



Πολυτεχνείο Κρήτης

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας

« ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ
ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDPE) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΘΑΛΛΑΣΙΑΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ »

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

ΔΑΡΔΑΜΑΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ

DR. ΣΥΡΑΝΙΔΟΥ ΕΥΔΟΚΙΑ

XANIA, 2025

"Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης"

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικόλαο Καλογεράκη, επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της εργασίας και για την άριστη συνεργασία.

Επίσης να ευχαριστήσω την κ. Δανάη Βενιέρη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για το χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Dr. Συρανίδου Ευδοκία, μέλος της τριμελούς επιτροπής, με την οποία συνεργάστηκα καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας. Η βοήθειά της ήταν πολύτιμη και καθοριστική, αφού χάρη σε εκείνη και στην υπομονή που μου έδειξε κατάφερα να κατανοήσω το πείραμα και να εξελίξω τις γνώσεις μου και να ολοκληρώσω την εργασία.

Ένα μεγάλο και θερμό ευχαριστώ, χρωστάω στην Διδάκτωρ Καρκανοραχάκη Αικατερίνη η οποία με καθοδήγησε πολλές φορές στο εργαστήριο και μαζί της πραγματοποιήσα πολλές από τις μετρήσεις του πειράματός μου. Ήταν πάντα διαθέσιμη για οτιδήποτε χρειάστηκα, για κάθε μου απορία πάντα με αμέριστη υπομονή.

Ευχαριστώ ακόμα, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, και ιδιαίτερα τη Πετρούλα Σερίδου για την πολύτιμη βοήθειά της στο εργαστήριο και την συνεισφορά της καθώς βοήθησε να συντελεστεί ένα μέρος των μετρήσεων του πειράματός μου.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην συμφοιτήτριά μου, Σοφία Κυρίτση για την συνεργασία μας στο εργαστήριο, την βοήθεια, την στήριξη και την υπέροχη παρέα που κάναμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια φοίτησής μου, την αγάπη τους και τη συμπαράστασή τους.

Περίληψη

Το πλαστικό έχει καθιερωθεί πλήρως ως αναπόσπαστο στοιχείο της καθημερινής ζωής, εξυπηρετώντας ποικίλες ανάγκες της σύγχρονης κοινωνίας. Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματά του, ευθύνεται για σοβαρές περιβαλλοντικές συνέπειες, όπως η ρύπανση των θαλασσών και της ξηράς, με σημαντικές επιπτώσεις τόσο στους οργανισμούς όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Η παρουσία του στον υδάτινο κόσμο προκαλεί πληθώρα προβλημάτων, όπως μεταφορά τοξικών ρύπων μέσω της τροφικής αλυσίδας και αλλοίωση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Τα θαλάσσια πλαστικά απόβλητα ποικίλλουν σε μορφή, σύνθεση και μέγεθος, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα πλαστικά pellets. Λόγω της ευρείας διασποράς τους, ακόμα και σε απομακρυσμένες περιοχές όπως η Ανταρκτική, και της ανθεκτικότητάς τους στην αποδόμηση, τα πλαστικά έχουν καταστεί παγκόσμιο περιβαλλοντικό πρόβλημα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της ικανότητας βιοαποδόμησης γερασμένων μικροπλαστικών σωματιδίων πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE) από θαλάσσιους μικροοργανισμούς, οι οποίοι συλλέχθηκαν από την πελαγική ζώνη του κόλπου της Σούδας στα Χανιά. Τα μικροσφαιρίδια (pellets) υπέστησαν πεντάμηνη έκθεση σε UV-A ακτινοβολία, προσομοιώνοντας συνθήκες φωτοαποδόμησης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο, αρχικά χωρίς προσθήκη θρεπτικών ουσιών και έπειτα με προσθήκη γλυκόζης, για να αξιολογηθεί η επίδρασή της στη βιοαποδόμηση. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν επικεντρώθηκαν τόσο στο πολυμερές όσο και στο βιοφίλμ που σχηματίστηκε στην επιφάνειά του. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βάρους, κατανομής του μεγέθους μικροπλαστικών, φασματοσκοπία υπέρυθρου με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης, συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) και ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακής ανάπτυξης, ανάπτυξης των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (πρωτεΐνες) και μέτρηση κυττάρων στο πολυμερές και το βιοφίλμ αντίστοιχα.

Συνολικά, διαπιστώθηκε ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί ήταν ικανοί να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν στις συνθήκες του πειράματος, ανεξαρτήτως της παρουσίας πρόσθετων θρεπτικών ουσιών. Ωστόσο, η προσθήκη γλυκόζης ως εναλλακτική πηγή άνθρακα φάνηκε να αυξάνει τη μικροβιακή δραστηριότητα, χωρίς όμως να επηρεάζει σημαντικά την βιοαποδόμηση του HDPE.

Abstract

Plastic has become fully established as an integral part of everyday life, serving a wide range of needs in modern society. Despite its numerous advantages, it is responsible for serious environmental consequences, such as pollution of the seas and land, with significant impacts on both organisms and human health. Its presence in the aquatic environment causes a multitude of problems, including the transfer of toxic pollutants through the food chain and the disruption of marine ecosystems. Marine plastic waste varies in form, composition, and size, with plastic pellets being a characteristic example. Due to their widespread dispersion, even in remote areas such as Antarctica, and their resistance to degradation, plastics have become a global environmental issue.

This thesis focuses on the study of the biodegradation potential of aged high-density polyethylene (HDPE) microplastic particles by marine microorganisms collected from the pelagic zone of the Souda Bay in Chania, Crete. The microspheres (pellets) underwent a five-month exposure to UV-A radiation to simulate photodegradation conditions. Subsequently, experiments were conducted in a simulated marine microcosm, initially without the addition of nutrients and later with the addition of glucose, in order to assess its effect on biodegradation. The analyses performed focused both on the polymer itself and on the biofilm formed on its surface. Measurements included weight, microplastic size distribution, infrared spectroscopy using attenuated total reflectance (ATR), dissolved organic carbon (DOC) concentration, and quantitative determination of microbial growth, development of extracellular polymeric substances (proteins), and cell counts on both the polymer and the biofilm.

Overall, it was found that the marine microorganisms were capable of growing and surviving under the experimental conditions, regardless of the presence of added nutrients. However, the addition of glucose as an alternative carbon source appeared to enhance microbial activity, although it did not significantly affect the biodegradation of HDPE.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract.....	5
1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Πλαστικά	10
1.2. Μικροπλαστικά.....	12
1.3. Αποδόμηση Πλαστικών.....	12
1.3.1. Βιοαποδόμηση	13
1.3.2. Αποδόμηση πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	15
1.4. Πολυαιθυλένιο (PE).....	16
1.4.1. Πολυαιθυλένιο Υψηλής Πυκνότητας (HDPE)	18
1.5. Πλαστικά στο υδάτινο περιβάλλον.....	20
1.6. Επιπτώσεις για το υδάτινο περιβάλλον και μόλυνση αυτού από τα πλαστικά.....	22
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.1. Υλικά.....	24
3.2. Μέθοδοι	25
3.2.1. Διαμόρφωση Πειράματος	25
3.2.2. Δειγματοληψία.....	29
3.2.3. Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet) ..	30
3.2.4. Μέτρηση Κυττάρων	30
3.2.5. Προσδιορισμός Βάρους.....	31
3.2.6. Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS)	32
3.2.7. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)	33
3.2.8. Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών	36
3.2.9. Κυτταρομετρία ροής (Κυτταρόμετρο CytoFLEX).....	37
3.2.10. Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC)	39
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	41
4.1. Ακτινοβόληση μικροσφαιριδίων HDPE (pellets).....	41
4.2. Αποτελέσματα Μείωσης Βάρους Μικροσφαιριδίων	43
4.3. Αποτελέσματα Ανάπτυξης Βιοφίλμ – Χρώσης Δειγμάτων Με Κρυσταλλικό Ιώδες ...	43
4.4. Αποτελέσματα Προσδιορισμού Ολικών Πρωτεϊνών.....	45

4.5. Υπολογισμός Κυττάρων (Κυτταρόμετρο CytoFLEX).....	47
4.6. Αποτελέσματα διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στην υγρή φάση	49
4.7. Αποτελέσματα Κατανομής Μεγέθους Μικροπλαστικών	51
4.7.1. Διαγράμματα κατανομής διαμέτρου μικροπλαστικών πρώτου πειραματικού μέρους	52
4.7.2. Διαγράμματα κατανομής διαμέτρου μικροπλαστικών δευτέρου πειραματικού μέρους	55
4.8. Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)	57
4.8.1. Δείκτες Κετόνης και Εστέρα.....	59
4.8.2. Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού	61
4.8.3. Κρυσταλλικότητα	62
5. Συμπεράσματα.....	63
6. Βιβλιογραφία	65

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Παγκόσμια Παραγωγή Πλαστικών για το 2021 (Plastics-the Facts, 2022).	10
Εικόνα 2: Τύποι διαφορετικών πλαστικών αποβλήτων που παρήχθησαν παγκοσμίως το 2015 (National Geographic, 2018).	11
Εικόνα 3: Μικροπλαστικά: Μικρόκοκκοι (α), σφαιρίδια (β), κομμάτια πλαστικού(γ).	12
Εικόνα 4: Μηχανισμοί αποδόμησης πλαστικών στο περιβάλλον (Andrady, 2015).	13
Εικόνα 5: Στάδια βιοαποδόμησης πλαστικών (Jacquin et al., 2019).	14
Εικόνα 6 Μονοπάτια αποδόμησης πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Klein et al., 2018).	16
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των χημικών δομών αιθυλενίου και πολυαιθυλενίου.	17
Εικόνα 8: Προϊόντα Πολυαιθυλενίου Υψηλής Πυκνότητας (HDPE) και Σύμβολα Ανακύκλωσης Πλαστικών (https://www.istockphoto.com/Search/2/Image-Film?Phrase=HDPE , n.d.).	19
Εικόνα 9 Διάγραμμα των αλλαγών στο πολυαιθυλένιο που υποβλήθηκε σε ηλιακή ακτινοβολία σε παραλία (Andrady, 2017).	20
Εικόνα 10: Διάγραμμα της πηγής πλαστικών αποβλήτων στον ωκεανό και της δεξαμενής αποβλήτων στον ωκεανό(García Rellán et al., 2023).	21
Εικόνα 11: Πλαστικά απορρίμματα σε θάλασσες και ακτές (https://www.istockphoto.com/Search/2/Image-Film?Phrase=plastics%20in%20sea , n.d.).	22
Εικόνα 12: Πιθανοί τρόποι εισαγωγής μικροπλαστικών στον ανθρώπινο οργανισμό(Senathirajah et al., 2021).	23
Εικόνα 13 Pellets HDPE σε UV-A ακτινοβολίας.....	24
Εικόνα 14: Προετοιμασία Δειγμάτων	26
Εικόνα 15: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών (Maier, 2009).	27
Εικόνα 16: Falcon και Φλάσκες δειγμάτων 1,2,3 κατά την διάρκεια της πρώτης δειγματοληψίας.	30

Εικόνα 17: (Αριστερά) Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες. (Δεξιά) Τέλος δειγματοληψίας – Τοποθέτηση βιοφίλμ σε falcon και Eppendorf για μελλοντικές αναλύσεις.....	31
Εικόνα 18: Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών.....	32
Εικόνα 19: Μέτρηση στο ATR του εργαστηρίου.....	34
Εικόνα 20: SHIMADZU SALD-7500 nano (https://Www.Ssi.Shimadzu.Com/ , n.d.).....	36
Εικόνα 21: (Αριστερά) Σκέδαση/Περίθλαση φωτός από το σωματίδιο (Δεξιά) Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός (https://Www.Ssi.Shimadzu.Com/ , n.d.).....	37
Εικόνα 22: Ανάλυση δεδομένων κυτταρόμετρου με ιστόγραμμα και δυσδιάστατο γράφημα (Vassilenko & Baldwin, 2014).....	38
Εικόνα 23: Κυτταρόμετρο CytoFLEX (https://us.vwr.com/cms/beckman_coulter_cytoflex).....	39
Εικόνα 24: “Multi N/C 2100S” Analytik Jena (https://Www.Analytik-Jena.Com/Products/Chemical-Analysis/Toc-Tnb-Analysis/Toc-Tnb/Multi-n-c-Series/ , n.d.).....	40
Εικόνα 25: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέτρηση.....	41

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1:Συνολική ακτινοβολία έκθεσης σε περίοδο 5 μηνών.....	25
Διάγραμμα 2: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στο πρώτο μέρος του πειράματος.....	44
Διάγραμμα 3: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στο δεύτερο μέρος του πειράματος.....	44
Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα 1-12 (χωρίς θρεπτικό).....	46
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα 13-24 (προσθήκη θρεπτικού).....	47
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των HDPE pellets.....	48
Διάγραμμα 7: Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στο πρώτο μέρος του πειράματος (Δείγματα 1-12).....	49
Διάγραμμα 8: Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στο δεύτερο μέρος του πειράματος (Δείγματα 13-24).....	50
Διάγραμμα 9: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους (Number) στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).....	52
Διάγραμμα 10: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο (Volume) στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).....	53
Διάγραμμα 11: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους (Number) στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).....	55
Διάγραμμα 12: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο (Volume) στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).....	56
Διάγραμμα 13: Φάσμα ATR-FTIR μικροπλαστικού HDPE που έχει εκτεθεί σε UV-A ακτινοβολία.....	57
Διάγραμμα 14: Φάσματα ATR-FTIR του πρώτου πειραματικού μέρους (Δείγματα 1-12).....	58
Διάγραμμα 15: Φάσματα ATR-FTIR του δεύτερου πειραματικού μέρους (Δείγματα 13-24).....	58
Διάγραμμα 16: Δείκτες κετόνης και εστέρα στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).....	59
Διάγραμμα 17: Δείκτες κετόνης και εστέρα στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).....	60
Διάγραμμα 18: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).....	61

Διάγραμμα 19: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού στα δείγματα με θρεπτικό (13-24)....	61
Διάγραμμα 20: Δείκτες Κρυσταλλικότητας στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12)	62
Διάγραμμα 21: Δείκτες Κρυσταλλικότητας στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).....	63

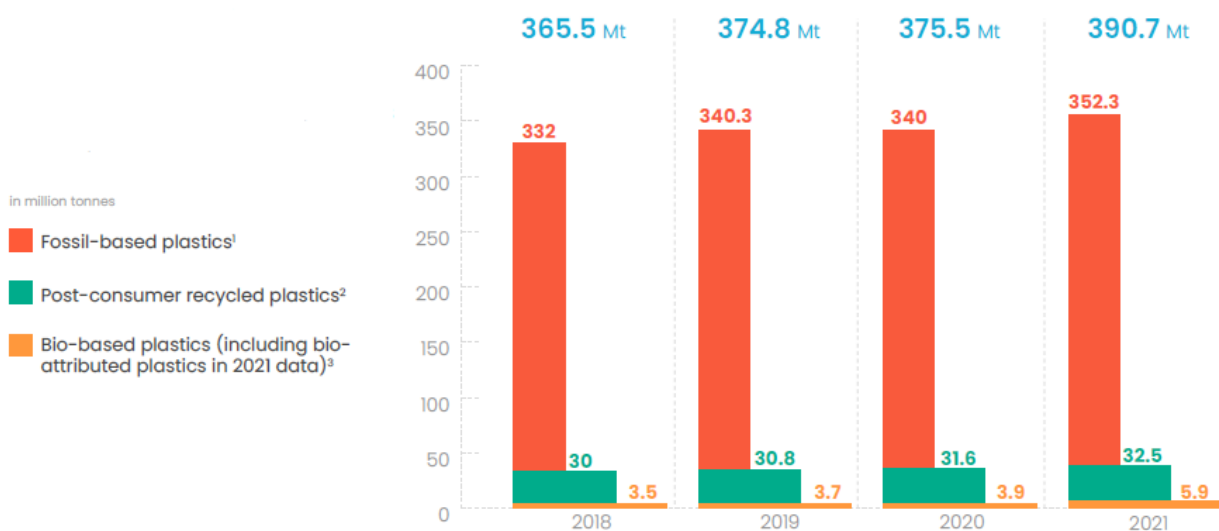
Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Μηχανισμοί αποδόμησης στις σε διαφορετικές ζώνες στο θαλάσσιο περιβάλλον (Andrady, 2015).....	15
Πίνακας 2: Μηχανικές ιδιότητες πολυαιθυλενίου (Kumar et al., 2022).	17
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές ομάδες και κυματοαριθμοί.	35

1. Εισαγωγή

1.1. Πλαστικά

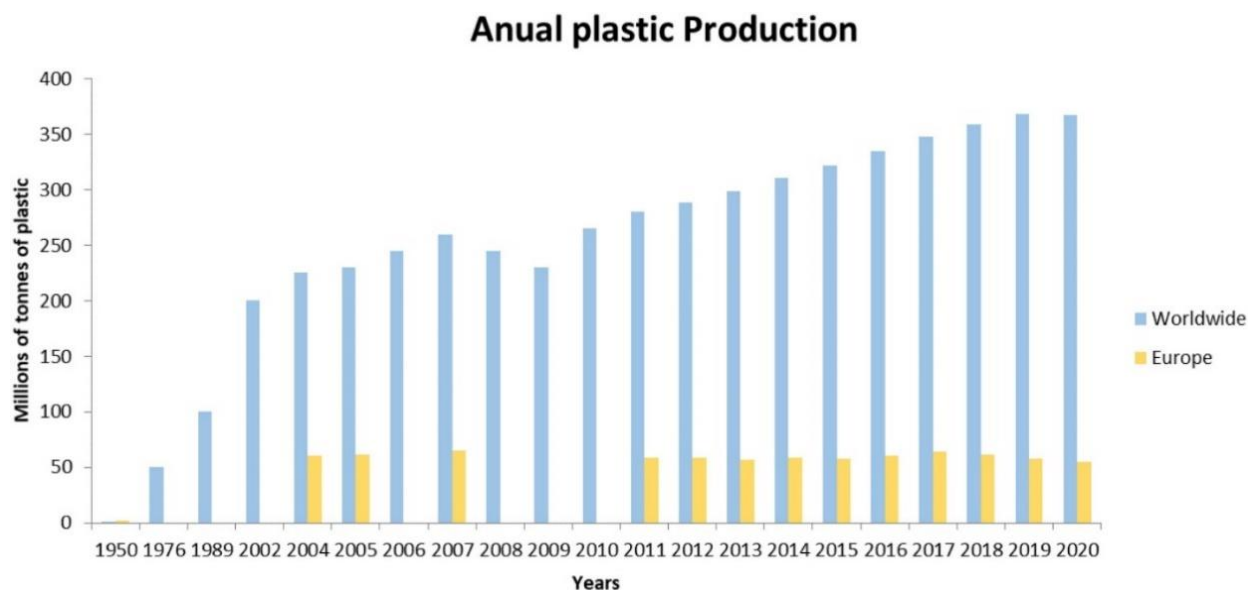
Από τη δεκαετία του 1950, τα πλαστικά, χάρη στη μαζική παραγωγή και τις ποικίλες εφαρμογές τους, έχουν διευκολύνει σημαντικά την ανθρώπινη ζωή. Έτσι, είναι πλέον αναπόσπαστο μέρος του σύγχρονου πολιτισμού (Albertsson et al., 1994). Η ζωή χωρίς αυτά μοιάζει σχεδόν αδύνατη, γεγονός που αποδίδεται στην ευελιξία τους, τη μοναδική μοριακή δομή και τις διάφορες ιδιότητες τους. Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή συνθετικών πολυμερών αγγίζει περίπου τους 140 μετρικούς τόνους. Παρ' όλα αυτά, μόνο ένα μικρό ποσοστό γύρω στο 10% ανακυκλώνεται ή επαναχρησιμοποιείται. Ο κύριος λόγος για αυτό το χαμηλό ποσοστό είναι οι περιορισμένες διαθέσιμες επιλογές διαχείρισης αποβλήτων και η ανεπαρκής μέριμνα για τη διαχείριση στερεών αποβλήτων (Rani, 2021). Τα πλαστικά είναι από τη φύση τους υλικά με βάση τον άνθρακα, ο οποίος μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές. Ιστορικά, οι πόροι που βασίζονται στα ορυκτά καύσιμα, όπως το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο, αποτέλεσαν τις κύριες πηγές άνθρακα για την κατασκευή πλαστικών. Ωστόσο, εκτός από τα ορυκτά καύσιμα, ως πρώτη ύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η βιομάζα. Τα πλαστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, να ανακυκλωθούν ή ακόμα και να καούν για την παραγωγή ενέργειας (Plastics Europe 2022).



Εικόνα 1: Παγκόσμια Παραγωγή Πλαστικών για το 2021 (Plastics-the Facts, 2022).

Η μεγάλη αντοχή, η χαμηλή πυκνότητα, η χαμηλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα (καλοί μονωτές) αποτελούν ορισμένες από τις βασικές ιδιότητες των πλαστικών. Χάρη στην πολυλειτουργικότητα και την πολυχρηστικότητα τους, το χαμηλό κόστος παραγωγής και την ικανότητα τους να διαμορφώνονται σε οποιοδήποτε σχήμα, τα πλαστικά έχουν καταστεί το κύριο υλικό για τις περισσότερες ανθρώπινες εφαρμογές. Το 2021, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών αυξήθηκε κατά 4%, ξεπερνώντας τους 390 εκατομμύρια τόνους. Σήμερα, η

πλειονότητα των πλαστικών εξακολουθεί να παράγεται από πρώτες ύλες με βάση τα ορυκτά καύσιμα. Το ίδιο έτος, το 90,2% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών βασίστηκε σε ορυκτά καύσιμα. Παρόλα αυτά, ένα μέρος των πλαστικών παράγεται, μετατρέπεται, χρησιμοποιείται και διαχειρίζεται με βιώσιμο τρόπο. Τα πλαστικά που ανακυκλώνονται μετά την κατανάλωση και τα πλαστικά βιολογικής προέλευσης ή βιολογικής απόδοσης αντιπροσώπευαν αντίστοιχα το 8,3% και το 1,5% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών (Plastics-the Facts, 2022). Τα πλαστικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε τομείς όπως η αυτοκινητοβιομηχανία, η συσκευασία και τα τρόφιμα, αυξάνοντας την εξάρτηση των καταναλωτών από αυτά. Ως αποτέλεσμα, η ζήτηση για πλαστικά προϊόντα αυξάνεται διαρκώς (Al-Salem, 2019). Ωστόσο, η απώλεια αξίας υλικών λόγω της μίας χρήσης, τα χαμηλά ποσοστά ανακύκλωσης, καθώς και οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, το κλίμα και στην ανθρώπινη υγεία αποτελούν σημαντικά προβλήματα που σχετίζονται με τα πλαστικά (European Parliament, 2018). Το 2014, το Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP) κατέταξε την πλαστική ρύπανση ανάμεσα στα 10 κορυφαία αναδυόμενα παγκόσμια περιβαλλοντικά προβλήματα (Peng et al., 2020). Η πλαστική ρύπανση εκτιμάται ότι προκαλεί οικονομική ζημιά ύψους 13 δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως (Nielsen et al., 2020). Αποτελεί σοβαρή απειλή για τα θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα παγκοσμίως (Derraik, 2002), με την προσοχή να επικεντρώνεται σήμερα κυρίως στη θαλάσσια ρύπανση. Σύμφωνα με τους (Jambeck et al., 2015) η Κίνα, η Ινδονησία και οι Φιλιππίνες είναι οι χώρες που παράγουν τα περισσότερα πλαστικά θαλάσσια απορρίμματα.



Εικόνα 2: Τύποι διαφορετικών πλαστικών αποβλήτων που παρήχθησαν παγκοσμίως το 2015 (National Geographic, 2018).

