

Έκθεση αποτελεσμάτων από τις επί τόπου αναλύσεις των βιολογικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού μετά από τις δοκιμές του οργάνου

Παραδοτέο Π4.1

Μαρία Πρωτοπαπά

Έργο: «Ολοκληρωμένο Σύστημα Υποβρύχιου Οικολογικού Καθαρισμού»

Ακρωνύμιο: ECOHULLCLEAN

Κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-05287

1. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας του οργάνου

Γενική εισαγωγή

Με τον όρο θαλάσσια βιοεπίστρωση αναφερόμαστε στην μη θεμιτή αποίκιση των υποθαλάσσιων τεχνιτών επιφανειών από μικρο- και μακρο- οργανισμούς. Το φαινόμενο της βιοεπίστρωσης, αν και αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία, παρόλα αυτά, ειδικότερα στα ύφαλα των πλοίων, είναι υπεύθυνη για μείζονα περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η αύξηση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου λόγω μεγαλύτερης κατανάλωσης καυσίμων και η διασπορά ξενικών ειδών (ΧΞΕ) (Invasive Alien Species -IAS) μεταφέροντας θαλάσσιους οργανισμούς από ένα σημείο της Γης σε κάποιο άλλο. Μάλιστα, θεωρείται σήμερα μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την διατήρηση της βιοποικιλότητας. Η βιοεπίστρωση επηρεάζει και άλλες θαλάσσιες βιομηχανίες, όπως τις υδατοκαλλιέργειες, τη βιομηχανία πετρελαίου και φυσικού αερίου, τα πάρκα αιολικής ενέργειας αλλά και τα επιβατηγά πλοία. Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες δουλεύουν πολύ δυναμικά πάνω σε αυτό το θέμα προσπαθώντας να εφεύρουν νέες αντιβιοεπιστρωτικές μεθόδους οι οποίες θα πρέπει να είναι φιλικές προς το περιβάλλον.

Η συσσώρευση της βιοεπίστρωσης είναι δυνατό να επιβραδυνθεί, αλλά είναι αδύνατο να σταματήσει εντελώς. Στα πλαίσια του ECOHULLCLEAN κατασκευάστηκε ένα σύστημα υποβρύχιου καθαρισμού των υφάλων των πλοίων (Παραδοτέο Π1.2) καθώς και ένα σύστημα φιλτραρίσματος (Παραδοτέο Π2.2) με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε στοιχείου θεωρείται βλαβερό βάση προδιαγραφών και την επιστροφή «καθαρού» νερού στο θαλάσσιο περιβάλλον. Προκειμένου να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα του οργάνου πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δειγματοληψίες.

Έλεγχος συστήματος φιλτραρίσματος

Στα πλαίσια του προγράμματος και μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής των συστημάτων υποβρύχιου καθαρισμού και φιλτραρίσματος, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δειγματοληψίες με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του οργάνου. Μία πρώτη δειγματοληψία, για τον έλεγχο του πρωτοκόλλου, έγινε στις 28 Απριλίου 2023 και ακολούθησαν 4 δειγματοληψίες τον Ιούλιο (στις 18,19,26 και 31) του 2023.

Όπως αναφέρεται και στο Παραδοτέο Ε.Ε 2.3 καθώς δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες σε παγκόσμιο επίπεδο για την διαχείριση του υλικού που συλλέγεται κατά τη διαδικασία καθαρισμού, πριν την απόρριψη του στο περιβάλλον, οι εταιρίες ακολουθούν τις οδηγίες του ΙΜΟ που αφορούν τον καθαρισμό του έρματος ενός πλοίου (“*International Convention for the Control and Management of Ships’ Ballast Water and Sediments (BWM)*”) και εφαρμόζονται από το 2004.

Σύμφωνα λοιπόν με τον κανονισμό D-2 τα πλοία που εκτελούν διαχείριση υδάτων έρματος πρέπει να απορρίπτουν:

1. λιγότερους από 10 βιώσιμους οργανισμούς ανά κυβικό μέτρο, με ελάχιστη διάσταση ≥ 50 μικρόμετρα (μm) και
2. λιγότερους από 10 βιώσιμους οργανισμούς ανά χιλιοστόλιτρο, με διάσταση 10 - 50 μικρόμετρα (μm).
3. Επίσης, η απόρριψη των μικροοργανισμών που αποτελούν δείκτες δεν πρέπει να υπερβαίνει τις καθορισμένες συγκεντρώσεις.

