοαποικοδόμηση συγκεκριμένου τύπου αλκανίων: Το *alkB2* για την αρχική οξειδωση και τα *alkB1/ alkB3* και *alkB4* για τα μεγαλύτερα μήκους αλκάνια, έστω και αν δεν είναι βέβαιη ακόμα η λειτουργία των γονιδίων αυτών.

Το γένος *Thalassospira sp.* έχει απομονωθεί από αρκετά θαλάσσια ενδιαιτήματα και ιδιαίτερα από περιοχές που παρουσιάζουν πετρελαϊκή ρύπανση αλλά δεν έχει αποδειχθεί η

ύπαρξη γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης (Liu *et al*, 2007). Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία εντοπίστηκαν γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης σε αυτό το γένος. Ομόλογα γονιδίων της *alkB* ανιχνεύτηκαν στο *Thalassospira sp* ΑΣΘ19 αλλά και στα ΑΣΘ17, ΑΣΘ2a και ΑΣΘ14 όπου εντοπίστηκαν και άλλα ομόλογα όπως το *alkB3*.

Το βακτήριο ΑΣΘ24bb εμφάνισε επίσης μεγάλη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα (66,32%). Το βακτήριο αυτό ανήκει στο γένος *Nitratireductor sp*. Έχουν εντοπιστεί είδη του γένους *Nitratireductor sp*. σε περιοχές με πετρελαϊκή ρύπανση που εμπλέκονται στη βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων κυρίως του ντίζελ πετρελαίου και όχι του αργού πετρελαίου (Wang *et al*, 2010). Στο στελέχος *Nitratireductor*- ΑΣΘ24bb ανιχνεύτηκε το ομόλογο γονίδιο *alkB2* που είναι υπεύθυνο για την αρχική οξειδωση των αλκανίων και το ομόλογο *alkB1* που εμπλέκεται στην οξειδωση μεγαλύτερου μήκους αλκάνια. Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύονται γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης σε είδη του *Nitratireductor sp*. . Επίσης το *Nitratireductor*-ΑΣΘ24bb σε υγρές κλειστές καλλιέργειες σχημάτιζε συσσωματώματα πετρελαίου. Βάσει των συμπερασμάτων αυτών πιθανά τα βακτηριακά κύτταρα του στελέχους *Nitratireductor*-ΑΣΘ24bb με τη δράση της αλκανικής μονοξυγενάσης *alkB2* αποικοδόμησαν τα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια. Στην συνέχεια το *alkB1* αποικοδόμησε μεγαλύτερου μήκους αλκάνια. Έτσι οι υδρογονάνθρακες προσέγγισαν την υδρόφοβη επιφάνεια των κυττάρων, τα κύτταρα ενώθηκαν και σχημάτισαν σφαιρίδια³ και συσσωματώματα και οι υπόλοιποι υδρογονάνθρακες οι οποίοι δεν καταβολίστηκαν εγκλείονται μέσα στο συσσωμάτωμα (Zhang *et al*,2009).

4.3.2 Βακτήρια της λίμνης Κουμουνδούρου

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου στις υγρές κλειστές καλλιέργειες εμφάνισαν συσσωματώματα και πιθανά κάποια εκλύουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου ανήκουν κυρίως στα γένη *Pseudomonas sp*, *Nitratireductor sp* και *Limnobacter sp*. Είδη του γένους *Pseudomonas sp*. με υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα έχουν εντοπιστεί σε λίμνες της Κίνας αλλά και τις λίμνης Βαϊκάλης (Pavlonova *et al*, 2008).

Όλα τα απομονωθέντα βακτήρια είχαν μια καλή ανάπτυξη (υψηλή ξηρή βιομάζα)

³βλέπε σελίδα 20, αναφορά 1

και καλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα αλλά χαμηλότερη σε ποσοστά σε σχέση με τις άλλες περιοχές δειγματοληψίας. Επιπροσθέτως στα απομονωθέντα βακτήρια της λίμνης δεν ανιχνεύτηκαν ομόλογα γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης. Μόνο σε 5 βακτήρια ανιχνεύτηκαν ομόλογα του *alkB*.

Το στέλεχος *Pseudomonas* ΑΣΚ47α εμφάνισε την πιο υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα από όλα τα απομονωθέντα βακτήρια της λίμνης Κουμουνδούρου (49,85%). Επίσης ανιχνεύτηκαν δύο ομόλογα γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης *alkB*, το *alkB2* και το *alkB4*. Επιβεβαιώνεται, έτσι, η υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα λόγω της ύπαρξης των ομόλογων γονιδίων (Kyung-Hwa Baek *et al*, 2007).