1.2. Μικροπλαστικά

Τα μικροπλαστικά είναι μικροσκοπικά πλαστικά σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 5 χιλιοστών (Thompson et al., 2004). Τα μικροπλαστικά κατηγοριοποιούνται βάσει μεγέθους, όμως υπάρχει ασυμφωνία στη βιβλιογραφία σχετικά με το ανώτατο μέγεθος και το διαχωρισμό των κλάσεων μεγέθους. Προκαλούν διάχυτη περιβαλλοντική ανησυχία λόγω της ευρείας παρουσίας τους σε διάφορα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ωκεανών, των ποταμών, των λιμνών, ακόμη και του εδάφους. Η παρουσία μικροπλαστικών στο περιβάλλον μπορεί να εξηγηθεί με τρεις τρόπους. Πρώτον, τα καλλυντικά προϊόντα και τα προϊόντα καθαρισμού, περιέχουν πλαστικούς μικρόκοκκους, αποτελούμενους κυρίως από πολυαιθυλένιο (PE), οι οποίοι δεν απομακρύνονται κατά την επεξεργασία αστικών λυμάτων και τελικά καταλήγουν σε υδάτινα σώματα. Δεύτερον, τα πλαστικά σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στη βιομηχανία πλαστικών μπορούν να διαφύγουν στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της μεταφοράς. Παράγοντες όπως η επιφανειακή απορροή, τα θαλάσσια ρεύματα και ο άνεμος συμβάλλουν στη διασπορά αυτών των σφαιριδίων από τις αρχικές τους θέσεις (EPA, 1993). Περίπου 4360 τόνοι μικρόκοκκων μεγέθους από 10^{-6} έως 10^{-8} m εκτιμάται ότι χρησιμοποιήθηκαν στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2012 (UNEP, 2015). Τέλος, τα πλαστικά υλικά στο περιβάλλον υπόκεινται σε διάφορες επιδράσεις όπως η μηχανική καταπόνηση, η ηλιακή ακτινοβολία, οι υψηλές θερμοκρασίες και η δράση μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα οι παραπάνω παράγοντες να προκαλούν τη διάσπαση των πλαστικών σε μικρότερα θραύσματα (Andrady, 2003; Sivan, 2011). Οι μικρόκοκκοι και τα σφαιρίδια αναφέρονται ως πρωτογενή μικροπλαστικά, ενώ τα μικρότερα θραύσματα θεωρούνται δευτερογενή μικροπλαστικά.

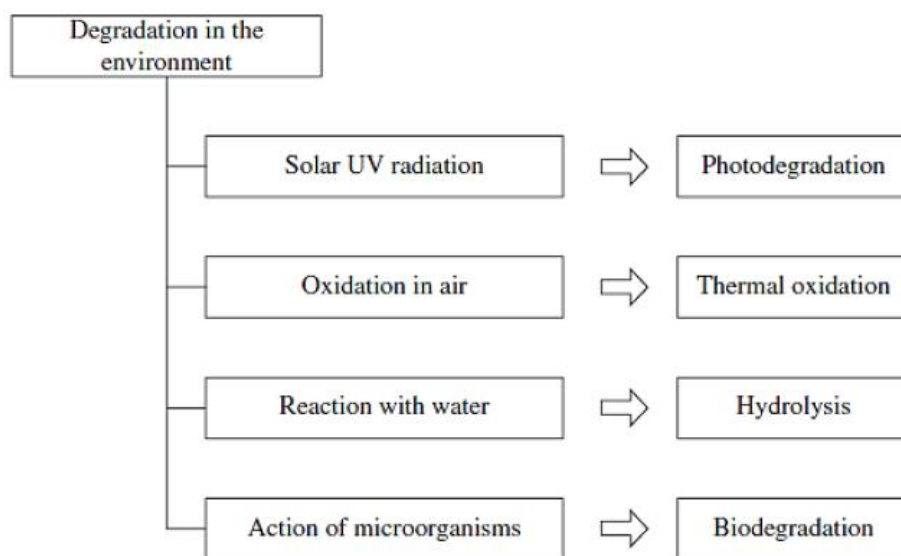


Εικόνα 3: Μικροπλαστικά: Μικρόκοκκοι (α), σφαιρίδια (β), κομμάτια πλαστικού(γ).

1.3. Αποδόμηση Πλαστικών

Η εκτεταμένη χρήση μη βιοδιασπώμενων πλαστικών από ανθρωπογενείς δραστηριότητες αποτελεί σοβαρή απειλή για το περιβάλλον, κυρίως λόγω της μαζικής διάθεσης αποβλήτων, των προβλημάτων στους χώρους υγειονομικής ταφής και της αυξανόμενης ρύπανσης των υδάτων και του εδάφους. Οι οργανισμοί κινδυνεύουν όταν καταναλώνουν πλαστικό ως τροφή. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η κατάλληλη αποδόμηση του πλαστικού για τη μείωση των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Η αποδόμηση πολυμερών ορίζεται ως μια αλλαγή στις ιδιότητές τους, όπως η αντοχή σε εφελκυσμό, το χρώμα και το σχήμα, υπό την

επίδραση ενός ή περισσότερων περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη θερμότητα, το φως ή χημικές ουσίες, όπως οξέα, αλκάλια και ορισμένα άλατα (Rani, 2021) και μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία αλλοιώσεων στην επιφάνεια των πλαστικών υλικών όπως ρωγμές και αποχρωματισμό. Ακόμα μπορούν να προκαλέσουν υποβάθμιση των ευνοϊκών ιδιοτήτων των υλικών, όπως την υψηλή τους αντοχή, τη δυνατότητα κάμψης τους ή και την πλήρη χημική αποσύνθεση τους (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009a; Moore, 2008). Η υποβάθμιση του πλαστικού με οποιεσδήποτε και η ανακύκλωση των πλαστικών αποβλήτων είναι επωφελής για τον περιορισμό της ρύπανσης. Οι μηχανισμοί αποδόμησης πολυμερών είναι, η φωτοαποδόμηση, η βιοαποδόμηση, η θερμική οξείδωση και η υδρόλυση (Jeyakumar et al., 2013). Φωτοαποδόμηση είναι η διαδικασία αποδόμησης του υλικού κάτω από το ηλιακό φως που θεωρείται ως μία από τις κύριες αιτίες που υποβαθμίζει τα πολυμερή σε συνθήκες περιβάλλοντος. Συνήθως, τα συνθετικά πολυμερή είναι ευάλωτα στην υποβάθμιση που ξεκινά από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και το ορατό φως. Η πλαστική αποδόμηση έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό των μεγαλύτερων πλαστικών σωματιδίων σε μικρότερα πλαστικά σωματίδια με συνδυασμό αβιοτικών παραγόντων, όπως είναι η υπεριώδη ακτινοβολία και βιοτικών παραγόντων, όπως είναι η εξωκυτταρική ενζυματική δράση (Lucas et al., 2008). Ένας άλλος παράγοντας που περιπλέκει την έρευνα της αποδόμησης των πλαστικών είναι η πολυπλοκότητα των πλαστικών υλικών όσον αφορά τις πιθανές δομές και διατάξεις, καθιστώντας τη διαδικασία αυτή αρκετά δύσκολη. Η αβιοτική αποδόμηση και η βιοαποδόμηση συνήθως εξετάζονται χρησιμοποιώντας φυσικές μεθόδους (Palm et al., 2019).

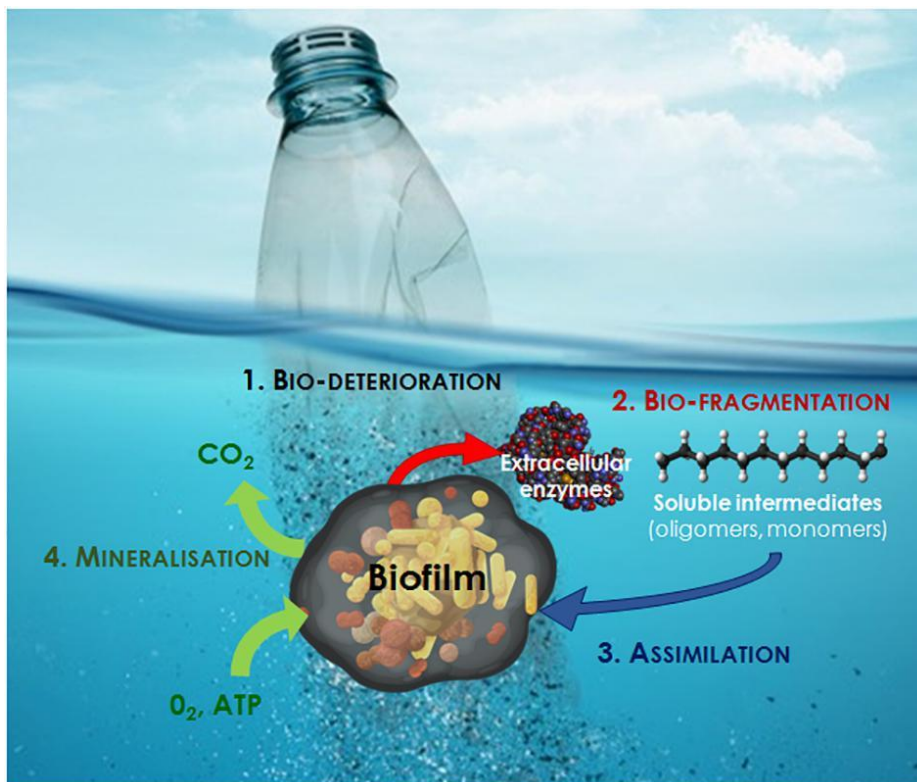


Εικόνα 4: Μηχανισμοί αποδόμησης πλαστικών στο περιβάλλον (Andrady, 2015).

1.3.1. Βιοαποδόμηση

Η βιοαποδόμηση είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται η διάσπαση της οργανικής ύλης από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, μεθανίου, νερού, ανόργανων ενώσεων ή βιομάζας (Dennis D. Focht, 2014). Η βιοαποδόμηση συνθετικών πολυμερών μπορεί να συμβεί παρουσία περισσειας

οξυγόνου (αερόβια βιοδιάσπαση) ή σε περιβάλλον με έλλειψη οξυγόνου (αναερόβια βιοδιάσπαση) (Ahmed et al., 2018). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, οι πλευρικές αλυσίδες ή η δομή του πολυμερούς διασπώνται, σχηματίζοντας μικρότερες μονάδες πολυμερούς ή μονομερή με τη βοήθεια εξωκυτταρικών ενζύμων (Gu & Gu, 2005). Συνήθως, το αρχικό βήμα περιλαμβάνει ενζυματική υδρόλυση αμιδίων, εστέρων ή δεσμών ουρεθάνης. Αυτά τα μικρότερα μόρια μπορούν στη συνέχεια να απορροφηθούν από τους μικροοργανισμούς, περνώντας μέσα από τις ημιπερατές μεμβράνες τους και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας και άνθρακα (Ahmed et al., 2018).



Εικόνα 5: Στάδια βιοαποδόμησης πλαστικών (Jacquin et al., 2019).

Ωστόσο, πολλά πλαστικά συμπεριλαμβανομένου του πολυαιθυλενίου και του πολυπροπυλενίου (πολυολεφίνες), θεωρούνται μη βιοδιασπώμενα (Tokiwa et al., 2009). Η αντοχή τους στη βιοαποδόμηση είναι αποτέλεσμα τόσο βιοτικών όσο και αβιοτικών παραγόντων. Οι πολυολεφίνες είναι η μεγαλύτερη ομάδα θερμοπλαστικών. Είναι πολυμερή που αποτελούνται από απλές ολεφίνες που δεν είναι εύκολα προσβάσιμες σε μικροοργανισμούς για βιοαποδόμηση (Fotoroulou & Karapanagioti, 2017). Ενώ ο αλκυλικός σκελετός των πολυολεφίνων φέρει μεγάλη αντίσταση στην υδρόλυση, ωστόσο είναι πιο ευάλωτος σε οξειδωτική αποδόμηση. Για να αντιμετωπιστεί αυτό, ενσωματώνονται πρόσθετα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής. Μετά από την αρχική διαδικασία οξείδωσης, η αποδόμηση μπορεί να συμβεί μέσα σε λίγες εβδομάδες, οδηγώντας στο σχηματισμό μικρότερων και οξειδωμένων μικροπλαστικών που είναι πιο ευαίσθητα στη μικροβιακή αποδόμηση. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία οφείλεται στην υψηλότερη αναλογία όγκου προς

επιφάνεια και στα αυξημένα επίπεδα οξειδωσης που προκύπτουν από τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων (Weinstein et al., 2016).

1.3.2. Αποδόμηση πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον

Η αποδόμηση των πλαστικών συμβαίνει με βραδύτερο ρυθμό στα θαλάσσια περιβάλλοντα σε σύγκριση με τα χερσαία περιβάλλοντα. Αυτό συμβαίνει επειδή οι χαμηλές θερμοκρασίες και η μειωμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, περιορίζουν την οξειδωση του πολυμερούς. Ωστόσο, στις παράκτιες περιοχές, η αποδόμηση συμβαίνει ταχύτερα λόγω της άμεσης έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και την κυματική δραστηριότητα (Barnes et al., 2009b). Οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αποδόμηση των πλαστικών στο υδάτινο περιβάλλον περιλαμβάνουν (Andrady, 2011):

- Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία
- Διακυμάνσεις θερμοκρασίας
- Μηχανική καταπόνηση που προκαλείται από κύματα, τριβή και τυρβώδη ρεύματα
- Διαθεσιμότητα οξυγόνου

Ο ρυθμός και οι μηχανισμοί αποδόμησης μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των θαλάσσιων ζωνών, λόγω των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας. Οι θαλάσσιες ζώνες κατηγοριοποιούνται ως εξής (Andrady, 2015):

- Παράκτια ζώνη (Supralittoral Zone)
- Ζώνη επιφανειακών υδάτων (Surface Water Zone)
- Ζώνη βαθέων υδάτων και ιζημάτων (Deep water and sediment zone)

Πίνακας 1: Μηχανισμοί αποδόμησης στις σε διαφορετικές ζώνες στο θαλάσσιο περιβάλλον (Andrady, 2015).

Zone	Description	Agencies	
Supralittoral	Beach above water line	Photodegradation (accelerated) ^a	~20% oxygen
Intertidal	Beach between tidal marks	Photodegradation	~20% oxygen
Surface water	Water surface	Photodegradation	~5 ml/l of seawater
Deep water and sediment	Ocean bottom	Very slow biodegradation	—

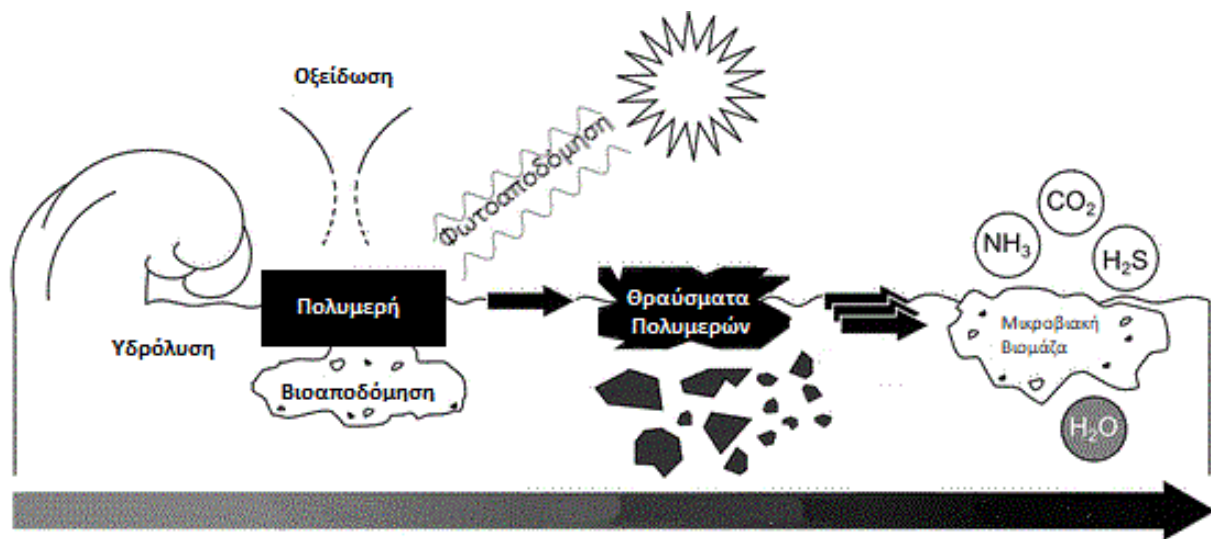
^aThe degradation is accelerated because of high sample temperatures.

Παράκτια ζώνη: Τα πλαστικά στην παράκτια ζώνη υφίστανται κυρίως φωτο-οξειδωτική αποδόμηση λόγω της άμεσης έκθεσης στο ηλιακό φως. Επίσης απορροφούν την ηλιακή υπέρυθρη ακτινοβολία, με αποτέλεσμα η επιφανειακή τους θερμοκρασία να αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ιδιαίτερα για τα πιο σκουρόχρωμα πλαστικά. Αυτή η αύξηση της θερμοκρασίας, γνωστή ως «συσσώρευση θερμότητας», επηρεάζεται σε μεγάλο ποσοστό από τις εποχιακές και καιρικές συνθήκες. Ο

συνδυασμός υψηλών θερμοκρασιών και η UV-B ακτινοβολία, επιταχύνει σημαντικά την οξειδωτική υποβάθμιση τους (Andrady, 2015).

Ζώνη επιφανειακών υδάτων: Τα πλαστικά που υπάρχουν στην επιφάνεια του νερού αποδομούνται με βραδύτερο ρυθμό από εκείνα της παράκτιας ζώνης. Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν σε αυτό το φαινόμενο: Α) Το θαλασσινό νερό διατηρεί την επιφανειακή θερμοκρασία των πλαστικών χαμηλή, εμποδίζοντας τη συσσώρευση θερμότητας και επιβραδύνοντας την υποβάθμιση. Β) Βιοφίλμ σχηματίζεται στην πλαστική επιφάνεια, ενεργώντας ως ένα παχύ, αδιαφανές στρώμα που την προστατεύει από την ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία και μειώνει την οξείδωση. Γ) Τα ποσοστά οξείδωσης εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου και το θαλασσινό νερό έχει χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου σε σύγκριση με τον αέρα (Andrady, 2015).

Βαθιά νερά και θαλάσσιος πυθμένας: Σε αυτή τη ζώνη, η αποδόμηση των πλαστικών συμβαίνει αποκλειστικά μέσω της βιοαποδόμησης, η οποία προχωρά αργά λόγω των χαμηλών επιπέδων οξυγόνου και των χαμηλών θερμοκρασιών. Το ψυχρό με έλλειψη οξυγόνου περιβάλλον, εμποδίζει την οξειδωτική αποδόμηση, ενώ η φωτοαποδόμηση δεν είναι δυνατή (Andrady, 2015).



Εικόνα 6 Μονοπάτια αποδόμησης πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Klein et al., 2018).

1.4. Πολυαιθυλένιο (PE)

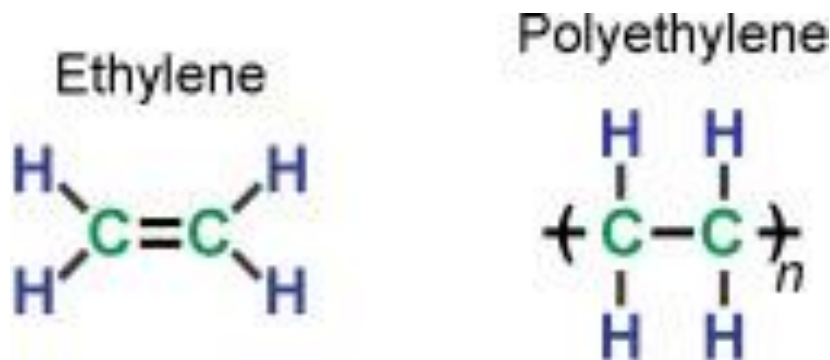
Το πολυαιθυλένιο (PE), παρά το γεγονός ότι έχει την απλούστερη βασική δομή οποιουδήποτε πολυμερούς, είναι το πλαστικό υλικό με τη μεγαλύτερη ποσότητα. Τα κύρια ελκυστικά χαρακτηριστικά του PE είναι η χαμηλή τιμή του, η εξαιρετική ηλεκτρική μόνωση, η πολύ καλή χημική αντοχή, η καλή επεξεργασιμότητα, η σκληρότητα, η ευελιξία και το γεγονός ότι είναι διάφανες. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1950, όλα τα εμπορικά PE παράγονταν με

διεργασίες υψηλής πίεσης. Αυτές οι διεργασίες οδηγούν σε διακλαδισμένα υλικά μέτρου μέσου κατά βάρους μοριακού βάρους, $M_w < 50 \text{ kg mol}^{-1}$, ταξινομημένα ως χαμηλής πυκνότητας PE. Η ανακάλυψη ότι ορισμένες μεταλλικές ενώσεις, βασισμένες σε Cr ή σε Ti, είναι σε θέση να καταλύουν τον πολυμερισμό του αιθυλενίου σε λιγότερο ακραίες συνθήκες επέτρεψε την ελεγχόμενη σύνθεση μιας μεγάλης ποικιλίας διατάξεων PE με πολύ διαφορετικές ιδιότητες (Ronca, 2017). Το PE έχει την ικανότητα να μεταβάλλεται εύκολα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, δίνοντας έτσι σχετικά μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας, πυκνότητα και κρυσταλλικότητα, επιτρέποντας στα προϊόντα PE να έχουν προσαρμοσμένες ιδιότητες για μια ποικιλία εφαρμογών. Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) και το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) είναι ορισμένοι τύποι πλαστικών PE. Το HDPE είναι ελαφρύ και έχει καλή αντοχή σε εφελκυσμό, ενώ το LDPE έχει καλή χημική αντοχή (Kumar et al., 2022).

Πίνακας 2: Μηχανικές ιδιότητες πολυαιθυλενίου (Kumar et al., 2022).

Property	Typical value
Density (g/cm^3)	0.952–0.965
Tensile strength (MPa)	26.2–31
Strain at break (%)	11–13
Tensile modulus (GPa)	1.07
Printing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	230–260
Melting temperature ($^{\circ}\text{C}$)	130 ± 10

Το πολυαιθυλένιο είναι ένα πολυμερές που σχηματίζεται από αιθυλένιο (C_2H_4), το οποίο είναι ένα αέριο με μοριακό βάρος 28. Ο γενικός χημικός τύπος για το πολυαιθυλένιο είναι $(\text{C}_2\text{H}_4)_n$, όπου n είναι ο βαθμός πολυμερισμού. Σχηματική απεικόνιση των χημικών δομών του αιθυλενίου και του πολυαιθυλενίου παρουσιάζεται στην εικόνα 7:



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των χημικών δομών αιθυλενίου και πολυαιθυλενίου.

Για ένα πολυαιθυλένιο εξαιρετικά υψηλού μοριακού βάρους, η μοριακή αλυσίδα μπορεί να αποτελείται από έως και 200.000 επαναληπτικές μονάδες αιθυλενίου. Με άλλα λόγια, η μοριακή αλυσίδα του UHMWPE περιέχει έως και 400.000 άτομα άνθρακα. Υπάρχουν διάφορα είδη πολυαιθυλενίου (LDPE, LLDPE, HDPE, UHMWPE) που συντίθενται με διαφορετικά μοριακά βάρη και διατάξεις αλυσίδων. Το LDPE και το LLDPE αναφέρονται ως πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας και γραμμικό πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας, αντίστοιχα. Αυτά τα πολυαιθυλένια έχουν γενικά διατάξεις διακλαδισμένης και γραμμικής αλυσίδας, αντίστοιχα, το καθένα με μοριακό βάρος συνήθως μικρότερο από 50.000 g / mol. Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) είναι ένα γραμμικό πολυμερές με μοριακό βάρος έως 200.000 g / mol. Το UHMWPE, συγκριτικά, έχει μέσο μοριακό βάρος ιξώδους 6.000.000 g / mol. Στην πραγματικότητα, το μοριακό βάρος είναι τόσο «εξαιρετικά υψηλό» που δεν μπορεί να μετρηθεί απευθείας με συμβατικά μέσα και πρέπει αντ' αυτού να συναχθεί από το εγγενές ιξώδες του. Το UHMWPE είναι σημαντικά πιο ανθεκτικό στην τριβή και τη φθορά από το HDPE (Kurtz, 2016). Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, το UHMWPE ταξινομήθηκε ως μορφή πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE) μεταξύ των μελών της βιομηχανίας πολυμερών. Έτσι, οι προηγούμενες αναφορές του Charnley στο UHMWPE ως HDPE είναι τεχνικά ακριβείς για την εποχή του, αλλά συνέβαλαν σε κάποια σύγχυση με την πάροδο των ετών ως προς το τι ακριβώς είδη πολυαιθυλενίων έχουν χρησιμοποιηθεί. Από μια προσεκτική ανάγνωση των έργων του Charnley, είναι σαφές ότι το HDPE χρησιμοποιείται συνώνυμα με το RCH-1000, την εμπορική ονομασία του UHMWPE που παράγεται από τη Hoechst στη Γερμανία (Kurtz, 2016).