Σύμφωνα με το Παραδοτέο 2.2 βάσει των παραπάνω προδιαγραφών το σύστημα θα πρέπει να καθαρίζει το νερό στο επιθυμητό επίπεδο και στη συνέχεια να αποβάλει το καθαρό νερό στη θάλασσα ενώ όλα τα παράγωγα (βιο-απόβλητα, υφαλοχρώματα) του καθαρισμού θα έχουν συγκεντρωθεί στα κατάλληλα δοχεία ώστε να μπορέσουν να αξιοποιηθούν. Με βάση λοιπόν αυτά έγινε ο σχεδιασμός ενός συστήματος τριών διακριτών σταδίων.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο στάδιο δεσμεύονται τα μεγαλύτερα σε μέγεθος ΧΞΕ καθώς και οπουδήποτε άλλο σωματίδιο με μέγεθος μεγαλύτερο από 300 μm . Στο δεύτερο στάδιο το μείγμα που παίρνουμε ως προϊόν του πρώτου σταδίου, το οποίο αποτελείται κυρίως από θαλασσινό νερό, διοχετεύεται σε ένα αυτοκαθαριζόμενο φίλτρο τύπου Backwash με δυνατότητα φιλτραρίσματος 40 μm . Τέλος στο τρίτο στάδιο καθαρό πλέον νερό από ΧΞΕ, που όμως ίσως φέρει μικροοργανισμούς τύπου βακτηρίων, περνάει από ένα αντιδραστήρα εξουδετέρωσης μικροβίων. Σε αυτό το στάδιο το νερό επιβραδύνει την ταχύτητά του και είναι έτοιμο να γυρίσει στη θάλασσα απαλλαγμένο από οποιοδήποτε στοιχείο θεωρείται βλαβερό βάση προδιαγραφών

Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν από το προσωπικό του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία νερού σε τρία στάδια, πριν το

φίλτρο των 300μm (1^ο στάδιο), μετά το φίλτρο των 300μm (2^ο στάδιο) και τέλος μετά το φίλτρο των 40 μm (3^ο στάδιο), όχι όμως από το στάδιο της εξουδετέρωσης των μικροβίων. Σε όλα τα στάδια έγινε προσδιορισμός των οργανισμών βάσει μεγέθους $\geq 40 \mu\text{m}$ και $\leq 40 \mu\text{m}$.

Πρωτόκολλο Δειγματοληψιών ECOHULLCLEAN

- **Προσδιορισμός βιώσιμων οργανισμών ανά κυβικό μέτρο, με ελάχιστη διάσταση $\geq 50\mu\text{m}$.**

Συνολικά 6 δείγματα ανά δειγματοληψία

- 2 δείγματα από το 1^ο στάδιο φιλτραρίσματος
- 2 δείγματα από το 2^ο στάδιο φιλτραρίσματος
- 2 δείγματα από το 3^ο στάδιο φιλτραρίσματος

Μεθοδολογία

Σε κάθε στάδιο φιλτραρίσματος πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία νερού σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ώστε να γίνει συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος, σε μπουκάλια των 4lt. Στη συνέχεια ακολουθούσε φιλτράρισμα του δείγματος από δίχτυ με άνοιγμα ματιού 200 μm. Εν συνεχεία, το υλικό από το δίχτυ τοποθετούνταν σε διάφανο πλαστικό μπουκάλι με θαλασσινό νερό και φορμόλη (σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα). Οι αναλύσεις για τη μελέτη της σύνθεσης και της καταμέτρησης των οργανισμών πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με τη χρήση στερεοσκοπίου (Olympus SZX12).

Αποτελέσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Πίνακας 1**) οι οργανισμοί οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα ανήκουν στις ευρύτερες οικογένειες των Κωπηπόδων, Γαστεροπόδων, Πτεροπόδων, Νηματώδων και Δίθυρων. Ο αριθμός των οργανισμών φαίνεται να μειώνεται ιδιαίτερα από το 1^ο προς το 3^ο στάδιο φιλτραρίσματος, ενώ στα στάδια 2 και 3 ο αριθμός των οργανισμών είναι περίπου ίδιος.

Ένα χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε στα δείγματα του 1^{ου} σταδίου ήταν η ύπαρξη πολλών ασβεστολιθικών κομματιών πολύχαιτων, βρυζών και τρηματοφόρων. Τέλος σημαντική ήταν και παρουσία υφαλοχρώματος με διαφορετική μορφή σε κάθε στάδιο, ξεκινώντας από χοντρόκοκκο στο στάδιο 1 και καταλήγοντας σε μορφή «ψιλής άμμου» στο στάδιο 3.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα καταμέτρησης και ταυτοποίησης των οργανισμών με ελάχιστη διάσταση $\geq 50 \mu\text{m}$ από το 1^ο, 2^ο και 3^ο στάδιο φιλτραρίσματος.