Τέλος στο στέλεχος *Nitratireductor* ΑΣΚ48α παρατηρήθηκε έκλυση επιφανειοδραστικών παραγόντων και εμφάνισε υψηλή βιοαποικοδομητική δραστηριότητα. Σε λίμνες του Καναδά έχει αναφερθεί η απομόνωση βακτηρίων που εκλύουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή παραγόντων βιοαποκατάστασης (Zhou *et al*, 2008).

4.3.3 Βακτήρια της περιοχής εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη λίμνη Κουμουνδούρου, από την περιοχή που περιέχει πετρελαϊκά απόβλητα λόγω των παρακείμενων εργοστασίων πετρελαίου, παρουσίασαν την υψηλότερη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα από όλες τις άλλες περιοχές.

Το στέλεχος *Rheinheimera aquimaris* ΚΠ6α παρουσίασε τη μεγαλύτερη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα και επιβεβαιώθηκε και στις υγρές καλλιέργειες φαινοτυπικά με τη μεγάλη μείωση της διασποράς του πετρελαίου στην επιφάνεια καλλιέργειας. Ενώ όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν παρουσίασαν πολύ μεγάλη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα σε κανένα δεν ανιχνεύτηκαν ομόλογα γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης. Πιθανά λοιπόν τα βακτήρια να εμπλέκονται σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια όπως των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων (Banks J. *et al*, 2012). Τέλος τα περισσότερα απομονωθέντα βακτήρια εμφάνισαν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων και την έκλυση επιφανειοδραστικών παραγόντων.

4.3.4 Εκτίμηση ρυθμού βιοαποικοδόμησης των επιλεγμένων στελεχών

Ο υπολογισμός του ρυθμού βιοαποικοδόμησης αλκανίων έγινε με την επιλογή 2 βακτηρίων από την παράκτια περιοχή του Ασπρόπυργου και ένα από την περιοχή της λίμνης Κουμουνδούρου.

Το *Nitratireductor sp*- ΑΣΘ5 στις αρχικές καλλιέργειες παρουσίασε πολύ καλή ανάπτυξη και υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης καθώς επίσης και την ύπαρξη δύο ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης. Κατά την εκτίμηση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης στα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια παρατηρήθηκε βιοαποικοδόμηση που φθάνει σε ποσοστό 47% και χρόνο υποδιπλασιασμού των περίπου τις 8 ημέρες. Στα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια ο χρόνος υποδιπλασιασμού φθάνει τις 15 ημέρες και το ποσοστό βιοαποικοδόμησης 20%. Για τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια, λόγω της ύπαρξης των ομόλογων *alkB3* και *alkB4* θα έπρεπε τα ποσοστά βιοαποικοδόμησης να ήταν μεγαλύτερα σύμφωνα με τους Kyung-Hwa Baek *et al*. Λόγω όμως της αμφιλεγόμενης λειτουργίας τους κατά τη βιοαποικοδόμηση πιθανά να μη συνέτρεχαν όλοι οι κατάλληλοι παράγοντες για την εμφάνιση μεγάλης βιοαποικοδομητικής δραστηριότητας (Zhu *et al*, 2001).

Το *Thalassospira sp*. ΑΣΘ12 παρουσίασε στις αρχικές υγρές καλλιέργειες συνολικά πιο χαμηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης αν και έχουμε την ύπαρξη πολλών ομόλογων του γονιδίου *alkB*. Στην εκτίμηση του χρόνου υποδιπλασιασμού παρατηρείται μεγαλύτερος χρόνος υποδιπλασιασμού για τα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια σε σχέση με το στέλεχος *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 αλλά καλύτερο χρόνο υποδιπλασιασμού- στις 11 ημέρες- για τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την ύπαρξη των τριών ομόλογων γονιδίων *alkB1*, *alkB3* και *alkB4* που έχει το στέλεχος *Thalassospira sp*. ΑΣΘ12 με αποτέλεσμα να καταβολίζονται τα μεγάλου μοριακού βάρους αλκάνια (Kyung-Hwa Baek *et al*, 2007).