1.4.1. Πολυαιθυλένιο Υψηλής Πυκνότητας (HDPE)

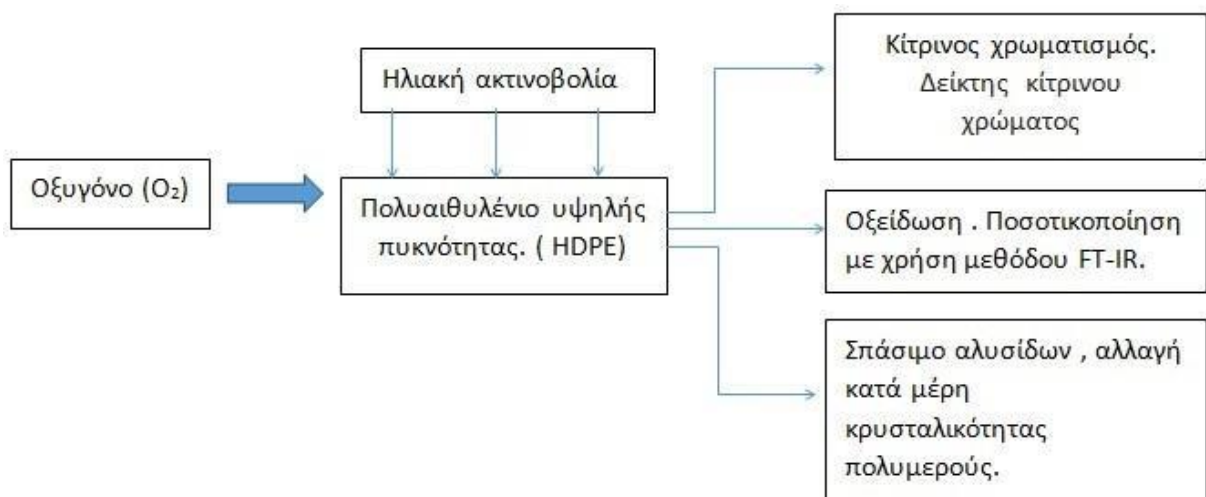
Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) είναι ένα συνθετικό πολυμερές υψηλού μοριακού βάρους γνωστό για την υδρόφοβη φύση του. Η φυσική διαδικασία βιοαποδόμησης του HDPE είναι εξαιρετικά αργή, καθώς οι μικροοργανισμοί δεν έχουν εξελιχθεί πλήρως για να αποδομήσουν το συνθετικό πολυαιθυλένιο απουσία αβιοτικών παραγόντων. Με την πάροδο του χρόνου, έχουν γίνει διάφορες τροποποιήσεις στο HDPE για να ενισχυθεί η σταθερότητα και η αποδομησιμότητα του. Έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αύξηση της σταθερότητας του πολυαιθυλενίου, με αποτέλεσμα την προσθήκη προ-οξειδωτικών, σύνθετων υλικών κυτταρίνης ή μορίων αμύλου κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού για τη βελτίωση της βιοδιασπασιμότητας του. Καθώς η κατανάλωση HDPE έχει αυξηθεί σημαντικά, η σωστή διαχείριση των αποβλήτων του HDPE έχει καταστεί ζωτικής σημασίας, οδηγώντας στην ανάπτυξη μιας παράλληλης βιομηχανίας (Balasubramanian et al., 2014). Η ακατάλληλη διάθεση του HDPE στο περιβάλλον δημιουργεί σοβαρά προβλήματα και απειλεί το βιολογικό οικοσύστημα. Τα συσσωρευμένα θραύσματα πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας, στα υδάτινα σώματα μπορούν να προκαλέσουν μπλοκαρίσματα στο πεπτικό σύστημα των ψαριών, των πτηνών και των θαλάσσιων θηλαστικών, επηρεάζοντας το θαλάσσιο οικοσύστημα (Spear et al., 1995). Οι κοινές πρακτικές στις αναπτυσσόμενες χώρες περιλαμβάνουν την άμεση διάθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής ή την αποτέφρωση, οι οποίες έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις σε ολόκληρο το οικοσύστημα. Η αποτέφρωση HDPE συμβάλλει στην ατμοσφαιρική ρύπανση, απελευθερώνοντας εξαιρετικά τοξικές ουσίες που μπορούν να οδηγήσουν σε προβλήματα υγείας όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και

οι αναπνευστικές διαταραχές όπως το άσθμα. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να αντιμετωπιστεί αυτό το παγκόσμιο ζήτημα των αποβλήτων πολυαιθυλενίου και να αποκατασταθεί το φυσικό οικοσύστημα μέσω βιολογικά βιώσιμων μεθόδων που περιλαμβάνουν φυσικές διεργασίες υποβάθμισης (Sangale, 2012). Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας είναι μια θερμοπλαστική ρητίνη με πυκνότητα που κυμαίνεται από 0,94 έως 0,96 g / cm³ σε θερμοκρασία δωματίου. Περίπου το 60% του HDPE είναι κρυσταλλικό, ενώ το υπόλοιπο τμήμα είναι άμορφο. Αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες που πολυμερίζονται με τρόπο που διευκολύνει την εύκολη στοίβαξη. Το HDPE παρουσιάζει υψηλότερη κρυσταλλικότητα σε σύγκριση με άλλες πολυολεφίνες. Σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, η θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης (T_g) του HDPE είναι πολύ χαμηλή (-100°C), με αποτέλεσμα την δημιουργία εύκαμπτων μοριακών αλυσίδων. Σε ημικρυσταλλικά πολυμερή όπως το HDPE, η εφαρμοζόμενη πίεση προκαλεί διαστολή ή συμπίεση του άμορφου κλάσματος και όχι παραμόρφωση των κρυσταλλιτών. Οι μηχανικές και χημικές ιδιότητες του εξαρτώνται από παράγοντες όπως η κρυσταλλικότητα και ο βαθμός πολυμερισμού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τον δείκτη ροής τήγματος (Andrady, 2017).



Εικόνα 8: Προϊόντα Πολυαιθυλενίου Υψηλής Πυκνότητας (HDPE) και Σύμβολα Ανακύκλωσης Πλαστικών (<https://www.istockphoto.com/Search/2/Image-Film?Phrase=HDPE>, n.d.).

Η υδρόφοβη φύση των πολυολεφινών, συμπεριλαμβανομένου του HDPE, αποδίδεται στην παρουσία απλών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα. Ενώ είναι ανθεκτικά στην υδρολυτική αποδόμηση, οι οξειδωτικοί μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποδόμησή τους. Οι σταθεροποιητές UV προστίθενται συνήθως στις πολυολεφίνες για τις εφαρμογές τους. Χωρίς σταθεροποιητές, οι πολυολεφίνες θα υποβάλλονταν σε ταχεία αποσύνθεση, με αποτέλεσμα διάρκεια ζωής μικρότερη από ένα χρόνο. Οι ακαθαρσίες που σχηματίζονται κατά τη σύνθεση των πολυολεφινών, όπως το καρβονύλιο, το υπεροξειδίο, το υδροξύλιο, το υδροϋπεροξειδίο και οι ακόρεστες ομάδες, απορροφούν το φως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και δρουν ως εκκινήτες για τη φωτοδιάσπαση του HDPE. Παράγοντες όπως η ηλιακή ακτινοβολία, η θερμοκρασία, η κυκλική θέρμανση, η υγρασία, οι καιρικές συνθήκες, οι ρύποι και τα πρόσθετα μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη σταθερότητα του HDPE στην υποβάθμιση της υπεριώδους ακτινοβολίας (Balasubramanian et al., 2014; Sangale, 2012). Η γήρανση του πολυαιθυλενίου συνοδεύεται συνήθως από διάφορες παρατηρήσιμες αλλαγές, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα.

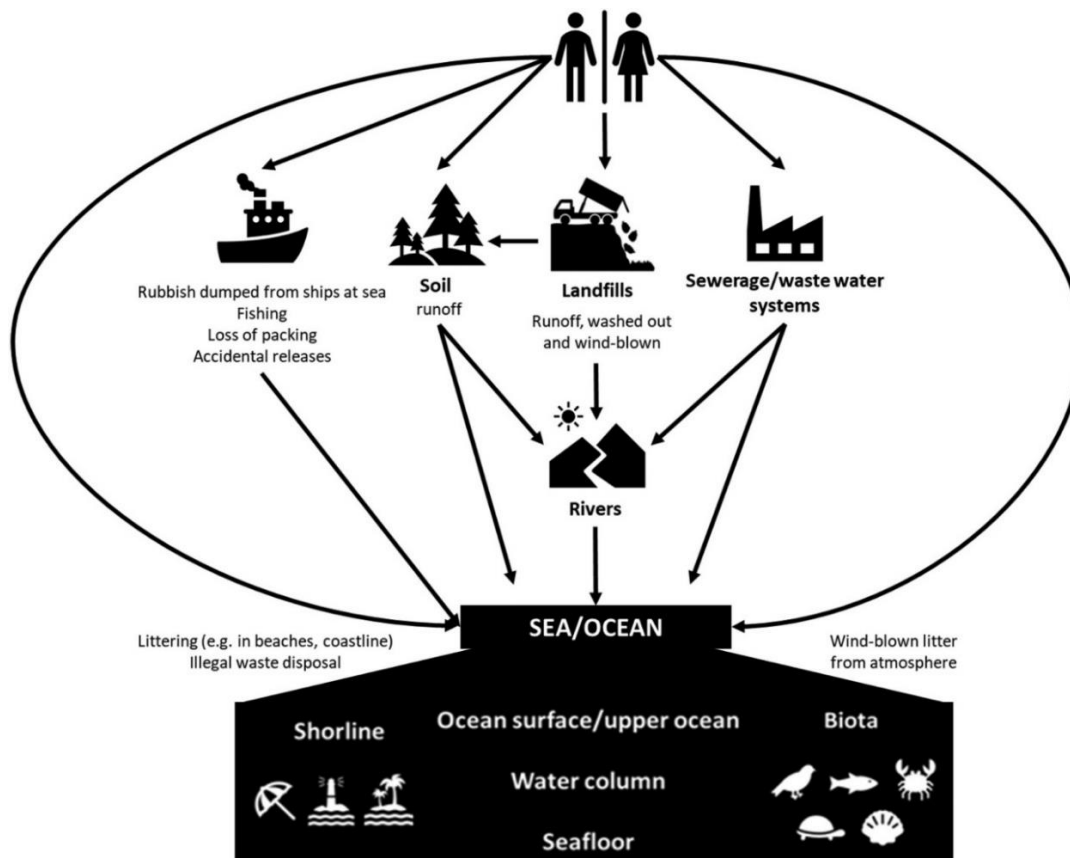


Εικόνα 9 Διάγραμμα των αλλαγών στο πολυαιθυλένιο που υποβλήθηκε σε ηλιακή ακτινοβολία σε παραλία (Andrady, 2017).

1.5. Πλαστικά στο υδάτινο περιβάλλον

Τα τελευταία χρόνια αυξήθηκε δραματικά το ποσοστό των πλαστικών στα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα που κατακλύζουν το περιβάλλον κι αποτελούν σοβαρότατη απειλή για το θαλάσσιο περιβάλλον. Είτε σκόπιμα είτε τυχαία, όταν τα απορρίμματα από πλαστικές ύλες δεν διατίθενται σωστά καταλήγουν στους ωκεανούς, τις θάλασσες και τα ποτάμια και πλήττουν την άγρια ζωή, την αλιεία και τον τουρισμό (García Rellán et al., 2023). Σήμερα υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των εκτιμήσεων των πλαστικών απορριμμάτων από χερσαίες πηγές που εισέρχονται στον ωκεανό και της ποσότητας θαλάσσιων απορριμμάτων που επιπλέουν στην επιφάνεια του ωκεανού (Ruiz et al., 2022). Κατά το έτος 2010, 192 παράκτιες χώρες παρήγαγαν 275 εκατομμύρια τόνους πλαστικών απορριμμάτων και μεταξύ 4,8 και 12,7 εκατομμύρια τόνοι κατέληξαν στον ωκεανό (Jambeck et al., 2015). Το 1975 η ετήσια ροή απορριμμάτων όλων των υλικών στον ωκεανό ήταν 6,4 εκατομμύρια τόνοι (Jambeck et al., 2015). Επί του παρόντος εκτιμάται ότι, 12,2 εκατομμύρια τόνοι πλαστικού ετησίως, εισέρχονται στο θαλάσσιο περιβάλλον (Sherrington, 2016). Το 2015 στους ωκεανούς υπήρχαν 15-51 τρισεκατομμύρια κομμάτια πλαστικού (93.000-236.000 τόνοι πλαστικού). Η ποσότητα πλαστικού στους ωκεανούς για το έτος 2017, ήταν >33 φορές το σύνολο που συσσωρεύτηκε το 2015 (Peng et al., 2020). Υπάρχουν πολλές πηγές εισροής απορριμμάτων και πλαστικών άμεσων ή έμμεσων στον ωκεανό. Οι δύο κύριες πηγές είναι: χερσαίες πηγές (>80 % των ετήσιων εισροών) και ωκεάνιες πηγές που εκτιμώνται σε ποσοστό 20 %. Οι εισροές χερσαίων πηγών μπορεί να είναι παράκτιες ή εσωτερικές και οι σημαντικότερες είναι η απορροή από ποτάμια, τα συστήματα λυμάτων/αποχέτευσης, τα απορρίμματα που μετακινούνται από τον άνεμο και τα απορρίμματα που εναποτίθενται στις παραλίες (Ryan et al., 2009; Sherrington, 2016; Wootton et al., 2022). Τα πλαστικά σωματίδια μπορούν να εισέλθουν στον ωκεανό από ποτάμια λόγω πυκνότητας χαμηλότερης ή παρόμοιας πυκνότητας του νερού. Τα σκουπίδια που απορρίπτονται από πλοία, σκάφη, εξέδρες και οι τυχαίες απορρίψεις αποτελούν άλλη μια σημαντική πηγή πλαστικής ρύπανσης στις θάλασσες. Επιπλέον, μία άλλη πηγή πλαστικών είναι η αλιεία που αντιπροσωπεύει

μεταξύ 10 και 15 % των παγκόσμιων θαλάσσιων απορριμμάτων κατ' όγκο (Sherrington, 2016). Τα θαλάσσια σκάφη κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 έριξαν πάνω από 23.000 τόνους πλαστικών υλικών συσκευασίας (Cole et al., 2011). Σήμερα, 640.000 τόνοι προστίθενται στον ωκεανό κάθε χρόνο (LI et al., 2016).



Εικόνα 10: Διάγραμμα της πηγής πλαστικών αποβλήτων στον ωκεανό και της δεξαμενής αποβλήτων στον ωκεανό (García Rellán et al., 2023).

Τα πλαστικά απορρίμματα, λόγω των φαινομένων μεταφοράς, παρατηρούνται όχι μόνο στα υδάτινα οικοσυστήματα που βρίσκονται κοντά σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές, αλλά και στις πιο απομακρυσμένες, όπως η Ανταρκτική (Barnes et al., 2009c). Ανάλογα με τη σύνθεση των πλαστικών, την πυκνότητα και το σχήμα, μπορούν να είναι καταναμεμημένα οριζόντια και κάθετα στη στήλη νερού και στον πυθμένα της θάλασσας (Cole et al., 2011). Για παράδειγμα, το πολυαιθυλένιο, το προπυλένιο και πολλοί αφροί πολυστερίνης είναι λιγότερο πυκνοί από το θαλασσινό νερό και επιπλέουν, ενώ το βινυλοχλωρίδιο και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο βυθίζονται (Andrady, 2015). Η κατανομή εξαρτάται επίσης από άλλους παράγοντες όπως οι άνεμοι, τα ρεύματα, η γεωγραφία της ακτογραμμής και οι ανθρωπίνι παράγοντες (αστικές περιοχές, τουρισμός και εμπορικές οδοί). Τέλος, λόγω των χαμηλών ρυθμών αποδόμησής τους, πολλά από αυτά παραμένουν στον ωκεανό για δεκαετίες (García Rellán et al., 2023).

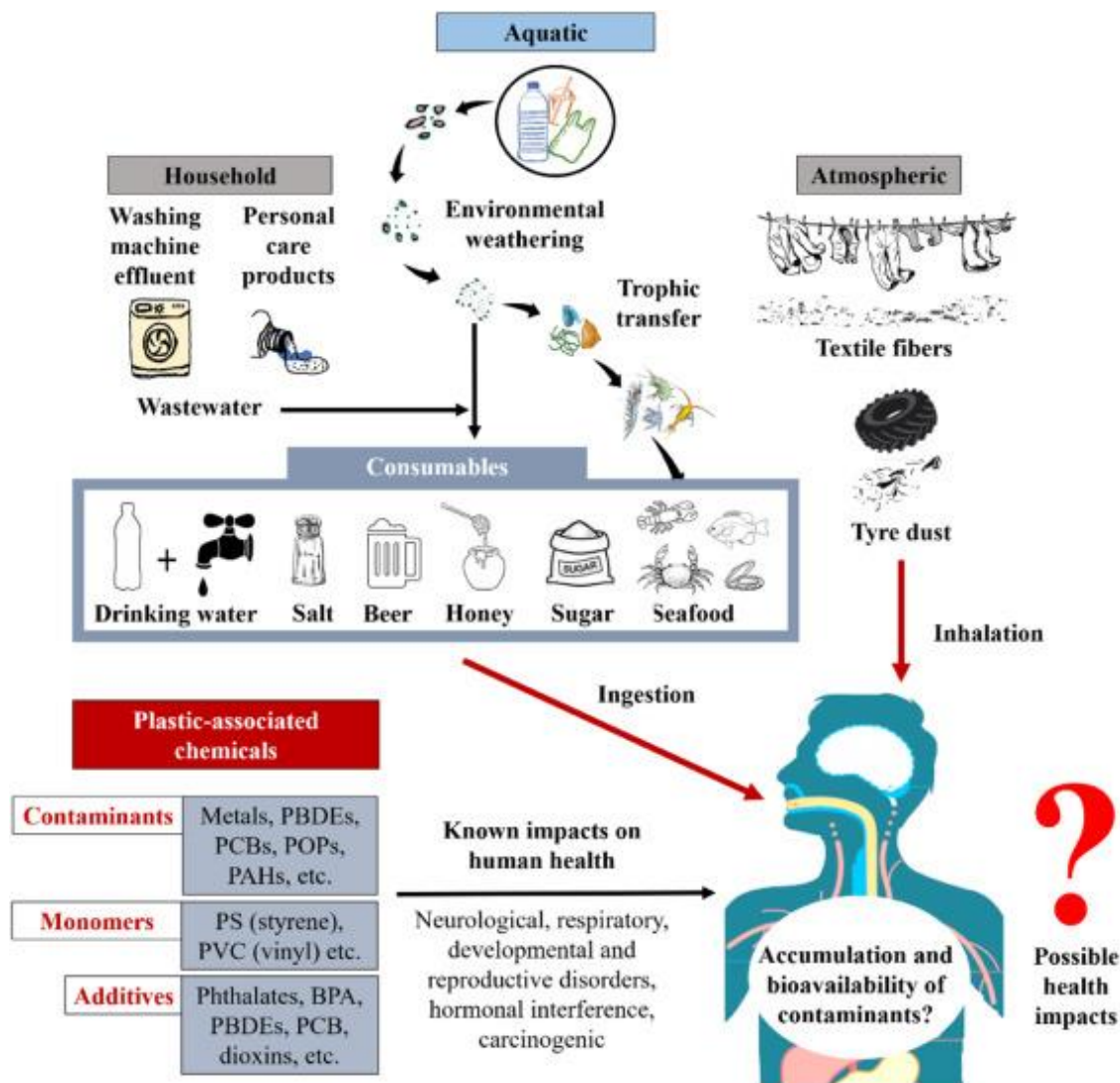
1.6. Επιπτώσεις για το υδάτινο περιβάλλον και μόλυνση αυτού από τα πλαστικά

Τα πλαστικά έχουν εξελιχθεί σε μια παγκόσμια απειλή για το θαλάσσιο περιβάλλον, αποτελώντας ένα σοβαρό πρόβλημα. Η συσσώρευσή τους στους ωκεανούς σε όλο τον κόσμο είναι προφανής και έχει αποδειχθεί ότι ενέχει σημαντικούς κινδύνους για την υγεία και την ποιότητα ζωής τόσο των ανθρώπων όσο και του οικοσυστήματος, (Ostle et al., 2019). Οι επιπτώσεις των πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι πολλές και περιλαμβάνουν την υποβάθμιση των οικοσυστημάτων, τη ρύπανση του περιβάλλοντος και τον κίνδυνο για τους θαλάσσιους οργανισμούς λόγω κατάποσης, ασφυξίας και παγίδευσης (Lacerda et al., 2019). Οι επιπτώσεις αυτές διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο και το μέγεθος των θαλάσσιων απορριμμάτων και των οργανισμών που επηρεάζονται (Dias και Lovejoy, 2012). Τα πλαστικά απορρίμματα που παγιδεύονται είτε στις ακτές είτε στον βυθό ή στην επιφάνεια της θάλασσας προκαλούν προβλήματα για τα ζώα, καθώς τα αγκαλιάζουν ή τα παγιδεύουν. Αυτό εμποδίζει τα ζώα να διαφύγουν από τους κυνηγούς τους ή να αναζητήσουν τροφή, με αποτέλεσμα την απειλή τους από ασιτία (Werner κ.ά., 2016).



Εικόνα 11: Πλαστικά απορρίμματα σε θάλασσες και ακτές (https://www.istockphoto.com/Search/2/Image-Film?Phrase=plastics%20in%20sea, n.d.).

Τα πλαστικά έχουν την ικανότητα να χρησιμεύουν ως φορείς για τη μεταφορά ρύπων στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, μπορούν να περιέχουν βαρέα μέταλλα, τα οποία προστίθενται ως σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των πλαστικών σε δύσκολες συνθήκες (Vallette et al., 2015). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα κατεστραμμένα πλαστικά μπορούν επίσης να απορροφήσουν μέταλλα από το περιβάλλον στις επιφάνειες τους (Ashton et al., 2010; Fotoroulou & Karapanagioti, 2012). Επιπλέον, τα πλαστικά μπορούν να απορροφήσουν επικίνδυνους έμμονους οργανικούς ρύπους (POPs) και πολυκυκλικούς οργανικούς υδρογονάνθρακες (PAHs). Έχει παρατηρηθεί ότι η γήρανση και το χρώμα των πλαστικών σφαιριδίων (pellets) συσχετίζονται θετικά με υψηλότερες συγκεντρώσεις ρύπων. Σε απομακρυσμένες περιοχές, αυτά τα σφαιρίδια χρησιμεύουν ως το κύριο μέσο μεταφοράς ρύπων (Antunes et al., 2013). Τόσο τα μέταλλα όσο και οι οργανικοί ρύποι έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα και να βιοσυσσωρευτούν, επηρεάζοντας έμμεσα τη θαλάσσια ζωή και οδηγώντας σε νευρολογικές και ενδοκρινικές διαταραχές, μεταλλάξεις και καρκινογένεση.



Εικόνα 12: Πιθανοί τρόποι εισαγωγής μικροπλαστικών στον ανθρώπινο οργανισμό (Senathirajah et al., 2021).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα διερευνηθεί η ικανότητα θαλάσσιων μικροοργανισμών που έχουν συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του κόλπου της Σούδας στα Χανιά, να βιοαποδομήσουν γερασμένα μικροπλαστικά pellets πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE) σε προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο. Η γήρανση των μικροσφαιριδίων (pellets) προκύπτει από την διεργασία της φωτοαποδόμησης, ύστερα από πεντάμηνη έκθεση τους σε UV-A ακτινοβολία. Αυτό γίνεται καθώς έχει αποδειχθεί ότι η γήρανση των πλαστικών βοηθάει στην βιοαποδόμηση τους. Το πειραματικό μέρος χωρίζεται σε δύο τμήματα. Αρχικά τα μικροσφαιρίδια HDPE ήταν η μοναδική πηγή άνθρακα για τη

μικροβιακή κοινότητα, ενώ στην επόμενη σειρά πειραμάτων προστέθηκε γλυκόζη. Σκοπός αυτού είναι να εξεταστεί αν και σε τι βαθμό επιταχύνεται η βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών pellets με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναφερθούν τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκπόνηση της τρέχουσας διπλωματικής εργασίας.