	Άτομα/κυβικό μέτρο	
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
1 ^ο στάδιο	$10,4 \cdot 10^4$	$0,6 \cdot 10^4$
2 ^ο στάδιο	$2,1 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$
3 ^ο στάδιο	$1,7 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$

- Προσδιορισμός βιώσιμων οργανισμών ανά χιλιοστόλιτρο, με διάσταση 10 - 50 μm .

Συνολικά 4 δείγματα ανά δειγματοληψία

- 2 δείγματα από το 2^ο στάδιο φιλτραρίσματος
- 2 δείγματα από το 3^ο στάδιο φιλτραρίσματος

Μεθοδολογία

Σε κάθε στάδιο φιλτραρίσματος πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία νερού σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ώστε να γίνει συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος, σε μπουκάλα των 4lt. Από τη μπουκάλα πραγματοποιήθηκε μεταφορά 200ml νερού σε σκουρόχρωμα πλαστικά μπουκαλάκια με 1ml lugol. Οι αναλύσεις για τη μελέτη της σύνθεσης και της καταμέτρησης των οργανισμών πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με τη μέθοδο Utermöhl (1958), σε ανάστροφο μικροσκόπιο Olympus IX70.

Αποτελέσματα δειγματοληψιών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι οργανισμοί οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των Δινομαστιγωτών $<40\mu\text{m}$ και των Διατόμων (χωρίστηκαν σε Διάτομα μεγέθους $>40\mu\text{m}$ και $<40\mu\text{m}$). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 δεν υπήρχε κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στο 2^ο και 3^ο στάδιο.

Πίνακας2 . Αποτελέσματα καταμέτρησης και ταυτοποίησης των οργανισμών με διάσταση 10 - 50 μm από το 2^ο και 3^ο στάδιο φιλτραρίσματος.

Άτομα/χιλιοστόλιτρο	2 ^ο στάδιο		3 ^ο στάδιο	
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
Διάτομα >40 μm	21,14	0,74	24,02	3,98
Διάτομα <40 μm	21,50	5,50	26,20	9,40
Δινομαστιγωτά <40 μm	6,80	1,00	5,88	0,28
Σύνολο <40 μm	28,30		32,08	

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του συστήματος φιλτραρίσματος για τους οργανισμούς με διάσταση 10-50 μm φαίνεται να είναι αρκετά κοντά με τις οδηγίες του κανονισμού D-2 για τα πλοία που εκτελούν διαχείριση υδάτων έρματος. Ειδικότερα στο στάδιο 3 θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα για τους οργανισμούς αυτούς θα είναι ακόμα καλύτερα μετά το στάδιο εφαρμογής του αντιδραστήρα εξουδετέρωσης οργανισμών, τον οποίο εμείς δυστυχώς δε προλάβαμε να ελέγξουμε.

Το πρόβλημα αυτή τη στιγμή φαίνεται να είναι στο στάδιο απομάκρυνσης των οργανισμών μεγαλύτερους των 50 μm . Σίγουρα όμως και σε αυτή την κατηγορία θα περιμένουμε καλύτερα αποτελέσματα μετά το στάδιο εφαρμογής του αντιδραστήρα.

Πειράματα αναγνώρισης της πρωτεΐνης SIPC με τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ενζυμικής ανοσοπροσοφητικής μεθόδου (ELISA) με μονοκλωνικό αντίσωμα

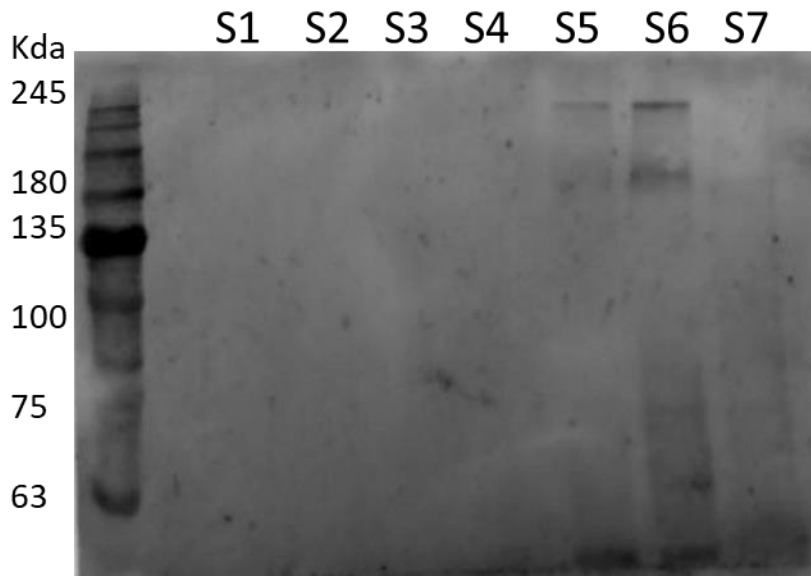
Την 1^η Ιουνίου 2022 έγινε πρόσκληση στις Δρ. Σουλτάνα Ζερβουδάκη και Δρ. Μαρία Πρωτοπαπά από το εργαστήριο SAMS, στο Oban της Σκωτίας, για τη συμμετοχή τους σε πειράματα μελέτης της βιοεπίστρωσης.