Το στέλεχος *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47α που απομονώθηκε από τη λίμνη Κουμουνδούρου εμφάνισε την καλύτερη ανάπτυξη από όλα τα άλλα απομονωθέντα στελέχη της λίμνης Κουμουνδούρου και την ύπαρξη 2 ομόλογων γονιδίων. Ο χρόνος υποδιπλασιασμού (11 ημέρες) για τα μικρού μοριακού βάρους αλκάνια είναι μεγαλύτερος από ότι των άλλων δύο στελεχών της θάλασσας του Ασπρόπυργου, δηλαδή το *Pseudomonas sp* ΑΣΚ47α εμφάνισε πιο αργή βιοαποικοδόμηση των μικρού μοριακού

βάρους αλκανίων. Για τα μεγάλα μοριακού βάρους αλκάνια εμφανίζεται καλό ποσοστό βιοαποικοδόμησης, 28,1% και χρόνο υποδιπλασιασμού 13 ημέρες, γεγονός που συμβαδίζει με την ύπαρξη των ομόλογων γονιδίων της αλκανικής μονοξυγενάσης (Kyung-Hwa Baek *et al*, 2007).

4.3.5 Μικτές καλλιέργειες βακτηρίων (consortia)

Η ομάδα ΑΣ-1 περιείχε 3 στελέχη που παρουσίαζαν μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης, η ομάδα ΑΣ-2 περιελάμβανε στελέχη με μεγάλο και μικρό ποσοστό βιοαποικοδόμησης και η ομάδα ΑΣ-3 στελέχη με μικρότερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Και τα 3 consortium είχαν στελέχη και από τις 3 περιοχές δειγματοληψίας καθώς και στελέχη που μελετήθηκε ο ρυθμός βιοαποικοδόμησής τους.

Από τις 3 ομάδες το καλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης παρουσίασε το ΑΣ-2 που περιείχε βακτήρια με μικρό και μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης. Το ΑΣ-1 αν και περιείχε βακτήρια που παρουσίαζαν πολύ μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης σε αξενικές καλλιέργειες σε μικτή καλλιέργεια πιθανά λόγω ανταγωνισμού δεν κατάφεραν να δώσουν τη μέγιστη βιοαποικοδόμηση, σε αντίθεση με το ΑΣ-2 (Zhu *et al*, 2001).

Όσον αφορά την ύπαρξη του γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης στην ομάδα ΑΣ-2 τα *Thalassospira profundimaris* ΑΣΘ19 και *Nitratireductor sp* ΑΣΘ5 είχαν ομόλογα του γονιδίου *alkB* τα οποία διασπούν μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας αλκάνια. Αντίθετα στην ομάδα ΑΣ-1 μόνο το *Thalassospira sp* ΑΣΘ12 είχε ομόλογα του γονιδίου *alkB*.

Σε σύγκριση της βιοαποικοδόμησης των αξενικών καλλιεργειών που εκτιμήθηκε ο χρόνος υποδιπλασιασμού με τις αντίστοιχες μικτές καλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι στις μικτές έχουμε πολύ πιο μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης έως και διπλάσια ποσοστά σε σχέση με τις αξενικές. Με δεδομένη την πολύπλοκη σύσταση του αργού πετρελαίου το οποίο περιέχει ένα εύρος διαφορετικών υδρογονανθράκων απαιτείται παρουσία διαφορετικών μεταβολικών οδών (Simons K. *et al*, 2013). Ο κάθε μικροοργανισμός εξειδικεύεται σε συγκεκριμένη κατηγορία υδρογονανθράκων οπότε συνδυασμός διαφορετικών μικροοργανισμών, έχει καλύτερη απόδοση στη βιοαποικοδόμηση ενός τόσο σύνθετου μείγματος όπως το αργό πετρέλαιο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς επιλέγονται συχνά μικτές καλλιέργειες για τη βιοεξυγίανση περιοχών ρυπασμένων με πετρέλαιο (Hussein *et al*, 2012).

4.4 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία είχε ως στόχο την απομόνωση μικροοργανισμών από μια περιοχή που είναι ιδιαίτερα επιβαρυνμένη, την περιοχή του Ασπροπύργου και της λίμνης Κουμουνδούρου, και τη μελέτη των απομονωθέντων μικροοργανισμών ως προς την ικανότητά τους να αποικοδομούν το αργό πετρέλαιο και πιο ειδικά τα αλκάνια.

Η απομόνωση έγινε από τρία διαφορετικά ενδιαιτήματα με σκοπό να συλλεχθεί όσον το δυνατόν μεγαλύτερη ποικιλότητα μικροοργανισμών που να εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες.

1. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από την περιοχή του Ασπροπύργου παρουσίασαν σχεδόν όλοι (73,33%) ικανότητα ανάπτυξης και βιοαποικοδόμησης στο αργό πετρέλαιο. Δηλαδή τα βακτήρια της θάλασσας του Ασπροπύργου εμφάνισαν καλή προσαρμοστικότητα όσον αφορά την ανάπτυξη και την αποικοδόμηση σε αργό πετρέλαιο. Επίσης σχεδόν σε όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τη θάλασσα του Ασπροπύργου ανιχνεύτηκε το γονίδιο της αλκανικής μονοξυγενάσης.
2. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τη λίμνη είχαν μικρότερα ποσοστά βιοαποικοδόμησης και δεν αναπτύχθηκαν όλα στην παρουσία αργού πετρελαίου ούτε παρουσίασαν ομόλογα του γονιδίου της αλκανικής μονοξυγενάσης.
3. Τέλος οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από την περιοχή εκροής πετρελαϊκών αποβλήτων παρουσίασαν τα πιο μεγάλα ποσοστά βιοαποικοδόμησης αλλά δεν παρουσίασαν ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης οπότε πιθανά εμπλέκονται σε άλλους μεταβολικούς δρόμους οι οποίοι δεν μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Από την παρούσα μελέτη:

1. Απομονώθηκαν αρκετοί μικροοργανισμοί με υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης, και χαμηλό χρόνο διάσπασης των αλκανίων
2. Μελετήθηκαν στελέχη του γένους *Nitratireductor sp* και *Thalassospira sp* τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλες εργασίες στο μικροβιακό φορτίο ρυπασμένων περιοχών αλλά δεν έχει μελετηθεί η ικανότητά τους να

βιοαποικοδομούν το αργό πετρέλαιο ούτε έχουν ανιχνευτεί ομόλογα γονίδια της αλκανικής μονοξυγενάσης.

3. Οι μικτές καλλιέργειες που δοκιμάστηκαν εμφάνισαν πολύ υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες πεδίου για τη βιοεξυγίανση της περιοχής ιδιαίτερα της λίμνης Κουμουνδούρου.
4. Το ΑΣ-2 παρουσίασε τα μεγαλύτερα ποσοστά και συνεπώς θα ήταν σκόπιμο να εκτιμηθεί η βιοαποικοδομητική του δραστηριότητα και *in vivo*.

Τέλος είναι αρκετά σημαντικό ότι κάποιοι μικροοργανισμοί παρουσίασαν κάποια ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως την ύπαρξη βιοσυσσωμάτων και την έκλυση επιφανειοδραστικών παραγόντων. Κάθε ένα από τα βακτήρια αυτά μπορεί να μελετηθεί ξεχωριστά ως προς την τάση να σχηματίζει βιοσυσσωματώματα και τι επιπτώσεις έχει σε συνθήκες πεδίου ως προς την βιοεξυγίανση της περιοχής. Σε μελλοντικά πειράματα θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα των βακτηρίων σε PAHs καθώς και η απομόνωση παραγόντων βιοαποικοκατάστασης δηλαδή η απομόνωση και ο καθαρισμός ουσιών καθώς επίσης να μελετηθεί και η εφαρμογή τους στο πεδίο ως βιοτεχνολογικό προϊόν που θα συνεισφέρει στην βιοεξυγίανση των περιοχών επιβαρυμένων με πετρέλαιο.



5 Βιβλιογραφία

Επιστημονικά άρθρα:

Abbasnezhad Hassan & Murray Gray & Julia M. Foght (2011) Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons *Appl Microbiol Biotechnol* **92**:653–675

Adebusoye S. A., M. O. Ilori, O. O. Amund, O. D. Teniola, and S. O. Olatope (2007), “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**: 1149–1159

Atlas R. M. and R. Bartha (1992) “Hydrocabon biodegradation and oil spill bioremediation,” *Advances in Microbial Ecology*, **12**: 287–338

Atlas R. M. (1981), “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective,” *Microbiological Reviews*, **45**: 180–209

Baker, J.M. (1995) Net environmental benefit analysis for oil spill response. *Proceedings of the 1995 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute, Washington, DC, pp611-614.