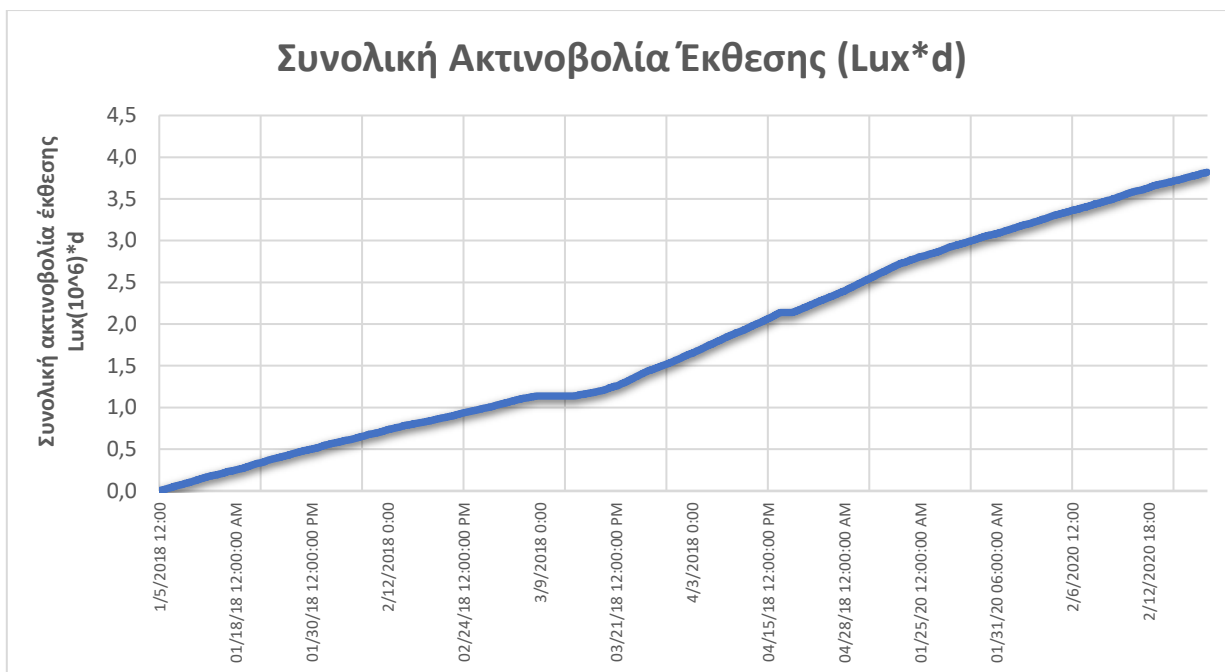
3.1. Υλικά

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλένιο σε μορφή μικροσφαιριδίων (pellets). Το σχήμα τους είναι σφαιρικό και η διάμετρος τους είναι κατά μέσο όρο 0,3 cm. Αρχικά τα pellets τοποθετήθηκαν σε γυάλινο πυρίμαχο σκεύος και ακτινοβολήθηκαν σε UV-A ακτινοβολία για 1 μήνα. Τα pellets είχαν ακτινοβοληθεί σε προγενέστερο χρόνο για 4 μήνες στο ίδιο σκεύος υπό τις ίδιες συνθήκες. Επομένως έχουν ακτινοβοληθεί συνολικά 5 μήνες.



Εικόνα 13 Pellets HDPE σε UV-A ακτινοβολίας.

Η θερμοκρασία και η ακτινοβολία κατά την διάρκεια αυτών των 5 μηνών μετρήθηκαν με τη βοήθεια του HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε μεταξύ 14,42°C έως 89,87°C με μέση τιμή 65,80°C και παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1. Η ακτινοβολία κυμάνθηκε μεταξύ 0 έως 4822,3 lux με μέση τιμή 1848,80 lux. Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η συνολική ένταση ακτινοβολίας του θαλάμου κατά τη διάρκεια του πειράματος.



Διάγραμμα 1: Συνολική ακτινοβολία έκθεσης σε περίοδο 5 μηνών.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Διαμόρφωση Πειράματος

Το πείραμα χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο που αφορά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών χωρίς την προσθήκη θρεπτικών ουσιών και το δεύτερο που αφορά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών με προσθήκη γλυκόζης ως θρεπτική ουσία.

3.2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων

Θαλασσινό Νερό

Για την εκτέλεση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό από την περιοχή της Σούδας. Η συλλογή και αποθήκευση του νερού πραγματοποιήθηκε σε ένα μεγάλο μπιτόνι. Χρησιμοποιήθηκε ένα χωνί, μια γυάλινη φιάλη 2 λίτρων και δύο φίλτρα (το φίλτρο μπαίνει διπλό) για το φιλτράρισμα του νερού, το οποίο αποθηκεύτηκε σε μια άλλη γυάλινη φιάλη. Με την ίδια διαδικασία φιλτράρουμε εκ νέου 2 λίτρα νερού και τα αποστειρώνουμε στον αυτόκαυστο κλίβανο για χρήση σε επόμενα στάδια του πειράματος.

Θρεπτικό Υλικό

Θα χρησιμοποιήσουμε το θρεπτικό υλικό standard I medium. Η σύσταση του για παραγωγή 1000 ml είναι η εξής:

- ↗ Peptone from meat 7.8 g
- ↗ Peptone from caseine 7.8 g
- ↗ Yeast extract 2.8 g
- ↗ NaCl 5.6 g
- ↗ D (+)-Glucose 1.0 g
- ↗ Distilled water 1000.0 ml

Φλάσκες

Η προετοιμασία των δειγμάτων ξεκινά με την αποστείρωση, των φλασκών χωρητικότητας 250 ml που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Οι φλάσκες αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο κλίβανο. Σε κάθε φλάσκα προστίθενται 100 ml θαλασσινού νερού από την περιοχή της Σούδας, χρησιμοποιώντας έναν ογκομετρικό κύλινδρο. Για την ασφάλεια και την καταπολέμηση της ενδεχόμενης μολυσματικότητας, οι φλάσκες αποστειρώνονται τουλάχιστον δύο φορές, με την πρακτική που ακολουθήθηκε στην περίπτωση μας πραγματοποιήθηκαν τρεις αποστειρώσεις. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,500 g HDPE pellets στην κάθε φλάσκα. Τα pellets πριν τοποθετηθούν στις φλάσκες, αποστειρώθηκαν με ένα διάλυμα 70% αιθανόλης για να εξαλειφθούν πιθανοί μικροοργανισμοί και έπειτα ξηράθηκαν σε φούρνο στους 37°C για 4 ημέρες. Πριν την τοποθέτηση τους στις φλάσκες, ξανά αποστειρωθήκαν με τον ίδιο τρόπο.

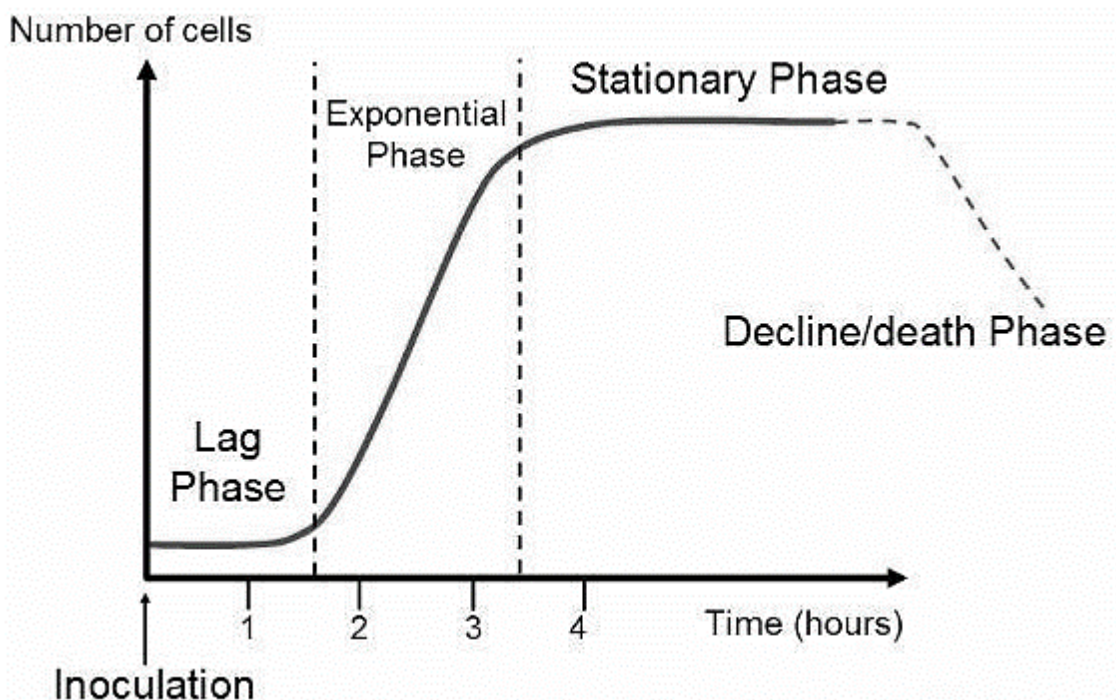


Εικόνα 14: Προετοιμασία Δειγμάτων

Ανάπτυξη μικροοργανισμών (θαλάσσιων κοινοτήτων)

Οι θαλάσσιες κοινότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση του συγκεκριμένου πειράματος συλλεχθήκαν στην περιοχή της Σούδας. Αυτές οι κοινότητες προσαρμόστηκαν και είχαν σαν μοναδική πηγή άνθρακα, το πολυαιθυλένιο. Στο πρώτο μέρος του πειράματος, πραγματοποιείται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών με τη χρήση ενός πλούσιου θρεπτικού

μέσου. Στο δεύτερο μέρος, γίνεται η ανακαλλιέργεια των μικροοργανισμών που περιέχονται στο βιοφίλμ της πρώτης δειγματοληψίας. Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό standard I medium. Για την παρακολούθηση της αύξησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών, χρησιμοποιείται η καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών (Maier, 2009).

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω:

- Φάση προσαρμογής (Lag phase): Κατά τη φάση αυτή, οι μικροοργανισμοί μόλις έχουν εμβολιαστεί στο θρεπτικό υλικό. Δεν αναπαράγονται αμέσως, αλλά προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες ανάπτυξης. Τα κύτταρα σε αυτήν τη φάση δεν διαιρούνται και δεν παρατηρείται αύξηση στο μέγεθος των μικροοργανισμών. Η διάρκεια αυτής της φάσης εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού και τις συνθήκες που επικρατούν (Maier, 2009).
- Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential/Log phase): Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, οι μικροοργανισμοί ξεκινούν να διαιρούνται με σταθερό ρυθμό, και παρατηρείται διπλασιασμός του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο. Ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (Maier, 2009).

↳ Στατική φάση (Stationary phase): Κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μειώνεται μέχρι να σταματήσει. Αυτό συμβαίνει λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών και της συσσώρευσης τοξικών προϊόντων. Παρατηρείται εξισορρόπηση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και του θανάτου των μικροοργανισμών (Maier, 2009).

↳ Φάση θανάτου (Death phase): Κατά τη φάση θανάτου, παρατηρείται μείωση των θρεπτικών παραγόντων και αύξηση των τοξικών προϊόντων μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν τελικά στον θάνατο των μικροοργανισμών (Maier, 2009).

Και στα δύο μέρη του πειράματος γίνεται προσθήκη μιας ποσότητας μικροοργανισμών (10-20 ml) και θρεπτικού standard I medium (100-200 ml) σε κωνικές φλάσκες για να αναπτυχθούν. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, πραγματοποιούνταν μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων μέσω του φασματοφωτόμετρο UV-VIS που ήταν ρυθμισμένο στα 600 nm. Λαμβάνονταν μετρήσεις κάθε 40-45 min μέχρι να επιτευχθεί αποδεκτή τιμή απορρόφησης (0,700 - 0,800). Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών σε αυτές τις τιμές απορρόφησης είναι 10^8 CFU/ml. Έπειτα, συλλέχθηκε ποσότητα 30 ml σε ένα falcon το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 3.500 rpm σε διάρκεια 30 min. Έπειτα έγινε η απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αποκολληθεί η πελέτα που δημιουργήθηκε στον πάτο του falcon. Προστέθηκαν 35 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και σε αυτά διαλύθηκε η πελέτα μέσω του αναδευτήρα στροβιλισμού (vortex). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 2 ακόμα φορές έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Τέλος, έγινε προσθήκη 1 ml αυτού σε κάθε φλάσκα ώστε η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο πείραμα να είναι 10^6 CFU/ml. Αυτό υπολογίστηκε με τον νόμο της αραιώσης ως εξής:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{10^6 \text{ CFU/ml} * 100 \text{ ml}}{10^8 \text{ CFU/ml}} = \frac{10^8}{10^8} = 1 \text{ ml}$$

Όπου

- C_1 : αριθμός αποικιών που μετρήθηκε στην εκθετική φάση ανάπτυξης
- V_1 : αρχική ποσότητα πριν την φυγοκέντρωση
- C_2 : τελικός αριθμός αποικιών που αντιστοιχεί σε όγκο V_2

Επίσης, σε κάθε φλάσκα προστίθενται 10 μl διαλύματος αζώτου φωσφόρου ώστε η αναλογία C:N:P να είναι 100:10:1. Η τιμή υπολογίστηκε ως εξής:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{1 \text{ M} * 100 \text{ ml}}{10.000 \text{ M}} = 0,01 \text{ ml ή } 10 \text{ } \mu\text{l}$$

Όπου

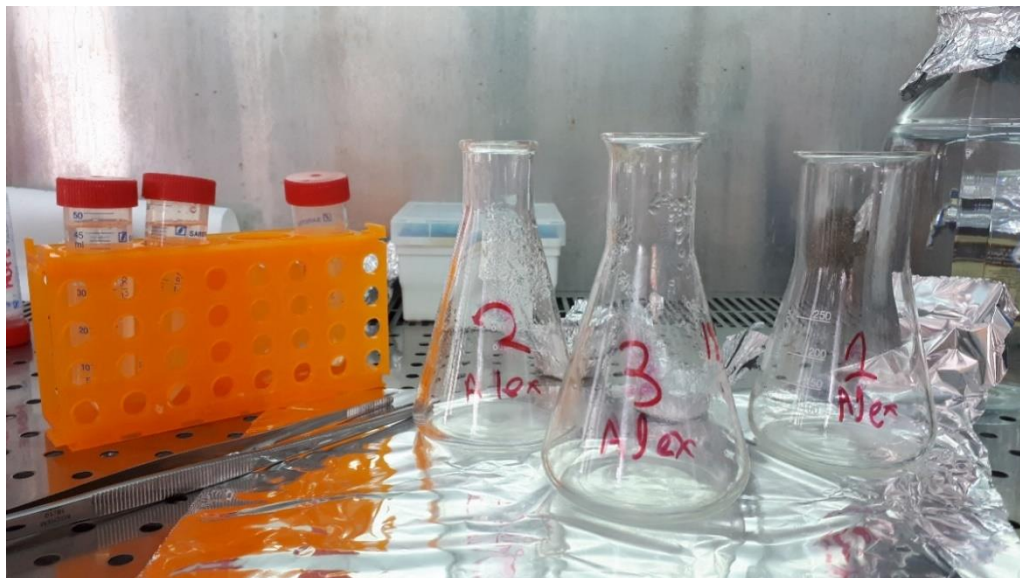
- C2: συγκέντρωση N βάση αναλογίας 100:10:1
- C1: συγκέντρωση N στο διάλυμα NP
- V2: τελικός όγκος στην φλάσκα του πειράματος

Τέλος, οι φλάσκες καλύπτονται με διπλό αποστειρωμένο αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στην τράπεζα ανάδευσης. Η μόνη διαφορά στο δεύτερο μέρος του πειράματος είναι η προσθήκη 1 ml γλυκόζης συγκέντρωσης 100 mg/ml σε κάθε φλάσκα πριν ξεκινήσει το πείραμα ώστε η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης να είναι 1 mg/ml. Για την παραγωγή της, σε μικρό γυάλινο μπουκαλάκι έγινε προσθήκη 20 ml απιονισμένου νερού και 2 gr γλυκόζης.

3.2.3. Δειγματοληψία

Για το πρώτο μέρος του πειράματος, όπου τα μικροσφαιρίδια αποτελούσαν τη μοναδική πηγή άνθρακα, η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε 30 ημέρες. Στο δεύτερο μέρος του πειράματος, όπου προστίθεται γλυκόζη, η δειγματοληψία πραγματοποιείται κάθε 15 ημέρες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- ❖ Κάθε φορά απομακρύνονταν από την τράπεζα ανάδευσης 3 κωνικές φλάσκες και μεταφέρονταν στον θάλαμο.
- ❖ Χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη λαβίδα, αφαιρούνταν κάθε φορά 2 pellets από κάθε φλάσκα. Έπειτα, τα pellets τοποθετούνταν σε ανοιχτά τριβλία στον θάλαμο για να στεγνώσουν για 45 λεπτά. Αυτή η διαδικασία ήταν απαραίτητη για να επιτευχθεί αργότερα η χρώση τους με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal viole). Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω.
- ❖ Τα υπόλοιπα pellets απομακρύνονταν από τη φλάσκα και τοποθετούνταν σε ένα falcon με χωρητικότητα 50 ή 15 ml. Στο falcon προστίθεται 10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και τρεις σταγόνες της ουσίας tween 80. Το tween 80 είναι μια μη-ιονική τασιενεργός ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως σε κοσμήματα, φαρμακευτικά και τροφικά προϊόντα ως γαλακτωματοποιητής. Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο απομάκρυνσης του βιοφίλμ από την επιφάνεια των pellets.
- ❖ Τέλος, τα falcon αφήνονταν στον αναδευτήρα για ένα μικρό χρονικό διάστημα (1 μέρα), με σκοπό να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια των pellets και να μετρηθεί αργότερα η καθαρή διαφορά βάρους τους. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό αποθηκευόταν σε κατάψυξη στη θερμοκρασία -20°C για περαιτέρω αναλύσεις και ονομαζόταν 'BIOFILM HDPE'.
- ❖ Το υγρό από τη φλάσκα αφαιρούνταν και μεταφέρονταν σε δύο falcons χωρητικότητας 50 ml. Αυτά τα falcons αποθηκεύονταν σε κατάψυξη στη θερμοκρασία -20°C για περαιτέρω αναλύσεις και είχαν την ονομασία 'HDPE'.



Εικόνα 16: Falcon και Φλάσκες δειγμάτων 1,2,3 κατά την διάρκεια της πρώτης δειγματοληψίας.

3.2.4. Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet)

Για την ανάλυση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδιο ακολουθήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

- ❖ Αερισμός των δειγμάτων στο θάλαμο για 45 λεπτά.
- ❖ Χρώση με 1% κρυσταλλικό ιώδιο (1 σταγόνα, ισοδυναμεί με 20 μ l).
- ❖ Αερισμός των χρωματισμένων δειγμάτων στο θάλαμο για 45 λεπτά.
- ❖ Πλύσιμο των δειγμάτων με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.
- ❖ Αερισμός των δειγμάτων στο θάλαμο για 45 λεπτά.
- ❖ Τοποθέτηση σε σωληνάριο Eppendorf των 2 ml που περιέχει 1 ml αιθανόλης 95% για 10 λεπτά.
- ❖ Μέτρηση της τιμής οπτικής απορρόφησης στα 595 nm.

Η μέτρηση πραγματοποιείται με φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Αποδεκτές τιμές απορρόφησης είναι εκείνες που είναι χαμηλότερες από 1. Κατά μέσο όρο, πραγματοποιούνται τρεις αραιώσεις για κάθε δείγμα προκειμένου να επιτευχθούν αποδεκτές τιμές.

3.2.5. Μέτρηση Κυττάρων

Για την μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο και τη διατήρησή τους, χρησιμοποιείται η ουσία γλουταραλδεΰδη (glutaraldehyde). Για κάθε δείγμα, προστίθενται οι παρακάτω ποσότητες σε ένα eppendorf χωρητικότητας 2 ml:

- Γλουταραλδεΰδη: 1000 μ l Βιοφιλμ + 80 μ l γλουταραλδεΰδη 25%

Στη συνέχεια, ανακατεύονται αυτά τα υλικά με τη χρήση ενός αναδευτήρα στροβιλισμού (Vortex). Τα errendorf που περιέχουν γλουταραλδεΐδη αφήνονται στο ψυγείο για μία ώρα πριν μεταφερθούν στην κατάψυξη για μελλοντικές αναλύσεις.



Εικόνα 17: (Αριστερά) Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες. (Δεξιά) Τέλος δειγματοληψίας – Τοποθέτηση βιοφίλμ σε falcon και Errendorf για μελλοντικές αναλύσεις.

3.2.6. Προσδιορισμός Βάρους

Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των pellets έγιναν δύο μετρήσεις. Η πρώτη μέτρηση έγινε πριν την πειραματική διαδικασία και δειγματοληψία, δηλαδή πριν την εισαγωγή τους στις κωνικές φλάσκες και η δεύτερη μέτρηση πραγματοποιήθηκε, κατά το πέρας της δειγματοληψίας και την εξαγωγή των pellets, από τις κωνικές φλάσκες. Η προεργασία κατά την οποία προσδιορίστηκε το ξηρό βάρος αναφέρεται παρακάτω. Αφού έγινε η πλύση των pellets, ακολούθησε η εφαρμογή αιθανόλης και η πλύση με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε βιοφίλμ. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 35°C για περίπου μια εβδομάδα. Έπειτα, μετρήσαμε το ξηρό βάρος των πλαστικών σφαιριδίων που περιείχε κάθε κωνική φλάσκα. Αρχικά, το βοηθητικό σκεύος τοποθετήθηκε στη ζυγαριά και μηδενίστηκε, και έπειτα προστέθηκαν τα pellets. Το μετρούμενο βάρος κάθε κωνικής φλάσκας συγκρίθηκε με το αρχικό βάρος των πλαστικών σφαιριδίων που είχαν ζυγιστεί και εισήχθησαν σε αυτές. Η διαφορά αυτή του βάρους θεωρήθηκε ως δείγμα βιοαποδόμησης των μικροπλαστικών.

Για τον υπολογισμό της μείωσης του βάρους των pellets χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Ποσοστό Μείωσης Βάρους} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος} - \text{Τελικό Βαρος}}{\text{Αρχικό Βαρος}} * 100\%$$

Όπου:

- Αρχικό Βάρος : το αρχικό βάρος των πλυμένων pellets που εισάχθηκαν στις κωνικές φλάσκες
- Τελικό Βάρος: το καθαρό βάρος που υπολογίστηκε μετά από κάθε δειγματοληψία

3.2.7. Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS)

3.2.7.1. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Για τον υπολογισμό των ολικών πρωτεϊνών έγινε χρήση της φασματοσκοπικής μεθόδου Bradford. Πρόκειται για μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο που χρησιμοποιεί τη φασματοσκοπία για να προσδιορίσει την απόλυτη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G 250, η οποία αλλάζει χρώμα όταν έρχεται σε επαφή με πρωτεΐνες σε χαμηλά όξινα διαλύματα. Παρόλο που υπάρχουν λίγες παρεμποδιστικές ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, η χρωστική αντιδρά με τις πρωτεΐνες σε διάφορα σημεία, καθιστώντας την ανάλυση αυτή μη απόλυτα ποσοτική (Bradford, 1976). Για να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος, απαιτείται η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις, ενώ η οπτική πυκνότητα του δείγματος μετριέται στα 595nm.

Η μέθοδος προσδιορισμού ολικών πρωτεϊνών εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα του βιοφίλμ. Αρχικά, το διάλυμα Α παραγόταν με την προσθήκη 10 ml απιονισμένου νερού και 20 mg bovine serum albumin (BSA). Ακολουθεί η παραγωγή των ακόλουθων αραιώσεων:

- ❖ Διάλυμα Β (500 µg/ml): 7,5 ml H_2O + 2,5 ml Α
- ❖ Διάλυμα C (250 µg/ml): 2,5 ml H_2O + 2,5 ml Β
- ❖ Διάλυμα D (200 µg/ml): 3 ml H_2O + 2 ml Β
- ❖ Διάλυμα Ε (150 µg/ml): 3,5 ml H_2O + 1,5 ml Β
- ❖ Διάλυμα F (125 µg/ml): 2,5 ml H_2O + 2,5 ml C
- ❖ Διάλυμα G (100 µg/ml): 4 ml H_2O + 1 ml Β
- ❖ Διάλυμα Η (75 µg/ml) : 2,5 ml H_2O + 2,5 ml Ε
- ❖ Διάλυμα Ι (50 µg/ml) : 2,5 ml H_2O + 2,5 ml G
- ❖ Διάλυμα J (25 µg/ml) : 2,5 ml H_2O + 2,5 ml Ι



Εικόνα 18: Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών.

Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκε 1 ml του αντιδραστηρίου Bradford και 20 μl από κάθε δείγμα. Επίσης, για τη μέτρηση της καμπύλης βαθμονόμησης προστέθηκαν νέες κυψελίδες με 1 ml του αντιδραστηρίου Bradford και 20 μl από τα πρότυπα διαλύματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το υγρό στις κυψελίδες αναμειγνύεται ομοιόμορφα με τη χρήση της πιπέτας. Στη συνέχεια, φωτομετρήθηκε το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας στα 595nm. Για κάθε κυψελίδα, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, και μετά τον υπολογισμό του μέσου όρου δημιουργήθηκε η καμπύλη.

3.2.8. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR, κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις, είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflectance, ATR). Εφαρμόζεται για την ανάλυση διαφόρων τύπων δειγμάτων, όπως παχιά ή εξαιρετικά απορροφητικά και αδιαφανή στερεά ή υγρά υλικά. Αυτά τα υλικά περιλαμβάνουν λεπτές μεμβράνες, επικαλύψεις, σκόνες, κλωστές, πάστες, κόλλες, πολυμερείς λεπτές μεμβράνες και υδατικά διαλύματα (Κουή, 2015). Ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα του ATR-FTIR είναι ότι εξαλείφει την ανάγκη για προεπεξεργασία ή ομογενοποίηση δείγματος. Απαιτείται μόνο μια μικροσκοπική ποσότητα δείγματος για να έρθει σε επαφή με τον κρύσταλλο. Για να εξασφαλιστούν ακριβείς μετρήσεις μέσω βέλτιστης επαφής, επιλέγεται προσεκτικά ο κατάλληλος εξοπλισμός, εξασφαλίζοντας τη σωστή πίεση μεταξύ του δείγματος και του κρυστάλλου.

Αρχή Λειτουργίας Μηχανήματος

Η λειτουργία αυτής της συσκευής βασίζεται στην ολική εσωτερική ανάκλαση, ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) αλληλεπιδρά με ένα μέσο χαμηλής πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2) (Κουή, 2015). Η ποσότητα της ανακλώμενης ακτινοβολίας αυξάνεται καθώς αυξάνεται η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης θ είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία θ_c , η οποία αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο μέσων ($\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}$) τότε όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.8 (Κουή, 2015).



Εικόνα 19: Μέτρηση στο ATR του εργαστηρίου.

Ένας διάφανος κρύσταλλος με υψηλό δείκτη διάθλασης χρησιμοποιείται ως εσωτερικό στοιχείο ανάκλασης για την υπέρυθη ακτινοβολία, πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η υπέρυθη δέσμη που κατευθύνεται πάνω στον κρύσταλλο υφίσταται πολλαπλές ολικές αντανάκλασεις μέσα στον κρύσταλλο, επιτρέποντάς του να περάσει επανειλημμένα μέσα από το δείγμα, από το οποίο και απορροφάται. Η διεπαφή μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης προκαλεί εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός φθίνοντος κύματος. Το κύμα αυτό διεισδύει και διαδίδεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, εξασθενώντας σταδιακά στις περιοχές του υπέρυθρου φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια (Κουή, 2015). Ένας κρίσιμος παράγοντας σε αυτή τη διαδικασία είναι το βάθος διείσδυσης, που αντιπροσωπεύεται από το φθίνον πεδίο d_p (ή την υπέρυθη ακτινοβολία μέσα στο δείγμα), το οποίο βασίζεται στο μήκος κύματος λ , στον δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου n_1 , στον δείκτη διάθλασης n_2 του δείγματος και στη γωνία πρόσπτωσης ακτινοβολίας, ως προς την κάθετο στην επιφάνεια του κρυστάλλου θ . Όταν ένα απορροφητικό υλικό έρχεται σε επαφή με τον κρύσταλλο ATR, το φθίνον κύμα απορροφάται από το δείγμα, προκαλώντας μείωση της έντασης στα μήκη κύματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια εντός του IR φάσματος. Κατά συνέπεια, η αντανάκλαση γίνεται λιγότερο έντονη. Με τη μέτρηση και την καταγραφή της προκύπτουσας εξασθενημένης ακτινοβολίας ως συνάρτηση του μήκους κύματος, δημιουργείται ένα IR φάσμα, που μοιάζει με ένα συμβατικό φάσμα απορρόφησης (Κουή, 2015).

Έπειτα το λογισμικό του ATR-FTIR πραγματοποιεί αυτοματοποιημένη επιλογή κορυφών (peak picking), αναγνωρίζει τις κορυφές και προσδιορίζει τους κυματαριθμούς στην μέγιστη απορρόφηση, διορθώνει το σφάλμα της γραμμής βάσης (baseline correction), την αντιστάθμιση, και εφαρμόζει φασματική εξομάλυνση (spectral smoothing) (Κουτσουμπίδης, 2018). Τελικά, από τις σχηματιζόμενες κορυφές αναγνωρίζονται κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στο υπό μελέτη υλικό και κάποιες καινούργιες που υποδεικνύουν την επεξεργασία που έχει υποστεί. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ομάδες που υποδεικνύουν ότι το πολυμερές έχει υποστεί επεξεργασία.

Στη συνέχεια το λογισμικό ATR-FTIR πραγματοποιεί αυτοματοποιημένη ανίχνευση κορυφών, ταυτοποίηση κορυφών και προσδιορισμό των αριθμών κύματος που σχετίζονται με τη

μέγιστη απορρόφηση. Εκτελεί επίσης βασική διόρθωση, αντιστάθμιση και εφαρμόζει τεχνικές φασματικής εξομάλυνσης (Κουτσουμπίδης, 2018). Στη συνέχεια, με βάση τις προσδιορισμένες κορυφές, αναγνωρίζονται συγκεκριμένες χαρακτηριστικές κορυφές που αντιπροσωπεύουν το μελετώμενο υλικό, μαζί με νέες κορυφές που υποδηλώνουν οποιαδήποτε επεξεργασία έχει υποστεί το υλικό. Ο πίνακας 3 παρουσιάζει τις ομάδες που υποδηλώνουν ότι το πολυμερές έχει υποστεί επεξεργασία.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές ομάδες και κυματοαριθμοί.

Χαρακτηριστική ομάδα	Δομή	Κυματοαριθμός (cm) ⁻¹
Κετόνη	-CO-	1715
Εστέρα	-COO-	1740
Μεθύλιο	-CH ₃ -	1465
Ενώσεις Βινυλίου	H ₂ C=C-	1640
Διπλός Δεσμός	-CH=CH-	908
Υδροξύλιο	-OH	3340

Οι σχέσεις με βάση τις οποίες προκύπτουν οι χαρακτηριστικές ομάδες που μελετήσαμε για να εκτιμήσουμε τις αλλαγές των δεσμών στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων για το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) είναι οι εξής (Albertsson et al., 1987):

- ❖ Δείκτης κετόνης = A (1715) / A (1465)
- ❖ Δείκτης εστέρα = A (1740) / A (1465)
- ❖ Δείκτης ενώσεων βινυλίου = A (1640) / A (1465)
- ❖ Δείκτης διπλού δεσμού = A (908) / A (1465)

Σημειώνεται ότι, το στοιχείο A είναι η απορρόφηση που αντιστοιχεί στον ανάλογο κυματοαριθμό.

Το επίπεδο κρυσταλλικότητας αντιπροσωπεύει την αναλογία κρυσταλλικού υλικού εντός της συνολικής σύνθεσης. Το πολυμερές περιλαμβάνει τόσο κρυσταλλικές όσο και άμορφες περιοχές. Στο πλαίσιο της αποικοδόμησης, ο σχηματισμός άμορφων περιοχών μέσα στο πολυμερές υποδηλώνει βιοαποδόμηση (Zerbi et al., 1989). Το ποσοστό της κρυσταλλικότητας της επιφάνειας του πολυαιθυλενίου προκύπτει από την ποσοτική αξιολόγηση των άμορφων έναντι των κρυσταλλικών περιοχών, και υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Σοφία Κυρίτση, 2021):

$$\text{Κρυσταλλικότητα (\%)} = 100 - \left[\left(1 - \frac{I_a - (1,233 * I_b)}{1 + \frac{I_a}{I_b}} \right) * 100 \right]$$

Όπου:

- I_a η απορρόφηση στα 730 μήκη κύματος (cm⁻¹)
- I_b η απορρόφηση στα 720 μήκη κύματος (cm⁻¹)

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία μέτρησης των δειγμάτων δεν απαιτούσε καμία προεργασία. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 pellet από κάθε τριβλίο (συνολικά 15 από κάθε δειγματοληψία), τα οποία τοποθετούνται πάνω στον κρύσταλλο και με την κεφαλή του μηχανήματος ασκούνται πίεση μέχρι αυτά να αστοχήσουν. Πάντα από την μία μέτρηση στην άλλη, η επιφάνεια και ο κρύσταλλος καθαρίζονταν με ειδικό πανί.

3.2.9. Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών

Κατά την διάρκεια του πειράματος, τμήματα των μικροπλαστικών υποβλήθηκαν σε κατακερματισμό σε μικρότερα θραύσματα ως αποτέλεσμα της ανάδευσης και βιοαποδόμησης. Μέσω του μηχανήματος SALD-7500 nano της SHIMADZU, υπολογίστηκε η διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών και στα δύο μέρη του πειράματος. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιεί ένα ισχυρό λέιζερ για να παρέχει ακριβείς και εξαιρετικά ευαίσθητες μετρήσεις νανοσωματιδίων και μικροσωματιδίων που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι δυνατότητες μέτρησης περιλαμβάνουν ένα εύρος από 7 nm έως 800 μm και μπορεί να αναλύσει με ακρίβεια δείγματα με συγκεντρώσεις κάτω από 1 ppm.

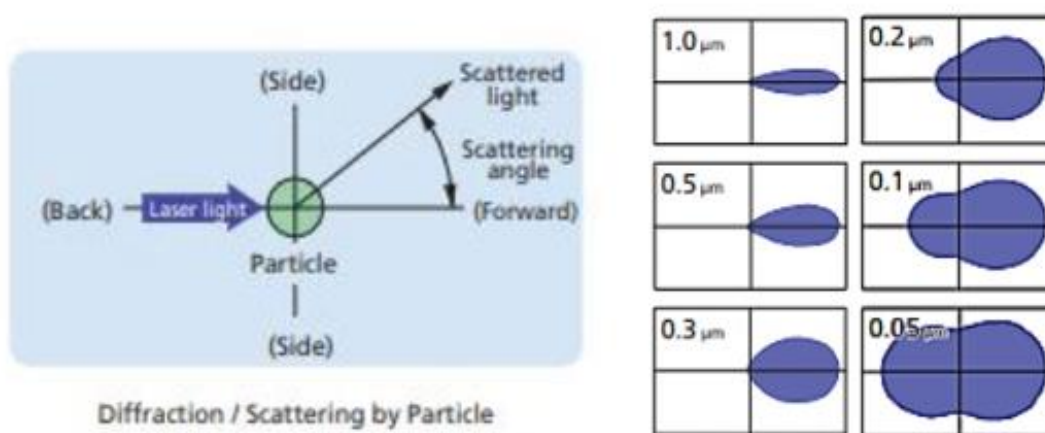


Εικόνα 20: SHIMADZU SALD-7500 nano (<https://www.ssi.shimadzu.com/>, n.d.).

Αρχή Λειτουργίας Μηχανήματος

Το όργανο βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης του φωτός. Όταν ένα σωματίδιο ακτινοβολείται με τη δέσμη λέιζερ του μηχανήματος, φως εκπέμπεται από το σωματίδιο προς κάθε κατεύθυνση. Αυτή η διαδικασία αποκαλείται σκέδαση φωτός και η έντασή του ποικίλει ανάλογα με τη γωνία της σκέδασης, δημιουργώντας ένα χωρικό μοτίβο κατανομής της έντασης, γνωστό ως μοτίβο κατανομής έντασης φωτός (Εικόνα 21). Όταν το σωματίδιο έχει μεγάλη διάμετρο, το σκεδαζόμενο φως συγκεντρώνεται κυρίως προς την μπροστινή

κατεύθυνση και παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις σε μια περιοχή γωνιών που δεν μπορεί να αναπαρασταθεί σε διάγραμμα. Σε σύγκριση με το φως που σκορπίζεται προς την μπροστινή κατεύθυνση, η ένταση του υπόλοιπου φωτός είναι πολύ χαμηλή. Καθώς η διάμετρος του σωματιδίου μικραίνει, το μοτίβο της σκέδασης φωτός εξαπλώνεται προς τα έξω και, όταν το σωματίδιο γίνεται ακόμα μικρότερο, η ένταση του φωτός που σκορπίζεται πλάγια και προς τα πίσω γίνεται ακόμα πιο έντονη. Το μοτίβο κατανομής της φωτεινής έντασης αποκτά ένα σχεδόν στρογγυλό σχήμα και εξαπλώνεται προς όλες τις κατευθύνσεις, καθιστώντας δυνατή την παρατήρηση της διαμέτρου του σωματιδίου μέσω της ανίχνευσης του μοτίβου κατανομής έντασης του φωτός. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε ομάδες σωματιδίων που περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών, αντί να γίνονται σε μεμονωμένα σωματίδια. Το μοτίβο που προκύπτει από την ομάδα δημιουργείται από το συνολικό σκεδαζόμενο φως που προέρχεται από κάθε μεμονωμένο σωματίδιο.



Εικόνα 21: (Αριστερά) Σκέδαση/Περίθλαση φωτός από το σωματίδιο (Δεξιά) Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός (<https://www.ssi.shimadzu.com/>, n.d.).

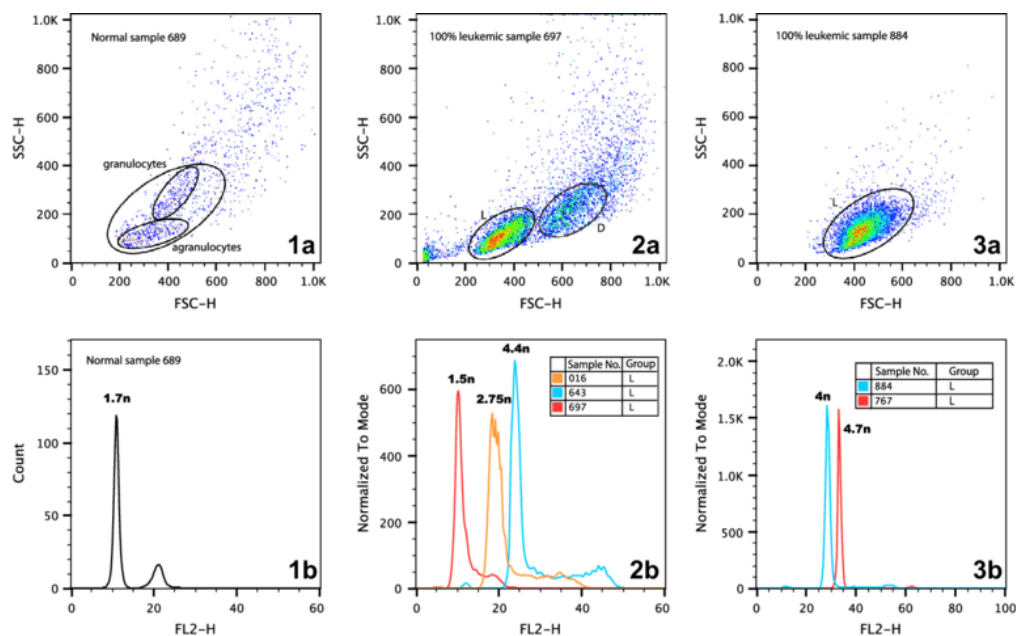
Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: αρχικά, τα δείγματα από τις δύο φάσεις του πειράματος αραιώθηκαν σε αναλογία 1:1. Μηδενίζαμε το όργανο, εισάγοντας 5 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού και στη συνέχεια τοποθετούσαμε περίπου 5 mL από κάθε δείγμα για ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονταν στο αντίστοιχο λογισμικό του υπολογιστή ως διαγράμματα που απεικόνιζαν την κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών σε όγκο και αριθμό.

3.2.10. Κυτταρομετρία ροής (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την ανάλυση κυτταρικών πληθυσμών με τη μέτρηση της σκέδασης του φωτός που προκαλείται από τα κύτταρα και τη φθορίζουσα ακτινοβολία που εκπέμπεται από αυτά. Τα κύτταρα, που βρίσκονται σε διάλυμα, διέρχονται μέσα από μια δέσμη φωτός που είναι διεγερμένη (συνήθως λέιζερ), και η φωτεινή αυτή δέσμη

σκορπίζεται και φθορίζει χαρακτηριστικά ανάλογα με τα κύτταρα και την πολυπλοκότητα τους. Τα κύτταρα σημαίνονται με χρωστικές ουσίες που φθορίζουν, έτσι ώστε το απορροφημένο φως να εκπέμπεται με διαφορετικές συχνότητες (Kaile et al., 2020). Γύρω από τη δέσμη φωτός που διαπερνά το υγρό, υπάρχουν αισθητήρες που ευθυγραμμίζονται με τη φωτεινή δέσμη, καθώς και άλλοι αισθητήρες που τοποθετούνται κάθετα σε αυτήν, και ένας ή περισσότεροι αισθητήρες φθορισμού. Ο φθορισμός μπορεί να προκαλείται είτε από την κυτταρική δομή είτε από εξωγενείς ουσίες που χρησιμοποιούνται για να σημανθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί. Κάθε σωματίδιο που διέρχεται μέσα από τη δέσμη φωτός σκεδάζει το φως προς διάφορες κατευθύνσεις, ενώ τα χημικά που φθορίζουν βρίσκονται στο σωματίδιο ή επάνω στο επιφανειακό του στρώμα και μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως σε διαφορετικό μήκος κύματος από την πηγή φωτός. Οι αισθητήρες λαμβάνουν τον συνδυασμό του σκεδασμένου και του φθορίζοντος φωτός και, αφού τον αναλύσουν, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανάλυσης των δεδομένων, όπως ιστογράμματα, δισδιάστατα γραφήματα, τρισδιάστατες γραφικές αναπαραστάσεις και contour plots (Εικόνα 22). Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) συνδέεται με τον όγκο του κυττάρου, ενώ η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου, όπως το σχήμα του πυρήνα ή ο αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων.



Εικόνα 22: Ανάλυση δεδομένων κυτταρόμετρου με ιστόγραμμα και δισδιάστατο γράφημα (Vassilenko & Baldwin, 2014).

Για την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση των βιολογικών και φυσικών ιδιοτήτων των κυττάρων και άλλων σωματιδίων, χρησιμοποιείται το κυτταρόμετρο CytoFLEX της Beckman Coulter Life Sciences. Το όργανο διαχωρίζεται σε τρία βασικά μέρη: τα δοχεία ρευστών (Fluid Containers) που αποτελούν το σημείο εισαγωγής των ρευστών και των υγρών αποβλήτων, το κυτταρόμετρο (Cytometer) που παράγει και συλλέγει τα σήματα, και το λογισμικό ανάλυσης δεδομένων κυτταρομετρίας (Workstation) (Coulter, 2015).



Εικόνα 23: Κυτταρόμετρο CytoFLEX (https://us.vwr.com/cms/beckman_coulter_cytoflex).

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, στο λογισμικό του κυτταρόμετρου δημιουργούμε μια νέα καρτέλα για το πείραμά μας. Η μέτρηση των δειγμάτων θα γίνει στα erpendorf που περιέχουν γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde), όπου είχαν προετοιμαστεί κατά τη διάρκεια κάθε δειγματοληψίας και φυλάσσονταν στην κατάψυξη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές, μία φορά με προσθήκη της βαφής thiazole green και μία φορά χωρίς βαφή. Για τα δείγματα χωρίς βαφή, τοποθετούμε 100μl από κάθε δείγμα σε ένα tube και προσθέτουμε 900μl φιλτραρισμένου (2 μm) θαλασσινού νερού. Στη συνέχεια, τοποθετούμε τα δείγματα ένα-ένα στην υποδοχή του κυτταρόμετρου, ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση, η οποία αποθηκεύεται στην αντίστοιχη καρτέλα που δημιουργήθηκε. Για τα δείγματα με βαφή, τοποθετούμε 100μl από κάθε δείγμα σε ένα tube και προσθέτουμε 880μl φιλτραρισμένου (2 μm) θαλασσίου νερού και 20μl της βαφής thiazole green. Τα αφήνουμε να αντιδράσουν στο σκοτάδι για 20 λεπτά πριν προχωρήσουμε στη μέτρηση.

3.2.11. Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC)

Η μέτρηση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μηχάνημα "Multi N/C 2100S" της Analytik Jena. Αυτή η συσκευή αποτελεί ένα μέσο μέτρησης για τον ολικό οργανικό άνθρακα (TOC) και τον ανόργανο άνθρακα (TIC), τα οποία χρησιμεύουν ως δείκτες για την παρακολούθηση και αξιολόγηση του περιβάλλοντος. Οι εφαρμογές της περιλαμβάνουν την ανάλυση πόσιμου και επιφανειακού νερού, εκπλυμάτων υγειονομικής ταφής και των λυμάτων, καθώς και του νερού που χρησιμοποιείται για ψύξη και τροφοδοσία λέβητα. Ο συνολικός άνθρακας (TC) και ο ανόργανος άνθρακας (TIC) προσδιορίζονται ξεχωριστά, και η διαφορά τους παρέχει τον ολικό οργανικό άνθρακα ($TOC = TC - TIC$). Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των πτητικών και μη πτητικών ενώσεων και χρησιμοποιείται συχνότερα για τη μέτρηση TOC σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε TOC και χαμηλή περιεκτικότητα σε TIC, όπως στα λύματα (<https://www.Analytik-Jena.Com/>, n.d.).



Εικόνα 24: "Multi N/C 2100S" Analytik Jena (<https://www.analytik-jena.com/products/chemical-analysis/toc-tnb-analysis/toc-tnb/multi-n-c-series/>, n.d.)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, συλλέχθηκαν μικρά γυάλινα μπουκαλάκια και πραγματοποιήθηκε διαδικασία καθαρισμού. Τα μπουκαλάκια ξεπλύθηκαν δύο φορές με νερό και σαπούνι, και στη συνέχεια πλύθηκαν δύο φορές με απιονισμένο νερό και μία φορά με υπερκαθαρό νερό (ultra-pure water). Έπειτα, τα μπουκαλάκια αφήνονται να στεγνώσουν στο φούρνο στους 66°C. Στη συνέχεια, από κάθε δείγμα φιλτράρονται 7-10 ml μέσω ενός φίλτρου με μέγεθος πόρου 0,45 μm και τοποθετούνται στα γυάλινα μπουκαλάκια. Τα μπουκαλάκια σφραγίζονται με καπάκια και έτσι τα δείγματα είναι έτοιμα για μέτρηση. Η διαδικασία του φιλτραρίσματος απαιτείται λόγω της ευαισθησίας του οργάνου και της ανάγκης να αποφευχθεί η παρουσία μεγάλων σωματιδίων στα δείγματα.