Πειράματα μελέτης της βιοεπίστρωσης έχουν ξεκινήσει ήδη στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ συμπληρωματικά του προγράμματος, με στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς των θυσανόποδων, βενθικών οργανισμών που προκαλούν, μέσω της βιοεπίστρωσης, εκτεταμένες ζημιές στα ύφαλα των πλοίων. Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Δρ. Πρωτοπαπά έχει αναπτυχθεί μια ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδος (ELISA) που βασίζεται στην αναγνώριση, με τη χρήση ενός αντισώματος, της πρωτεΐνης (SIPC) που εναποθέτει ο οργανισμός αυτός στις επιφάνειες κατά τη διάρκεια εξερεύνησης τους λίγο πριν να εγκατασταθεί. Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο με την οποία μπορεί να γίνει εντοπισμός και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης που αφήνει μόνο ένα μικρό ζώο.

Έως ότου να ετοιμαστεί το εργαστήριο του ΕΛΚΕΘΕ έγιναν προκαταρκτικά πειράματα στο ήδη στημένο εργαστήριο στο Oban. Για τα πειράματα αναγνώρισης της πρωτεΐνης SIPC σε επιφάνειες χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά δοκίμια που έμειναν στο πεδίο (στη θαλάσσια περιοχή του Oban), για 1 εβδομάδα περίπου. Στη συνέχεια ακολούθησε στο εργαστήριο απομάκρυνση του πρωτεϊνικού υλικού από τα δοκίμια και ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot). Αυτό το στάδιο έγινε με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης SIPC, ενώ στη συνέχεια στο επόμενο στάδιο έγινε η προσπάθεια ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης SIPC με την ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδο (ELISA). Όπως φαίνεται από τα πρώτα αποτελέσματα Western blot (**Εικόνα 1**), δεν εντοπίστηκε πρωτεΐνη στα δείγματα (S1, S2, S3). Τα αποτελέσματα σχετίζονται με την ποσότητα της πρωτεΐνης που ήταν εναποθετημένη στα δοκίμια, την οποία και προσπαθήσαμε να ποσοτικοποιήσουμε με την ELISA, χωρίς όμως επιτυχία.

Στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ έγιναν παρόμοια πειράματα και ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία. Πλαστικά δοκίμια τοποθετήθηκαν στον θαλάσσιο χώρο μπροστά από τις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ (Ανάβυσσο), με σκοπό την προσέλκυση και εγκατάσταση θυσανόποδων. Τα δοκίμια αυτά ανασύρονταν από το θαλάσσιο περιβάλλον σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (ύστερα από 10, 20 και 30 ημέρες). Στα δοκίμια των 10 και 20 ημερών δυστυχώς δεν εντοπίστηκαν θυσανόποδα, ενώ στα δοκίμια των 30 ημερών εντοπίστηκαν μόλις δυο ενήλικα άτομα. Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα δοκίμια των 30 ημερών. Όπως φαίνεται μόνο στα δείγματα S5 και S6 εντοπίστηκε πρωτεΐνη SIPC. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς σε αυτά τα δοκίμια εντοπίστηκαν και ενήλικα άτομα θυσανόποδων. Παράλληλα έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο ELISA χωρίς κάποιο αποτέλεσμα.

Τα πειράματα αυτά θα συνεχιστούν και μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος ECOHULLCLEAN. Πρόκειται για πειράματα ιδιαίτερης σημασίας, των οποίων τα αποτελέσματα ενδέχεται να βοηθήσουν σημαντικά στην κατανόηση και αντιμετώπιση του φαινομένου της βιοεπίστρωσης.



Εικόνα 1 Αναγνώριση της πρωτεΐνης SIPC με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών (Western blot) σε δείγματα από δοκίμια, με μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-SIPC. Κάθε γραμμή περιέχει 20 μ g δείγμα (Δείγματα Σκωτίας: S1, S2, S3 ΕΛΚΕΘΕ: S4, S5, S6, S7)

Βιβλιογραφία

Utermöhl, H., 1958: Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitteilungen Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie 9, 1-38