Banks, K. M., and Schwab, A. P.(2012) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. In: *Symposium on Bioremediation of Hazardous Wastes: Research, Development and Field Evaluations*. Washington, D.C., Environmental Protection Agency, EPA/600/R-93/054: 246

Bellver J. I. Medina-, P. Marín, A. Delgado et al. (2005), "Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill," *Environmental Microbiology*, **7**: 773–779

Bragg, J.R., Prince, R.C., Harner, E.J., and Atlas, R.M. (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, **368**: 413-418

Brusseau M. L. (1998), "The impact of physical, chemical and biological factors on biodegradation," in *Proceedings of the International Conference on Biotechnology for Soil Remediation: Scientific Bases and Practical Applications*, R. Serra, Ed., pp. 81–98, C.I.P.A. S.R.L., Milan, Italy

Cappelletti M., S. Fedi, D. Frascari, H. Ohtake, R. J. Turner, and D. Zannoni (2011) Analyses of both the alkB Gene Transcriptional Start Site and alkB Promoter-Inducing Properties of *Rhodococcus* sp. Strain BCP1 *Applied and Environmental Microbiology*, **11**: 1619–1627

Chaîneau C. H., G. Rougeux, C. Yéprémian, and J. Oudot (2005) "Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil," *Soil Biology and Biochemistry*, **37**: 1490–1497.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., and Hsu, F.C. (2006) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants, *Advances in Agronomy*, **56**: 55-114

Das Nilanjana and Preethy Chandran (2011) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview *Biotechnology Research International* **20**: 1-13

Delille D., F. Coulon, and E. Pelletier (2004), "Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils," *Cold Regions Science and Technology*, **40**: 61–70,.

Dinamarca, M.A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A., and Rojo, F. (2003) Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures. *J Bacteriol* **185**: 4772–4778.

Di Martino Carla, Nancy I. López, Laura J. Raiger lustman(2012) Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation, *International Biodeterioration & Biodegradation* **67**: 15-20

Doerffer, J.W. (1992) Oil Spill Response in the Marine Environment, *Pergamon Press*, Oxford, U.K.

Duhalt, R Vazquez (1989) Environmental impact of used motor oil. *The Science of the Total Environment* **79**:1-23

Emad I. Hussein, Fuad A. Al-Horani and Hanan I. Malkawi (2012) Bioremediation Capabilities of Oil-degrading Bacterial Consortia Isolated from Oil-contaminated Sites at the Gulf of Aqaba (Jordan) *Biotechnology* **4**: 189-198

Engelhardt MA, Daly K, Swannell RP, Head IM (2001) Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J Appl Microbiol*, **90**:237-247.

Floch S.Le, F.X. Merlin, M. Guillerme, C. Dalmazzone, and P. Le Corre (1999), "A field experimentation on bioremediation: bioren," *Environmental Technology*, **20**: 897–907

Fritsche W. and M. Hofrichter (2000), "Aerobic degradation by microorganisms," in *Environmental Processes- Soil Decontamination*, J. Klein, Ed., pp. 146–155, Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999): Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **1**:63-70.

Harayama Shigeaki, Yuki Kasai and Akihiro Hara (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater *Current Opinion in Biotechnology* **15**:205–214

Harms, H., Smith, K.E.C, Wick, L.Y., (2010) Introduction: problems of hydrophobicity/bioavailability In: Timmis, K.N., McGenity, T., van den Meer, J.R., de Lorenzo, V., (eds.) *Microbial utilization of hydrocarbons, oils and lipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology Springer* **2**: 1437 - 1450

Head IM, Jones DM, Roling WF (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol.*, **4**:173-182

Kim S.-J., D. H. Choi, D. S. Sim, and Y.-S. Oh (2005), "Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand," *Chemosphere* **59**: 845–852,

Kotani, T., Kawashima, Y., Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2006) Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J Biosci Bioeng* **102**: 184–192.

Kvenvolden K. A. and C. K. Cooper (2003) "Natural seepage of crude oil into the marine environment," *Geo-Marine Letters*, **23**: 140–146,

Kumar M., V. Leo'n, A. De Sisto Materano, O. A. Ilzins, and L. Luis (2008), "Biosurfactant production and hydrocarbondegradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp.," *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**:1047–1057,.