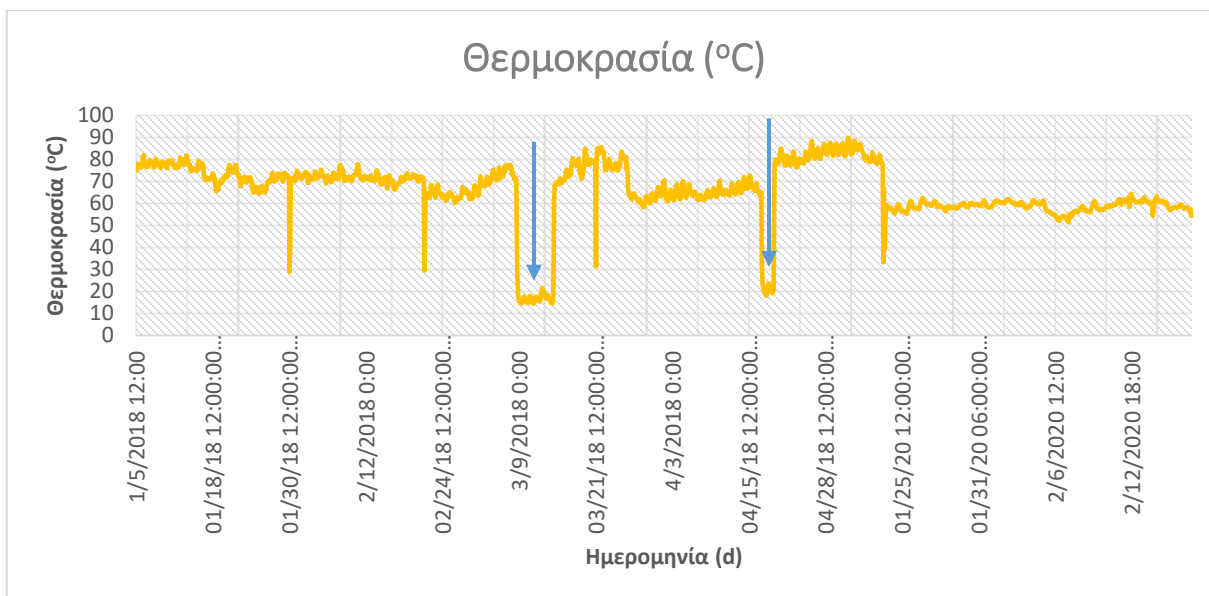


Εικόνα 25: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέτρηση.

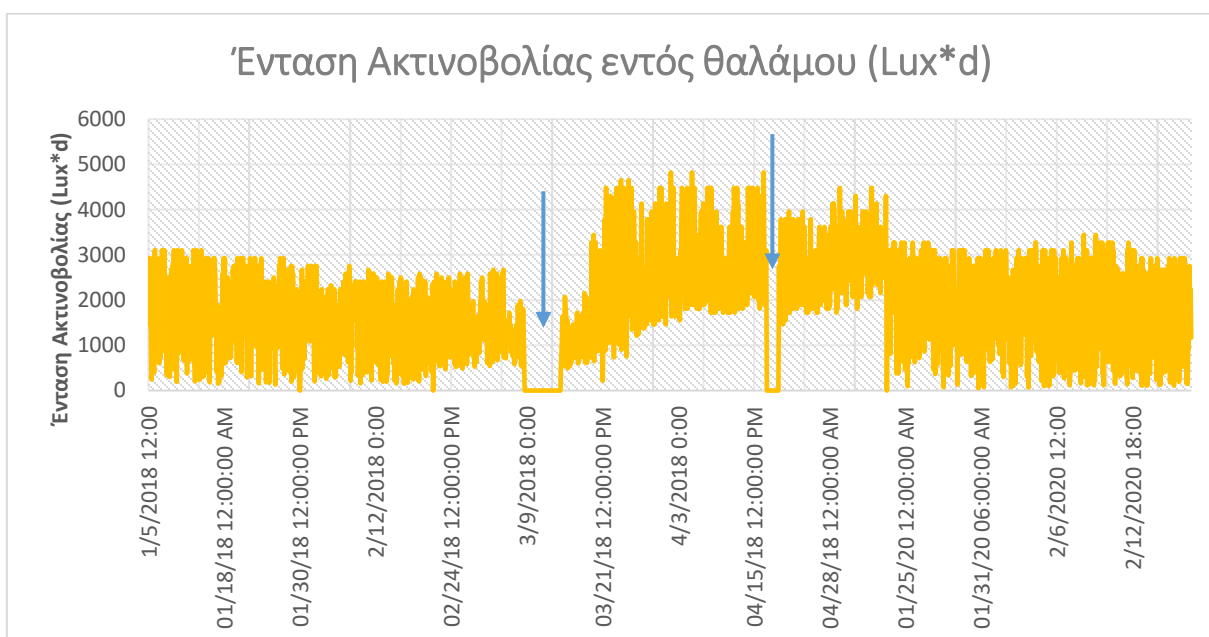
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1. Ακτινοβόληση μικροσφαιριδίων HDPE (pellets)

Τα μικροσφαιρίδια πολυαιθυλενίου (HDPE), όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.1 υποβλήθηκαν σε UV-A ακτινοβολία για το διάστημα 5 μηνών στο θάλαμο ακτινοβόλησης του Εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας. Η θερμοκρασία και η ακτινοβολία καθ' όλη τη διάρκεια μετρήθηκε με το HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 14,42°C έως 89,87°C, με μέση τιμή 65,80°C, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2. Η ακτινοβολία, από την άλλη πλευρά, κυμάνθηκε από 0 έως 4822,3 lux, με μέση τιμή 1848,80 lux, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3. Ο λόγος για τον οποίο παρουσιάζεται η μηδενική τιμή κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων, 8/3/2018-14/3/2018 και 17/4/2018-19/4/2018 (μπλε βέλη), οφείλεται σε διακοπή λειτουργίας της λάμπας. Η πιθανή αιτία της διακοπής μπορεί να συνδέεται με ηλεκτρολογικά προβλήματα του εργαστηρίου ή ξαφνική διακοπή ρεύματος. Ωστόσο, η μικρή διάρκεια της διακοπής δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα του πειράματος.



Διάγραμμα 1: Θερμοκρασία θαλάμου κατά τη διάρκεια 5 μηνών.



Διάγραμμα 2: Ένταση ακτινοβολίας θαλάμου κατά τη διάρκεια 5 μηνών.

Αυτή η διαδικασία διεξήχθη ως αρχικό βήμα στα pellets HDPE, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι παρά το γεγονός ότι το πολυαιθυλένιο ταξινομείται ως μη βιοδιασπώμενο, όταν υποβάλλεται σε φωτοοξείδωση ή θερμική οξείδωση, προάγει τη μικροβιακή προσκόλληση και αποδόμηση του. Για να είμαστε πιο ακριβείς, η ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπολειμμάτων καρβονυλίου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για μικροοργανισμούς (Syranidou et al., 2017).

4.2 Αποτελέσματα Μείωσης Βάρους Μικροσφαιριδίων

Μία από τις πιο πρακτικές και εύκολες μεθόδους μέτρησης της βιοαποδόμησης των πολυμερών είναι ο προσδιορισμός της απώλειας βάρους. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται πάνω στο πολυμερές οδηγούν σε αύξηση του βάρους λόγω συσσώρευσης, ενώ η αποδόμηση του πολυμερούς οδηγεί σε απώλεια βάρους (Hooda et al., 2023). Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους των μικροσφαιριδίων πολυαιθυλενίου πριν και μετά το τέλος του πειράματος. Η απώλεια βάρους αναφέρεται στη διαφορά βάρους μεταξύ του αρχικού και του τελικού βάρους των μικροσφαιριδίων HDPE η οποία μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο της παραγράφου 3.2.5. Με βάση τα αποτελέσματα μας είδαμε πως και για τα δύο σκέλη του πειράματος το ποσοστό μείωσης του βάρους ήταν πολύ μικρό, μέχρι και μηδενικό σε μερικές περιπτώσεις.

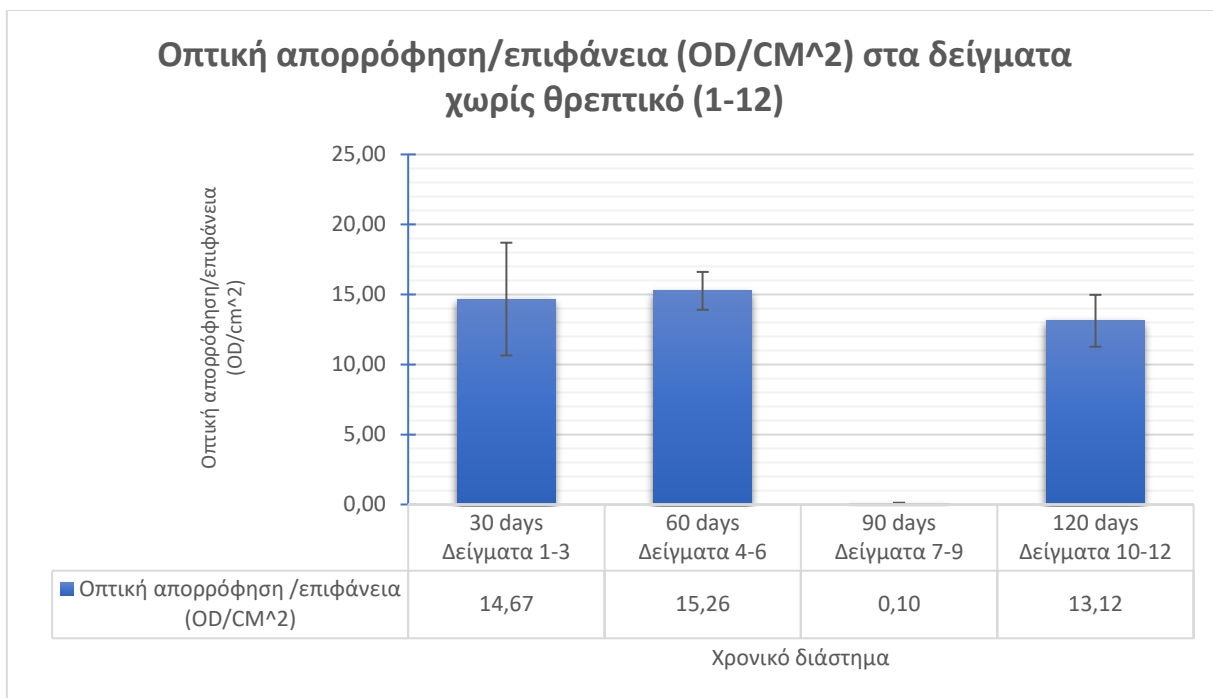
Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το πρώτο μέρος του πειράματος, για τον πρώτο έως και τον τρίτο μήνα το ποσοστό μείωσης υπολογίστηκε στα 0,07%, ενώ σε αυτήν του τέταρτου μήνα το ποσοστό μείωσης έφτασε 0,20%. Για το δεύτερο μέρος του πειράματος με την προσθήκη γλυκόζης, κατά την πρώτη δειγματοληψία των 15 ημερών το ποσοστό μείωσης ήταν 0,20%, ενώ για τις επόμενες δειγματοληψίες δεν παρατηρήθηκε κάποια περεταίρω μείωση βάρους. Σύμφωνα με τις μετρήσεις και για τα δύο μέρη του πειράματος καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι δεν υπάρχει αξιοσημείωτη μείωση του βάρους των μικροσφαιριδίων. Πειραματική μελέτη που διεξήχθη με μικροπλαστικά πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE), έδειξε μείωση βάρους εξαιτίας βιοαποδόμησης από το *Brevibacillus borstelensis* 0,076% έπειτα από περίοδο επώασης 15 ημερών (Hooda et al., 2023). Από τη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ποικίλο εύρος ποσοστού απώλειας βάρους HDPE (1,61 έως 23,14%) για την περίοδο επώασης των 30 ημερών (Sangeetha Devi et al., 2019), ενώ σε ορισμένες μελέτες δεν παρατηρήθηκε αποικοδόμηση μετά από επώαση 30 ημερών (Vimala & Mathew, 2016). Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι το εύρος αποδόμησης μπορεί να φτάσει έως και 2,5% μετά από επώαση για διάστημα 1 έτους (Sudhakar et al., 2008).

Η μείωση του βάρους μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη βιοαποδόμησης των pellets, ωστόσο στην περίπτωση μας δεν ήταν καθοριστικός και για να έχουμε μία καλύτερη εικόνα της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις.

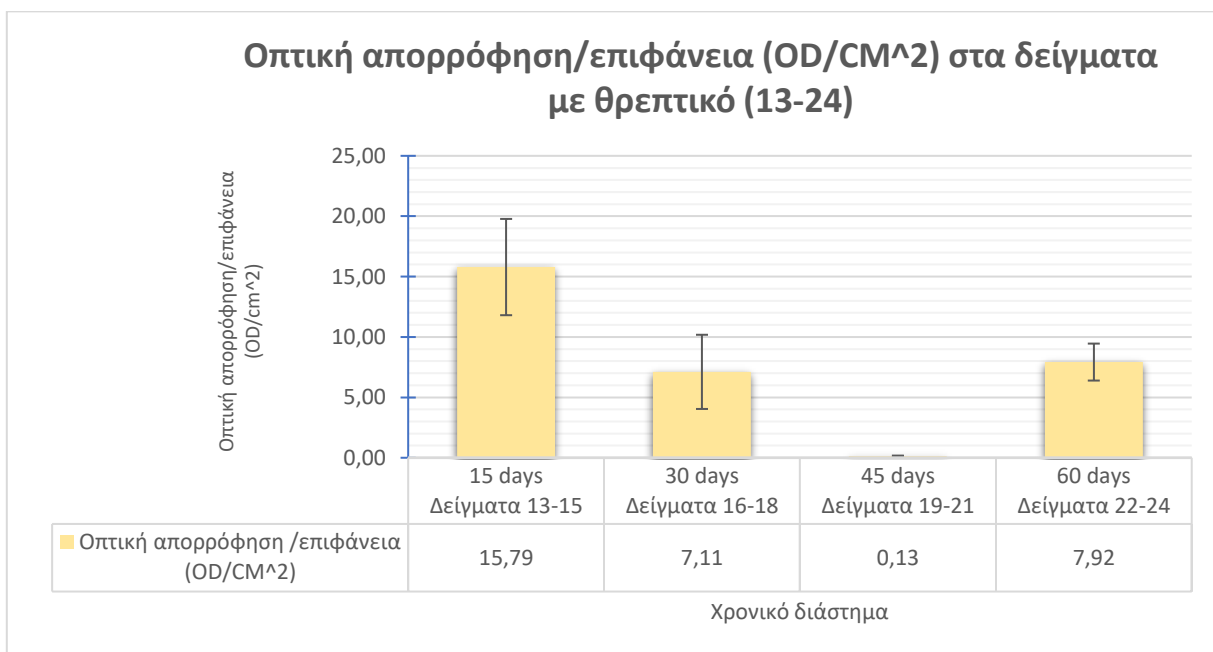
4.3 Αποτελέσματα Ανάπτυξης Βιοφίλμ – Χρώσης Δειγμάτων Με Κρυσταλλικό Ιώδες

Τα βιοφίλμ έχει αποδειχθεί ότι έχουν μεγάλη σημασία για τις μικροβιακές λειτουργίες και τις οικολογικές διεργασίες, ιδιαίτερα σε υδάτινα περιβάλλοντα (Miao et al. 2019). Η ανάπτυξη του βιοφίλμ παρακολούθηθηκε μετρώντας την οπτική του πυκνότητά στα 595 nm, μέσω της διαδικασίας χρώσης του δείγματος με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet), όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 3.2.3. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε σε δύο δείγματα (pellet) από κάθε τριβλίο, και οι μετρήσεις υπολογίστηκαν ανά μονάδα επιφάνειας (OD/cm²). Το κρυσταλλικό ιώδες είναι μία βαφή τριαρυλομεθανίου, η οποία έχει αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και ανθελμινθικές ιδιότητες. Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται

η έκταση του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στο πρώτο μέρος του πειράματος, ενώ το διάγραμμα 3 αναφέρεται στο δεύτερο μέρος.



Διάγραμμα 2: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στο πρώτο μέρος του πειράματος.



Διάγραμμα 3: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στο δεύτερο μέρος του πειράματος.

❖ 1^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 1-12)

Στην πρώτη και δεύτερη δειγματοληψία του πειράματος μας παρατηρείται μία αυξητική τάση του βιοφίλμ, με τον δεύτερο μήνα να έχει την υψηλότερη τιμή απορρόφησης προς την επιφάνεια στα 15,26 OD/cm², με μικρή διαφορά από τον πρώτο μήνα 14,67 OD/cm². Κατά την τρίτη δειγματοληψία παρατηρήθηκε μεγάλη πτώση της τιμής σχεδόν μηδενική και για αυτό δεν θα την λάβουμε υπόψιν, γεγονός που οφείλεται σε πιθανό λάθος κατά την πειραματική διαδικασία. Στην δειγματοληψία του τέταρτου μήνα βλέπουμε μία μικρή μείωση της τιμής στα 13,12 OD/cm², σε σχέση με αυτές του πρώτου και δεύτερου μήνα. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις εξαιρώντας αυτήν του τρίτου μήνα, δείχνουν να υπάρχει ένα σταθερό μοτίβο ανάπτυξης, με μικρές αυξομειώσεις, διαπιστώνοντας ότι η μικροβιακή κοινότητα μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει έχοντας ως μόνη πηγή άνθρακα το HDPE.

❖ 2^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 13-24)

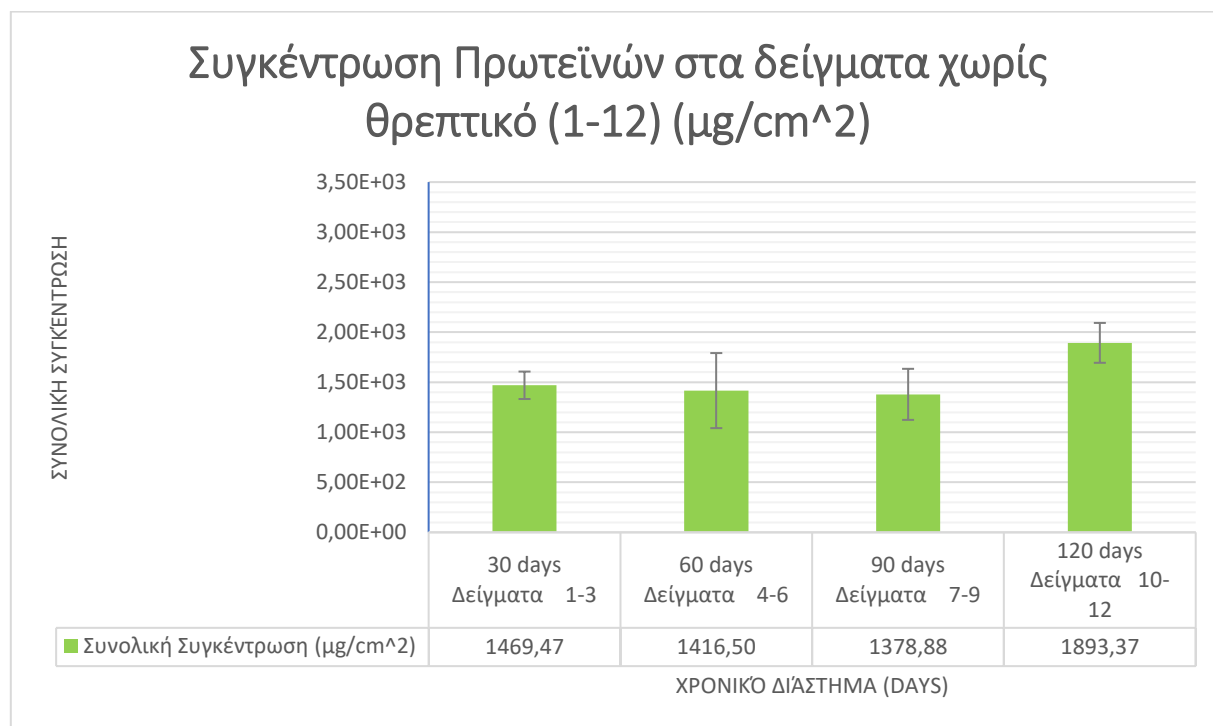
Στην πρώτη δειγματοληψία των δεκαπέντε ημερών η τιμή της απορρόφησης προς την επιφάνεια είναι 15,79 OD/cm². Συγκρίνοντας τις τιμές του πρώτου και δεύτερου μήνα από το πρώτο μέρος του πειράματος, που ήταν 14,67 OD/cm² και 15,26 OD/cm² αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι με την προσθήκη θρεπτικού είχαμε σχεδόν την ίδια ανάπτυξη, αλλά στο μισό και ένα τέταρτο του χρόνου αντίστοιχα. Έπειτα στην δεύτερη δειγματοληψία παρατηρούμε μία αισθητή πτώση της τιμής στα 7,11 OD/cm². Την τρίτη μέτρηση δεν θα την συμπεριλάβουμε στα αποτελέσματα μας, καθώς είναι σχεδόν μηδενική και οφείλεται σε πιθανόν λάθος κατά την πειραματική εκτέλεση του πειράματος. Τέλος παρατηρούμε η τιμή της τέταρτης δειγματοληψίας ανέρχεται στα 7,92 OD/cm² και είναι σχεδόν ίδια με αυτήν της τρίτης.

Τα δύο μέρη του πειράματος έδειξαν διαφορετική συμπεριφορά ως προς την ανάπτυξη του βιοφίλμ, με το πρώτο μέρος του πειράματος να παρουσιάζει ένα σταθερό μοτίβο ανάπτυξης με μικρές αυξομειώσεις, ενώ αυτό του δεύτερου μέρους του πειράματος με την προσθήκη γλυκόζης είχε αρχικώς φθίνουσα συμπεριφορά και τελικώς σταθεροποιείται.

4.4 Αποτελέσματα Προσδιορισμού Ολικών Πρωτεϊνών

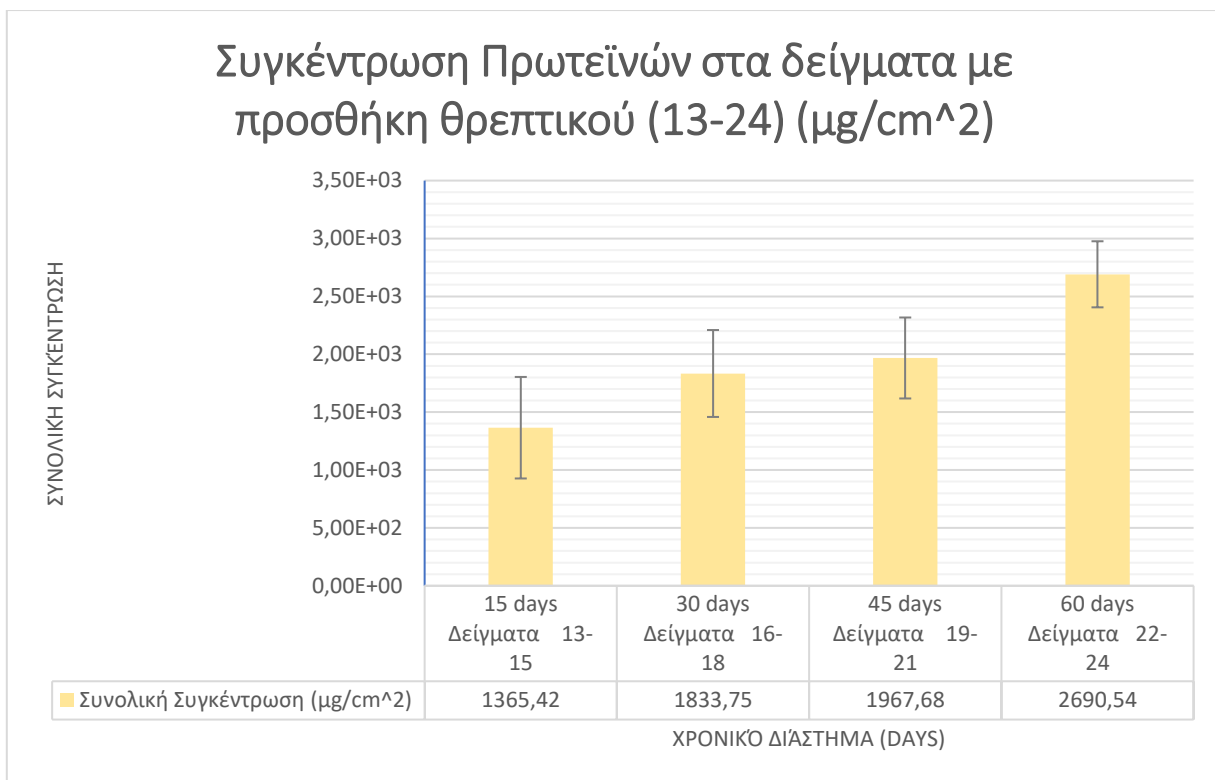
Οι πρωτεΐνες είναι πολύ σημαντικά, πολύπλοκα και πολυδιάστατα βιολογικά μόρια των ζωντανών οργανισμών, που αποτελούνται από εκατοντάδες μικρότερες μονάδες που ονομάζονται αμινοξέα. Τα αμινοξέα είναι ενωμένα μεταξύ τους μέσω πεπτιδικών δεσμών, οι οποίοι σχηματίζονται από την ένωση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την αμινομάδα του επόμενου με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Οι πρωτεΐνες συνεισφέρουν κατά μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη, το μεταβολισμό και την καθημερινή λειτουργία των ζωντανών οργανισμών. Πρωτεΐνες παρόμοιας λειτουργίας έχουν παρόμοια σύνθεση αμινοξέων και αλληλουχία (Encyclopedia Britannica). Τα EPS περιέχουν μια σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών ως ένζυμα, δομικές πρωτεΐνες καθώς και ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση των EPS (Haurowitz and Koshland 2020).

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford στα δείγματα του βιοφίλμ και υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας. Στα διαγράμματα 4 και 5 παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών για το πρώτο και δεύτερο μέρος του πειράματος αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα 1-12 (χωρίς θρεπτικό).

Για το πρώτο μέρος του πειράματος παρατηρείται μία σταθερή τάση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με μικρές διαφορές μεταξύ τους για τον πρώτο, δεύτερο και τρίτο μήνα. Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκαν οι τιμές $1469,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $1416,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ και $1378,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ αντιστοίχως. Ωστόσο για τον τέταρτο μήνα παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης στα $1893,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στις ανεπαρκείς διατροφικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου, ή στην προσπάθεια προσαρμογής των μικροοργανισμών σε αυτές. Αυτό που βλέπουμε είναι η επιβεβαίωση ότι οι μικροοργανισμοί κατάφεραν να επιβιώσουν για τέσσερις μήνες, παρά το γεγονός ότι η μοναδική πηγή άνθρακα που είχαν ήταν το γηρασμένο πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE). Συγκριτικά με τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης, παρατηρούμε ότι στις δύο πρώτες δειγματοληψίες τα διαγράμματα παρουσιάζουν την ίδια σταθερότητα με μικρές αυξομειώσεις. Ενδιαφέρον υπάρχει στον τέταρτο μήνα όπου οι πρωτεΐνες αυξάνονται ενώ η έκταση του βιοφίλμ μειώνεται.

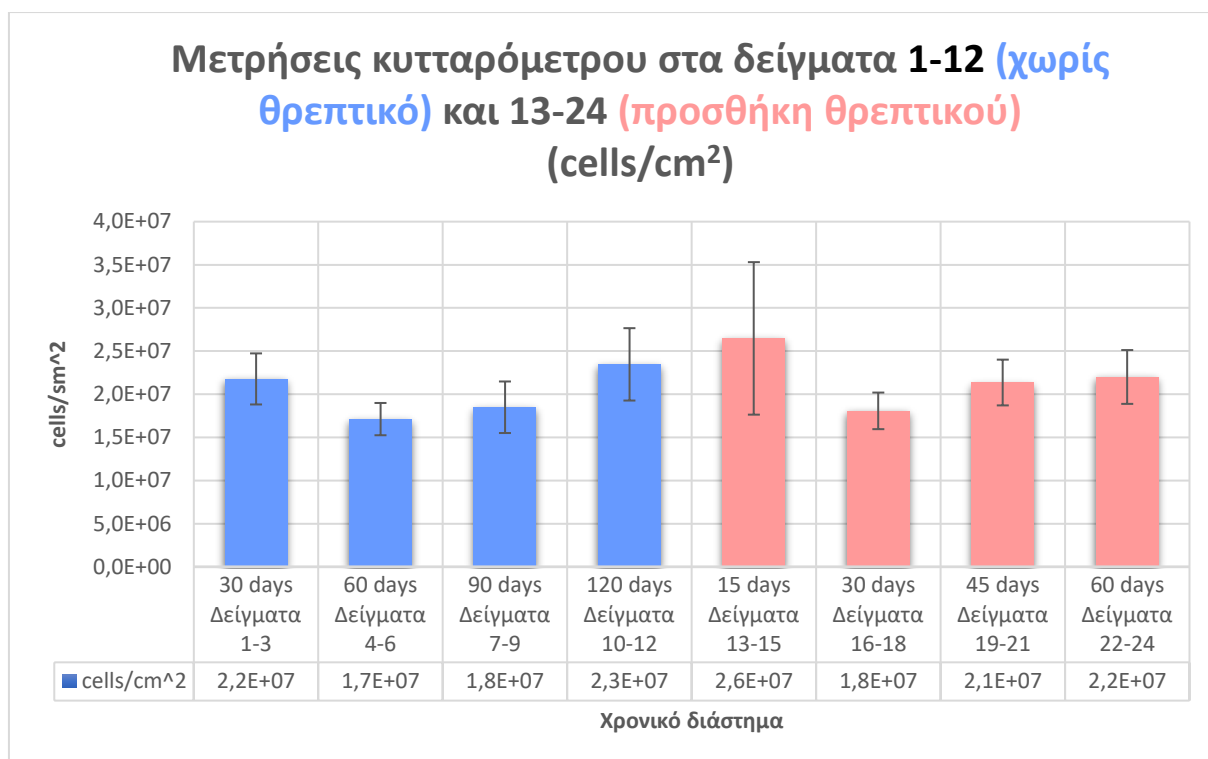


Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα 13-24 (προσθήκη θρεπτικού).

Για το δεύτερο μέρος του πειράματος παρατηρούμε μία σταθερή αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών για όλο το χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση των πρώτων 15 ημερών ήταν $1354,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, στην συνέχεια υπολογίστηκε στα $1833,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ για τις 30 μέρες και συνέχισε να αυξάνετε φτάνοντας τα $1967,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ και $2690,54$, για τις 45 και 60 μέρες αντιστοίχως. Η αύξηση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού και στην τάση τους να παράγουν υδροφοβικές πρωτεΐνες, που τους βοηθούν στην διαδικασία προσκόλλησής τους στην διαθέσιμη επιφάνεια του πλαστικού.

4.5 Υπολογισμός Κυττάρων (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ανίχνευσης. Ο υπολογισμός των κυτταρικών πληθυσμών στα δείγματα μας πραγματοποιήθηκε μέσω του κυτταρόμετρου CytoFLEX. Η κυτταρομετρία ροής για το πρώτο και το δεύτερο μέρος του πειράματος απεικονίζεται στο διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των HDPE pellets.

❖ 1^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 1-12)

Βλέπουμε ότι για το πρώτο μέρος του πειράματος, ο πρώτος μήνας έχει την δεύτερη υψηλότερη τιμή στα $2,2 \cdot 10^7$ cells/cm² και για τον δεύτερο μήνα ακολουθεί μία μείωση στα $1,7 \cdot 10^7$ cells/cm². Στην συνέχεια για τον τρίτο και τέταρτο μήνα, έχουμε μία αυξητική πορεία με τις τιμές να ανέρχονται στα $1,8 \cdot 10^7$ cells/cm² και $2,3 \cdot 10^7$ cells/cm², με αυτήν του τέταρτου μήνα να είναι η υψηλότερη.

❖ 2^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 13-24)

Όσον αφορά το δεύτερο μέρος του πειράματος παρατηρούμε ότι ακολουθείται το ίδιο μοτίβο με αυτό του πρώτου μέρους του πειράματος, με μικρές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, για τον πρώτο μήνα έχουμε την μέγιστη τιμή στα $2,6 \cdot 10^7$ cells/cm² και στην πορεία έπεται μία πτώση της τιμής στα $1,8 \cdot 10^7$ cells/cm² για τον δεύτερο μήνα, ενώ κατά την τρίτη και δεύτερη δειγματοληψία έχουμε σταθερή αύξηση της τιμής στα $2,1 \cdot 10^7$ cells/cm² και $2,2 \cdot 10^7$ cells/cm² αντιστοίχως.

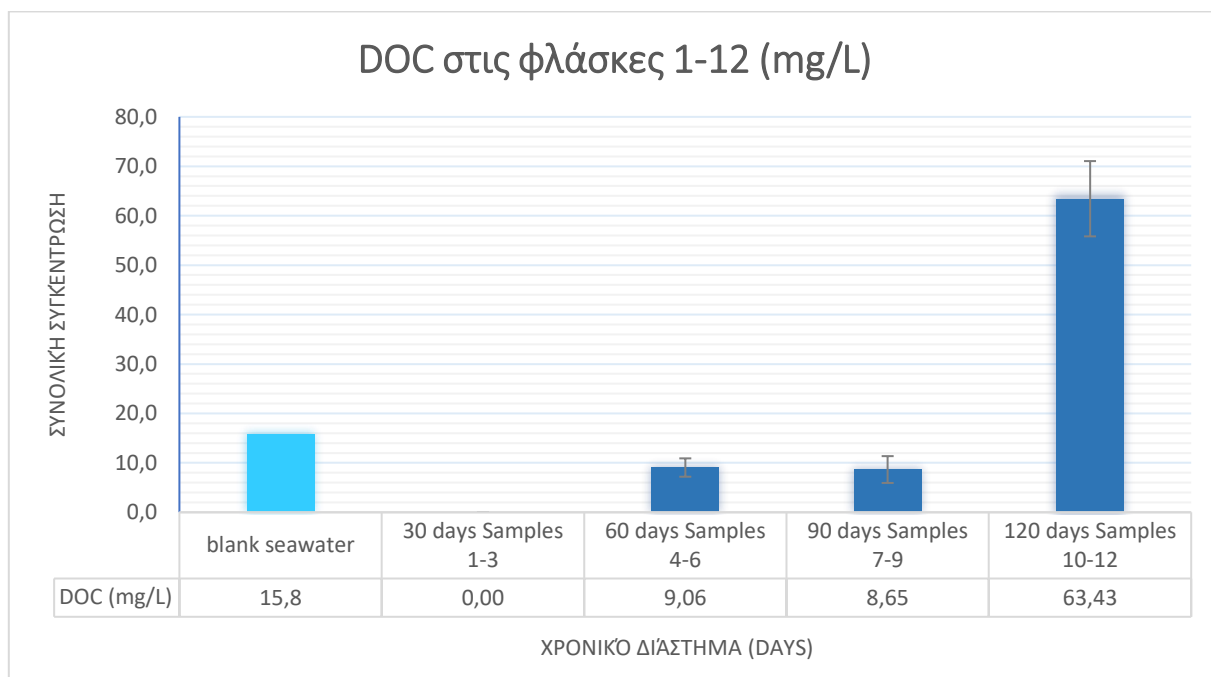
Συμπερασματικά παρατηρούμε την ίδια συμπεριφορά και για τα δύο μέρη του πειράματος και με σχεδόν ίδιες μετρήσεις. Τα αποτελέσματα της μέτρησης των κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές και τα διαγράμματα των πρωτεϊνών συμφωνούν και δείχνουν σχεδόν το ίδιο μοτίβο, με την διαφορά ότι στο δεύτερο μέρος του πειράματος, κατά την πρώτη δειγματοληψία η τιμή συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ήταν η χαμηλότερη, ενώ αυτή των κυττάρων ήταν η υψηλότερη. Με βάση τις συγκεκριμένες μετρήσεις, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η

προσθήκη γλυκόζης δεν επηρέασε σημαντικά την εγκατάσταση και αύξηση του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροπλαστικών, γεγονός που φαίνεται και στη μείωση του βάρους.

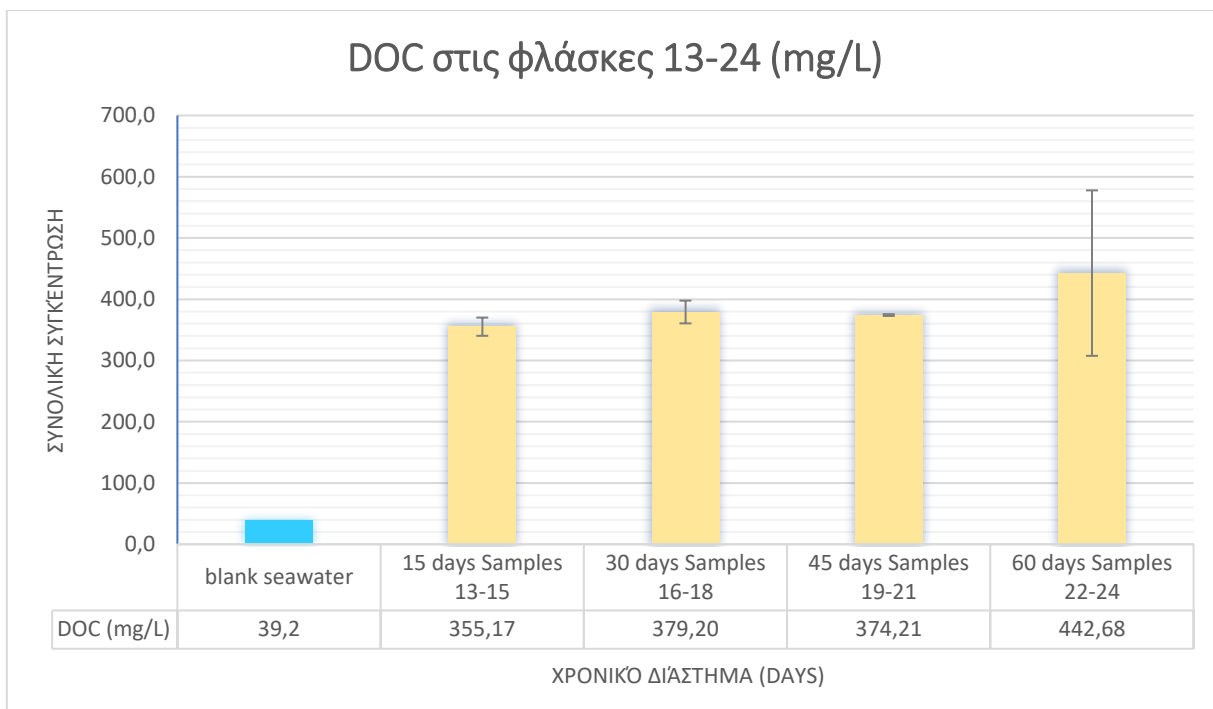
4.6 Αποτελέσματα διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στην υγρή φάση

Η υψηλή παρουσία μικροπλαστικών ως ανθεκτικών οργανικών σωματιδίων στο θαλάσσιο οικοσύστημα έχει σημαντικές επιπτώσεις, διότι τα μικροπλαστικά λειτουργούν ως υποστρώματα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Galgani et al., 2018). Με την αποδόμηση των μικροπλαστικών απελευθερώνεται διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) στο θαλάσσιο περιβάλλον, διεγείροντας παράλληλα τη δραστηριότητα των ετεροτροφικών μικροβίων. Εκτιμήσεις δείχνουν ότι ετησίως έως 23.600 μετρικών τόνων DOC απελευθερώνεται από θαλάσσια πλαστικά σε παγκόσμιο επίπεδο και το 60% από αυτά είναι διαθέσιμο για μικροβιακή χρήση (βιοδιαθέσιμο) σε λιγότερο από 5 ημέρες. Η τύχη του υπόλοιπου 40% που δεν λαμβάνεται γρήγορα από βακτήρια δεν είναι γνωστή (Romera-Castillo et al., 2018).

Στο διάγραμμα 7 και 8 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) που περιέχεται στην υγρή φάση στο πρώτο και δεύτερο μέρος του πειράματος.



Διάγραμμα 7: Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στο πρώτο μέρος του πειράματος (Δείγματα 1-12).



Διάγραμμα 8: Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στο δεύτερο μέρος του πειράματος (Δείγματα 13-24).

Το blank seawater ήταν δείγμα που περιείχε μόνο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και μετρήθηκε για να έχουμε μια βάση σύγκρισης των πειραματικών δειγμάτων. Η τιμή της συγκέντρωσης του DOC σε αυτό είναι 15,8 mg/L και 39,2 mg/L, για το πρώτο και δεύτερο μέρος του πειράματος αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι ξεκινώντας την μέρα μηδέν στα δείγματα 13-14 η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 1 mg/ml.

❖ **1^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 1-12)**

Από την πρώτη δειγματοληψία βλέπουμε ότι ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας είναι μηδέν υποδηλώνοντας ότι οι μικροοργανισμοί κατανάλωσαν τον άνθρακα του θαλασσινού νερού. οι μικροοργανισμοί δεν έχουν ακόμα επεξεργαστεί το πολυμερές και έτσι δεν έχουμε κάποια τιμή του DOC. Στην συνέχεια για τον δεύτερο μήνα η συγκέντρωση βρέθηκε 9,06 mg/L, η οποία έμεινε σχεδόν σταθερή και για τον τρίτο μήνα στα 8,65 mg/L. Στον τέταρτο μήνα υπήρξε αύξηση της τιμής στα 63,43 mg/L. Αυτή η αύξηση που υπάρχει στον τέταρτο μήνα σε σχέση με το blank seawater μας δείχνει την επιτυχή προσπάθεια του βιοφίλμ να αποικίσει το HDPE και την διάσπαση του απελευθερώνοντας DOC.

❖ **2^ο Μέρος του πειράματος (Δείγματα 13-24)**

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος η προσθήκη γλυκόζης συγκέντρωσης 1000 mg/L, κάνει αισθητή την διαφορά στις τιμές της συγκέντρωσης του DOC όντας πολύ μεγαλύτερες από αυτές του πρώτου μέρους. Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη δειγματοληψία η τιμή του διαλυμένου οργανικού άνθρακα βρέθηκε 355,17 mg/L, στην δεύτερη έφτασε τα 379,20 mg/L, στην τρίτη μειώθηκε ελάχιστα στα 374,20 mg/L και την τέταρτη δειγματοληψία που είχαμε την μεγαλύτερη τιμή έφτασε τα 442,68 mg/L. Συγκρίνοντας τα δύο πειραματικά μέρη βλέπουμε

ότι σε διάστημα 30 ημερών για το πρώτο μέρος δεν έχουμε κάποια τιμή, ενώ στο δεύτερο με την προσθήκη γλυκόζης 1000 mg/L από την αρχή του πειράματος η τιμή φτάνει τα 379,20 mg/L και σε χρονικό διάστημα δύο μηνών στο πρώτο μέρος η συγκέντρωση είναι 9,06 mg/L, ενώ στο δεύτερο μέρος με την ίδια συγκέντρωση γλυκόζης η τιμή φτάνει τα 442,68 mg/L.

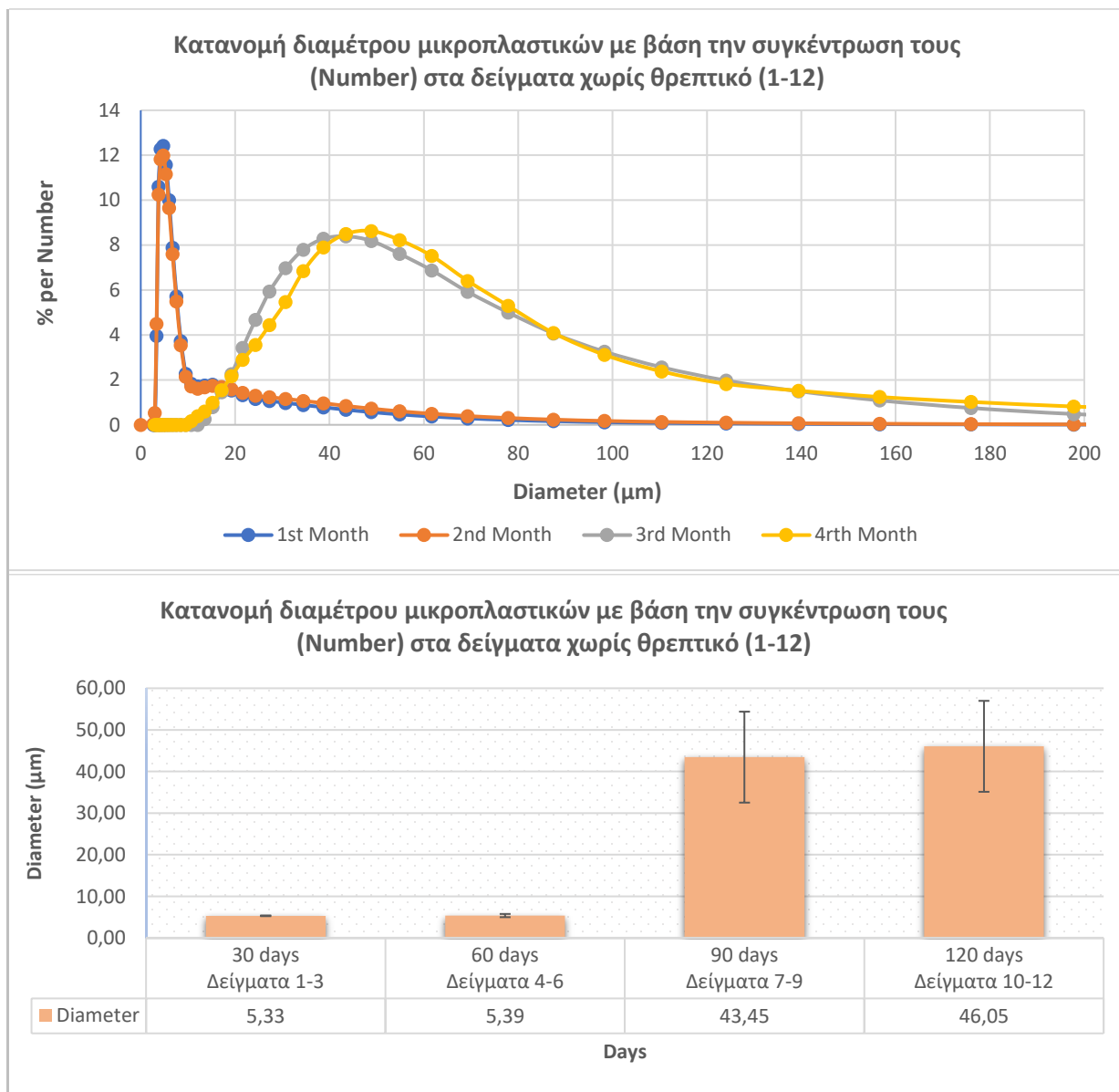
Σημειώνεται ότι η διαδικασία γήρανσης και η αποδόμηση του πλαστικού στα δείγματά μας που προκαλεί την μικρή τοπική θραύση των μικροσφαιριδίων, πιθανότατα διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο. Αυτό συνέβαλε πιθανώς στην αύξηση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC), καθώς η αυξημένη επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο του πλαστικού μπορούσε να επηρεάσει τη διαδικασία. Ωστόσο, παρά τις πολλές έρευνες σχετικά με αυτό το θέμα, ο ρόλος των πλαστικών στην αύξηση του DOC στο θαλάσσιο περιβάλλον, η διαδικασία της βιοαποδόμησης τους, και οι επιπτώσεις τους στα θαλάσσια οικοσυστήματα παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι (Romera-Castillo et al., 2018).

4.7 Αποτελέσματα Κατανομής Μεγέθους Μικροπλαστικών

Τα δευτερογενή μικροπλαστικά που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκαν μέσω του μηχανήματος SALD-7500 Nano. Από τα δεδομένα του συστήματος δημιουργήθηκαν δύο είδη διαγραμμάτων, ο συνδυασμός των οποίων προσφέρει μια ολοκληρωμένη εικόνα της διασποράς μεγέθους των μικροπλαστικών μέσα στο υγρό. Τα διαγράμματα διακρίνονται στα διαγράμματα ποσότητας (number), όπου παρουσιάζονται τα μεγέθη των μικροπλαστικών HDPE δίνοντας έμφαση στην συγκέντρωση των στερεών μικροσωματιδίων, και στα διαγράμματα όγκου (volume), όπου παρουσιάζεται η διασπορά του μεγέθους τους με κύρια παράμετρο τον όγκο των στερεών μικροσωματιδίων. Με λίγα λόγια, το διάγραμμα κατά αριθμό διακρίνει τι υπερισχύει ποσοτικά μέσα στο κάθε δείγμα και το διάγραμμα όγκου διακρίνει τι υπερισχύει ογκομετρικά μέσα στο δείγμα.