Kyung-Hwa Baek , Byung-Dae Yoon , Hee-Mock Oh , Hee-Sik Kim & In-Sook Lee (2006) Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by *Nocardia* sp. H17 *Geomicrobiology Journal*, **23**:253-259

Lee, K., Tremblay, G.H., and Gauthier, J., Cobanli, S.E., Griffin, M. (1997) Bioaugmentation and biostimulation: a paradox between laboratory and field results. *Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington DC* 697-705

Liu Chenli, Yehui Wu, Li Li, Yingfei Ma and Zongze Shao (2007) *Thalassospira xiamenensis* sp. nov. and *Thalassospira profundimaris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:316–320

Liu Yi-Chen, Tian-Tian Zhoo, Jian Zhang, Lian Xu, Zhen-Hua Zhang, Qi- Rong Shen, Biao Shen (2009) Molecular characterization of the *alkB* gene in the thermophilic *Geobacillus* sp. Strain MH-1 *Research in Microbiology* **160**: 560-566

McKew UK Boyd A., Frédéric Coulon, A. Mark Osborn, Kenneth N. Timmis, Terry J. McGenity (2007) Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary *Environmental Microbiology* **9**:165–176

National Environmental Technology Application Center **(2003)** Evaluation Methods Manual: Oil Spill Response Bioremediation Agents. University of Pittsburgh Applied Research Center, Pittsburgh, PA

Nikolopoulou M. and N. Kalogerakis **(2009)**, "Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**: 802–807

Pavlova ON, Zemskaia TI, Gorshkov AG, Parfenova VV, Suslova Mlu, Khlystov OM **(2008)** Study on the Lake Baikal microbial community in the areas of the natural oil seeps Prikl Biokhim Mikrobiol. **44**:319-23

Prince R. C., **(1993)** "Petroleum spill bioremediation in marine environments," *Critical Reviews in Microbiology*, **19**: 217–242

Rojo Fernando **(2009)** Degradation of alkanes by bacteria *Environmental Microbiology* **11**: 2477–2490

Sauret C., U. Christaki, P. Moutsaki, I. Hatzianestis, A. Gogou, J. Ghiglione **(2012)** Influence of pollution history on the response of coastal bacterial and nanoeukaryote communities to crude oil and biostimulation assays *Marine Environmental Research* **79**:70-78

Simons KL, Sheppard PJ, Adetutu EM, Kadali K, Juhasz AL, Manefield M, Sarma PM, Lal B, Ball AS. **(2013)** Carrier mounted bacterial consortium facilitates oil remediation in the marine environment, *Bioresour Technol* **9**: 107-116

Tourova T.P., T.N. Nazima, E.M. Mikhailova, T.A. Rodionova, A.N. Ekimov, A.V. Mashukova and A.B. Poltarus **(2008)** alkB Homologs in Thermophilic Bacteria of the Genus *Geobacillus* *Molecular Biology* **42**: 217-226

Van Beilen J. B. and E. G. Funhoff (2007) "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation," *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**: 13–21,

Wasmund Kenneth, Kathryn A. Burns, D. Ipek Kurtbo and David G. Bourne (2009) Novel Alkane Hydroxylase Gene (alkB) Diversity in Sediments Associated with Hydrocarbon Seeps in the Timor Sea, Australia *Applied and Environmental Microbiology*.**42**:7391–7398

Wang Wanpeng, Liping Wang, Zongze Shao (2010) Diversity and Abundance of oil- Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (alkB) Genes in the Subtropical seawater of Xiamen Island, *Microbial Ecology* **60**: 429-439

Wei-Nung Chang, Chih-Wen Liu, Hwai-Shen Liu (2009) Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis* *Process Biochemistry* **44**: 955–962

Whyte L. G., T.H.M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer and J.B. van Beilen (2002) Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRLB- *Applied and environmental microbiology* 5933-5942

Yakimov Michail M, Kenneth N Timmis Peter N Golyshin (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria **18**: 257-266

Zahng Zhengzhi, Zhaowei Hou, Chunyu Yang, Cuiqing Ma, Fei Tao, Ping Xu (2011) Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, *Bioresource Technology* **102**: 4111-4116

Zhou Shuqing, Huang Haiping and Liu Yuming (2008) Biodegradation and origin of oil sands in the Western Canada Sedimentary Basin *Pet.Sci.* **5**:87-94

Βιβλία:

ΕΛΚΕΘΕ (2012) Παρακολούθηση της οικολογικής ποιότητας της Λίμνης Κουμουνδούρου και σχεδιασμός δράσεων διαχείρισης, αποκατάστασης και ανάδειξης, Ιούνιος 2012

Arnot Jon, Todd Gouin, Don Mackay (2005) Practical Methods for Estimating Environmental Biodegradation Rates Report to Environment Canada, March 2005

Xueqing Zhu, Albert D. Venosa, Makram T. Suidan, and Kenneth Lee (2001) GUIDELINES FOR THE BIOREMEDIATION OF MARINE SHORELINES AND FRESHWATER WETLANDS, September 2001