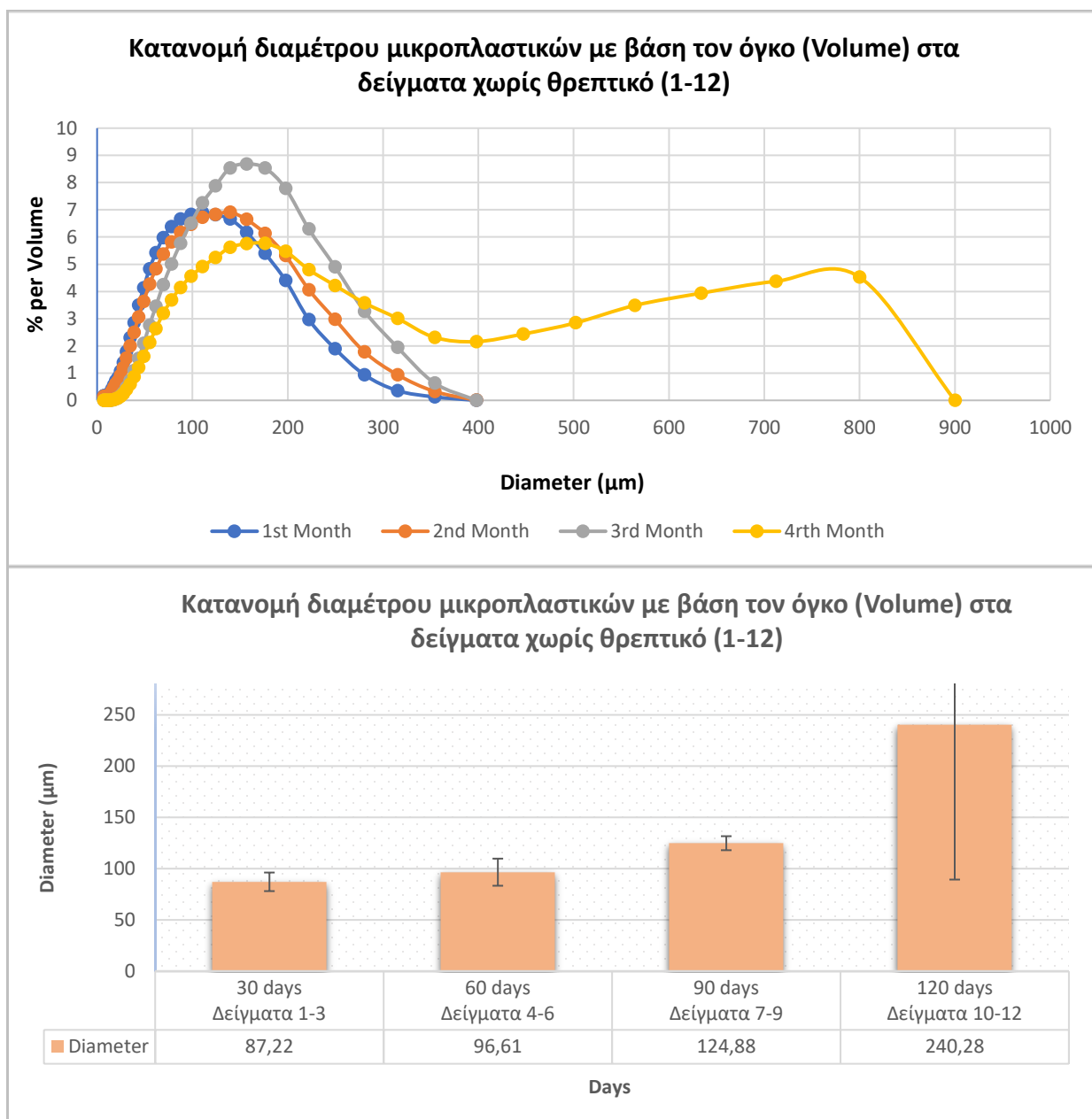
Τα διαγράμματα στήλης που παρουσιάζονται στη συνέχεια περιλαμβάνουν τιμές διαμέτρου, οι οποίες αναφέρονται στη μέση διάμετρο (Median). Συγκεκριμένα, οι κατηγορίες που εξετάζονται ορίζονται ως εξής: μακροπλαστικά με διάμετρο μεγαλύτερη από 20 mm, μεσοπλαστικά με διάμετρο από 5 έως 20 mm, μικροπλαστικά με διάμετρο από 1 μm έως 5 mm, και νανοπλαστικά με διάμετρο μικρότερη από 1 μm.

4.7.1 Διαγράμματα κατανομής διαμέτρου μικροπλαστικών πρώτου πειραματικού μέρους



Διάγραμμα 9: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους (Number) στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανομή διαμέτρου με κριτήριο τον αριθμό των σωματιδίων μέσα στα δείγματα του πρώτου μέρους του πειράματος. Όπως παρατηρείται τους πρώτους δύο μήνες η διάμετρος των σωματιδίων παραμένει σταθερή με μικρές διαφορές μεταξύ τους, συγκεκριμένα 5,33 μm και 5,39 μm για τον πρώτο και δεύτερο μήνα αντίστοιχα. Στην συνέχεια η τιμή του τρίτου και τέταρτου μήνα παρουσιάζει σημαντική αύξηση στα 43,45 μm και 46,05 μm .



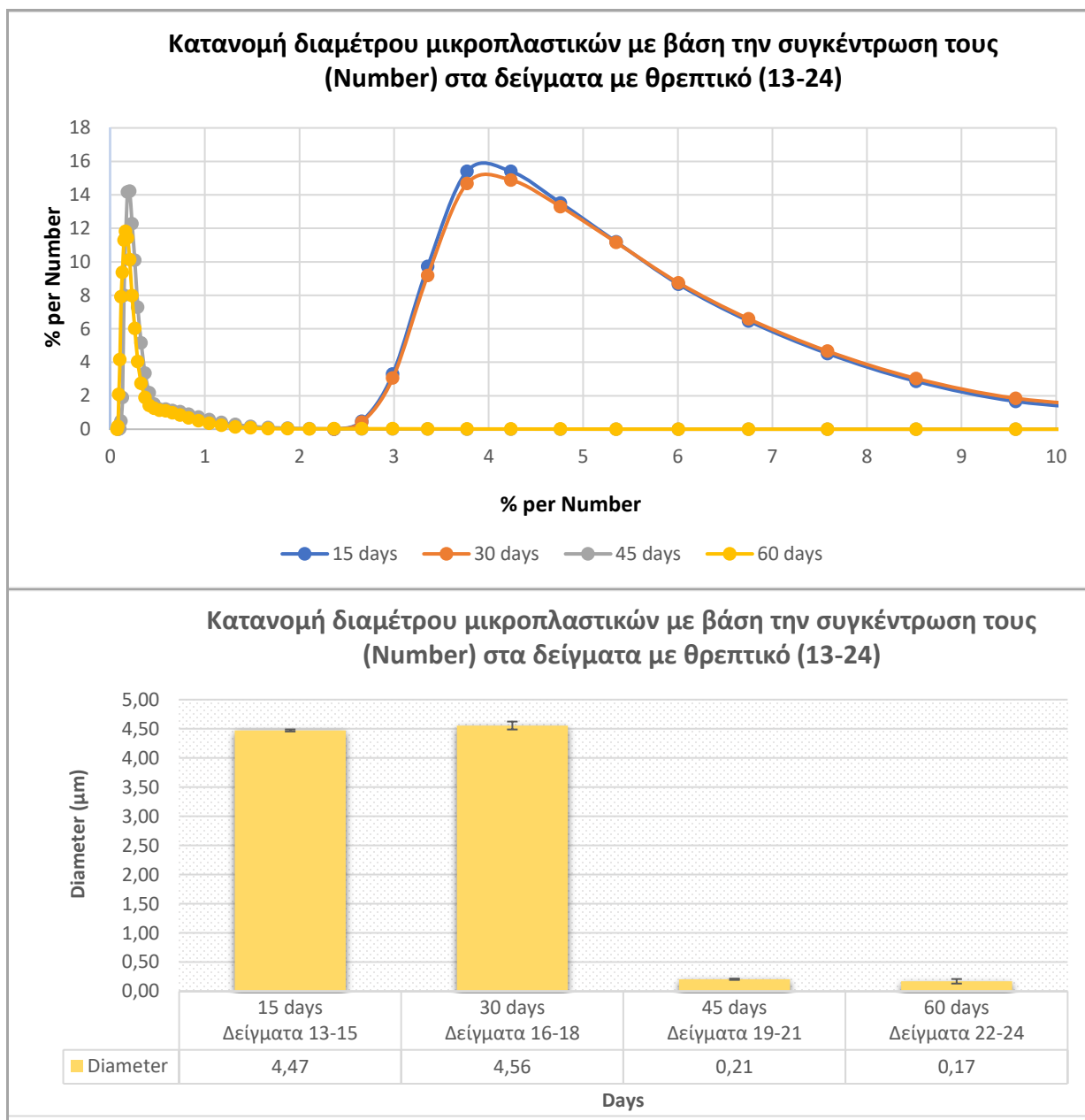
Διάγραμμα 10: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο (Volume) στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12).

Στο διάγραμμα 10 παρατηρείται η κατανομή διαμέτρου των μικροπλαστικών με κύρια παράμετρο τον όγκο τους στο πρώτο μέρος του πειράματος. Βλέπουμε μία αξιοσημείωτη αύξηση των τιμών και στους τέσσερις μήνες με τον τέταρτο μήνα να παρουσιάζει αισθητή αύξηση σε σύγκριση με τον τρίτο.

Σχολιασμός 1^{ου} πειραματικού μέρους

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα δύο γραφήματα δείχνουν ότι η κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών μεταβάλλεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Στο γράφημα της κατανομής με βάση τον αριθμό, παρατηρείται ότι στους πρώτους δύο μήνες τα μικροπλαστικά διατηρούν μικρές διαμέτρους (5,33–5,39 μm), υποδεικνύοντας περιορισμένη δραστηριότητα συσσωμάτωσης ή κατακερματισμού. Ωστόσο, τον 3ο και 4ο μήνα, οι μέσες διάμετροι αυξάνονται (43,45 μm και 46,05 μm αντίστοιχα), υποδηλώνοντας έντονη συσσωμάτωση ή αποκόλληση μεγαλύτερων σωματιδίων από βιοφίλμ. Παράλληλα, το γράφημα της κατανομής με βάση τον όγκο δείχνει σταδιακή αύξηση της μέσης διαμέτρου, με τιμές από 87,22 μm τον 1ο μήνα να φτάνουν τα 240,28 μm τον 4ο μήνα, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα μεγαλύτερα σωματίδια κυριαρχούν σε όγκο λόγω συσσωμάτωσης. Συνολικά, τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παραγωγή μεγαλύτερων σωματιδίων κυριαρχεί με την πάροδο του χρόνου.

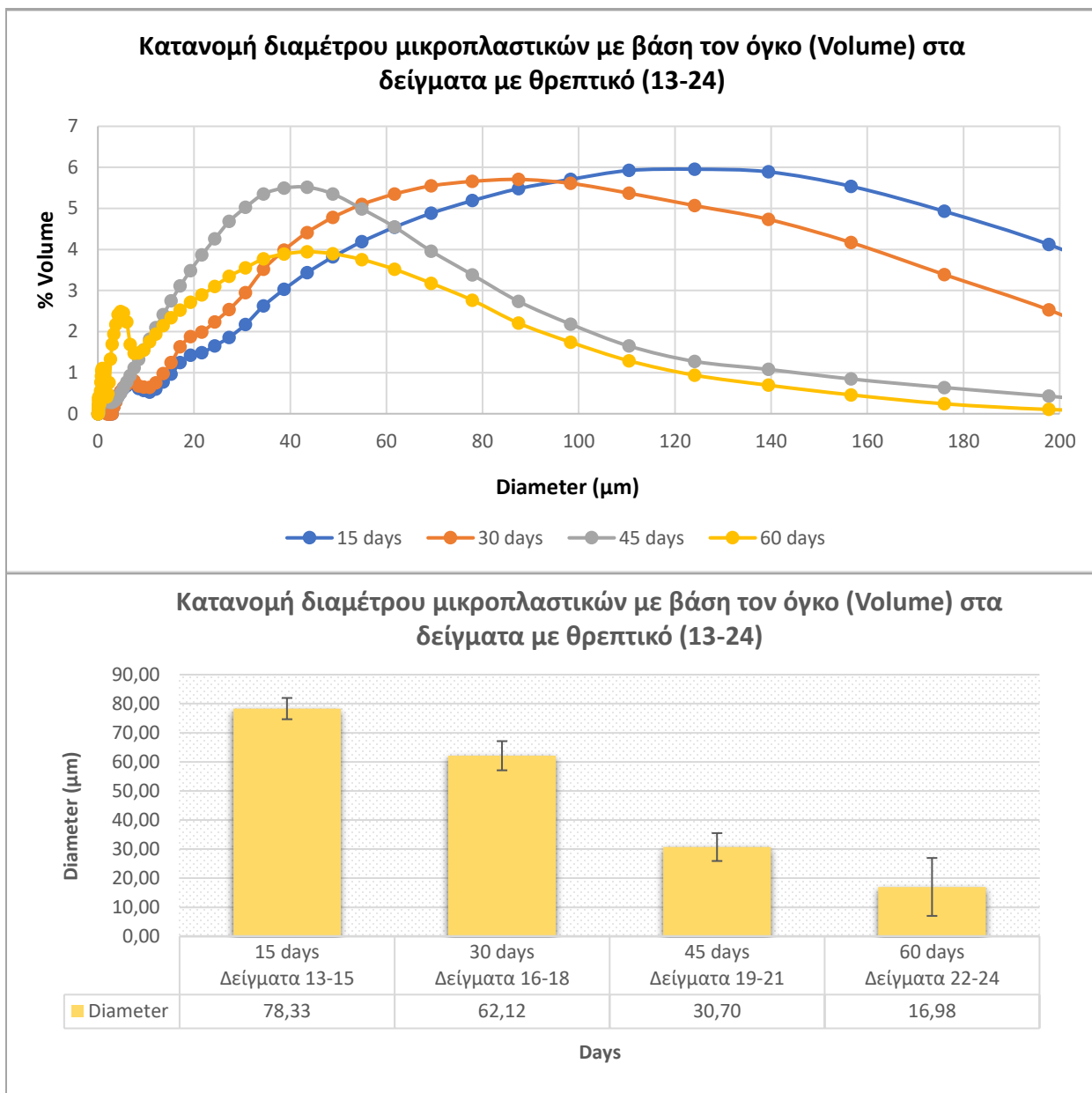
4.7.2 Διαγράμματα κατανομής διαμέτρου μικροπλαστικών δευτέρου πειραματικού μέρους



Διάγραμμα 11: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους (Number) στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).

Στο διάγραμμα 11 απεικονίζεται η κατανομή διαμέτρου με κριτήριο τον αριθμό των σωματιδίων μέσα στα δείγματα του δευτέρου μέρους του πειράματος. Όπως παρατηρείται στις δύο πρώτες δειγματοληψίες η διάμετρος των σωματιδίων παραμένει σταθερή με μικρές διαφορές μεταξύ τους, συγκεκριμένα 4,47 μm και 4,56 μm για τις πρώτες 15 και 30 μέρες

αντίστοιχα. Στις επόμενες δειγματοληψίες παρουσιάζει σημαντική μείωση των μεγεθών στα 0,21 μm και 0,17 μm , υποδηλώνοντας την παραγωγή νανοπλαστικών.



Διάγραμμα 12: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο (Volume) στα δείγματα με θρεπτικό (13-24).

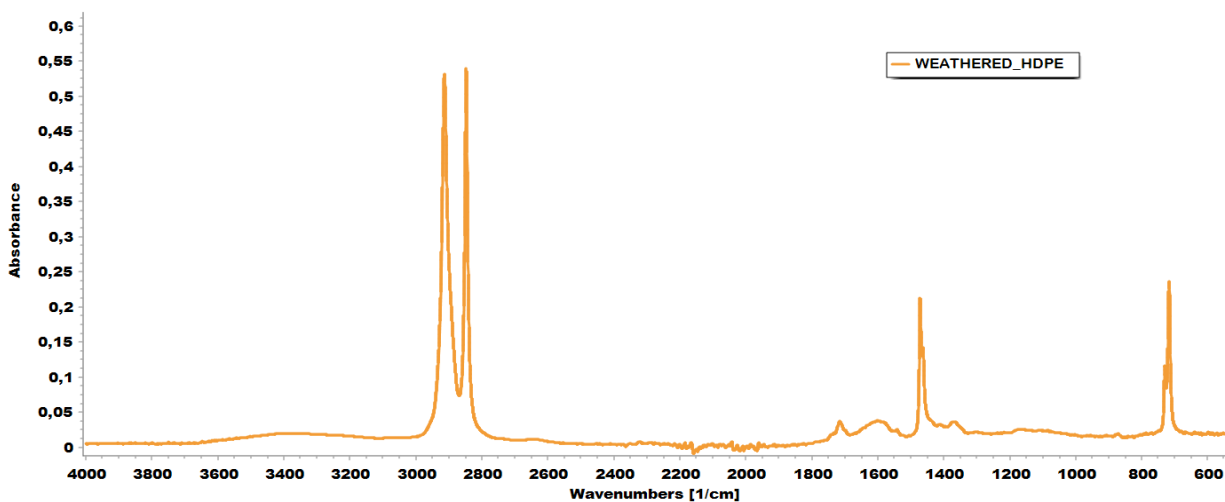
Στο διάγραμμα 12 παρατηρείται η κατανομή διαμέτρου των μικροπλαστικών με κύρια παράμετρο τον όγκο τους στο δεύτερο μέρος του πειράματος. Βλέπουμε μείωση των τιμών και στις 4 δειγματοληψίες με τον δεύτερο μήνα να παρουσιάζει την μικρότερη τιμή.

Σχολιασμός 2^{ου} πειραματικού μέρους

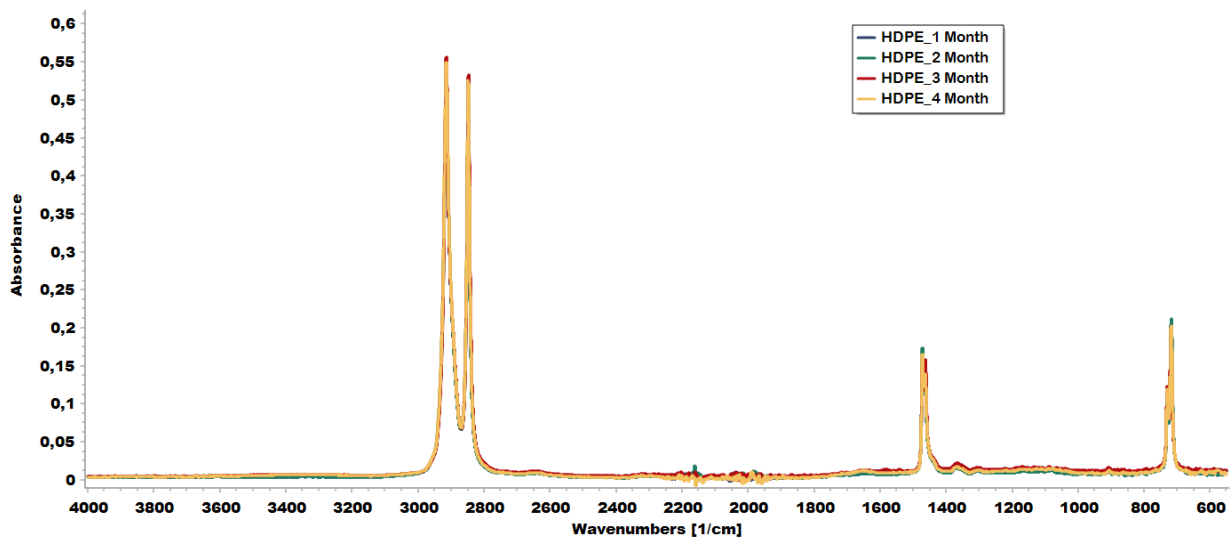
Τα αποτελέσματα των δύο γραφημάτων δείχνουν ότι η παρουσία θρεπτικού υλικού επηρεάζει σημαντικά την κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών με την πάροδο του χρόνου. Στο γράφημα με βάση τον όγκο, παρατηρείται σταδιακή μείωση της μέσης διαμέτρου, από 78,33 μm στις 15 ημέρες σε 16,98 μm στις 60 ημέρες, υποδεικνύοντας έντονο κατακερματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων. Στο γράφημα με βάση τον αριθμό, η μέση διάμετρος παραμένει μικρή στις 15 και 30 ημέρες (4,47–4,56 μm), ενώ μειώνεται δραματικά στις 45 και 60 ημέρες (0,21–0,17 μm), δείχνοντας την αποδόμηση σε νανοπλαστικά. Η πτωτική τάση στη διάμετρο τόσο στον αριθμό όσο και στον όγκο υποδεικνύει ότι η μικροβιακή δράση και οι φυσικοχημικές διεργασίες που ενισχύονται από το θρεπτικό υλικό επιταχύνουν την αποδόμηση των μικροπλαστικών, οδηγώντας σε σημαντική μείωση του μεγέθους τους.

4.8 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

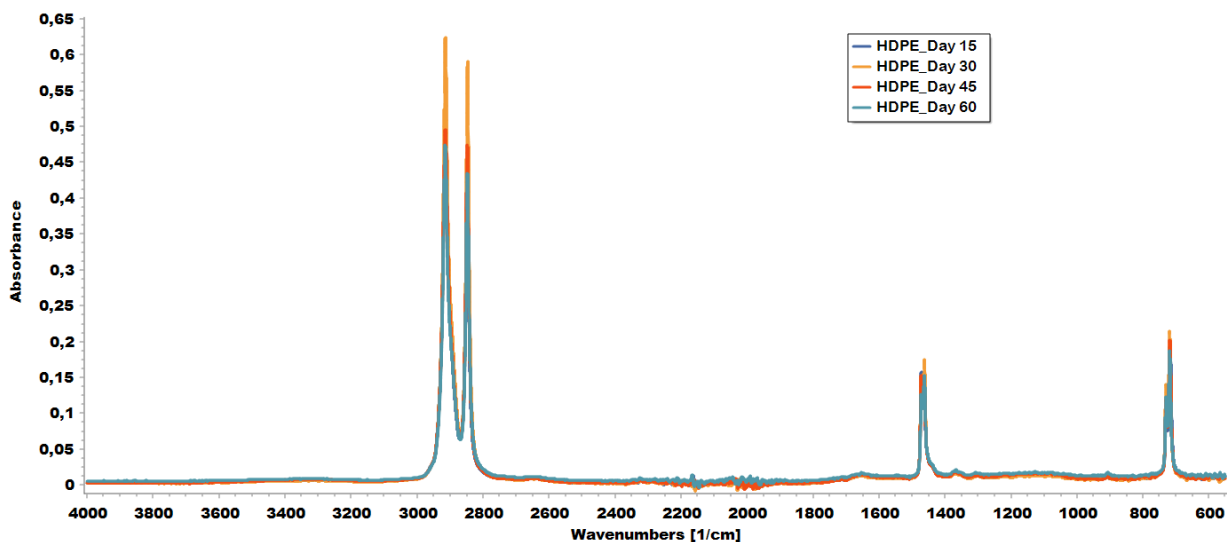
Το ATR (Attenuated Total Reflectance) είναι μια προηγμένη τεχνική φασματοσκοπίας που επιτρέπει την ανάλυση της επιφάνειας δειγμάτων χωρίς εκτενή προετοιμασία. Στο πλαίσιο του πειράματός μας, η φασματοσκοπία ATR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιφανειακών οξειδώσεων του πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το φασματόμετρο Nicolet™ iS50 FTIR, εξοπλισμένο με εξάρτημα ATR από διαμάντι (Thermo Scientific, ΗΠΑ). Η ανάλυση σάρωσης, ορίστηκε στα 4 cm^{-1} για τιμές απορρόφησης από 4000 και 400 cm^{-1} . Τα φάσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Spectragryph έκδοση 1.2.14 (Menges, n.d.). Οι μεταβολές στη χημική δομή της επιφάνειας παρατηρήθηκαν μέσω του υπολογισμού δεικτών που συνδέονται με τη διαδικασία αποδόμησης των πλαστικών πολυμερών. Οι υπολογιζόμενοι δείκτες περιλάμβαναν τον δείκτη κετόνης, τον δείκτη εστέρα, τον δείκτη βινυλίου και τον δείκτη διπλού δεσμού. Στα παρακάτω διαγράμματα 13, 14 και 15 απεικονίζονται οι μεταβολές στους επιφανειακούς δεσμούς των μικροπλαστικών, που προκύπτουν από τη φωτοοξείδωση και τη βιοαποδόμηση.



Διάγραμμα 13: Φάσμα ATR-FTIR μικροπλαστικού HDPE που έχει εκτεθεί σε UV-A ακτινοβολία.



Διάγραμμα 14: Φάσματα ATR-FTIR του πρώτου πειραματικού μέρους (Δείγματα 1-12).

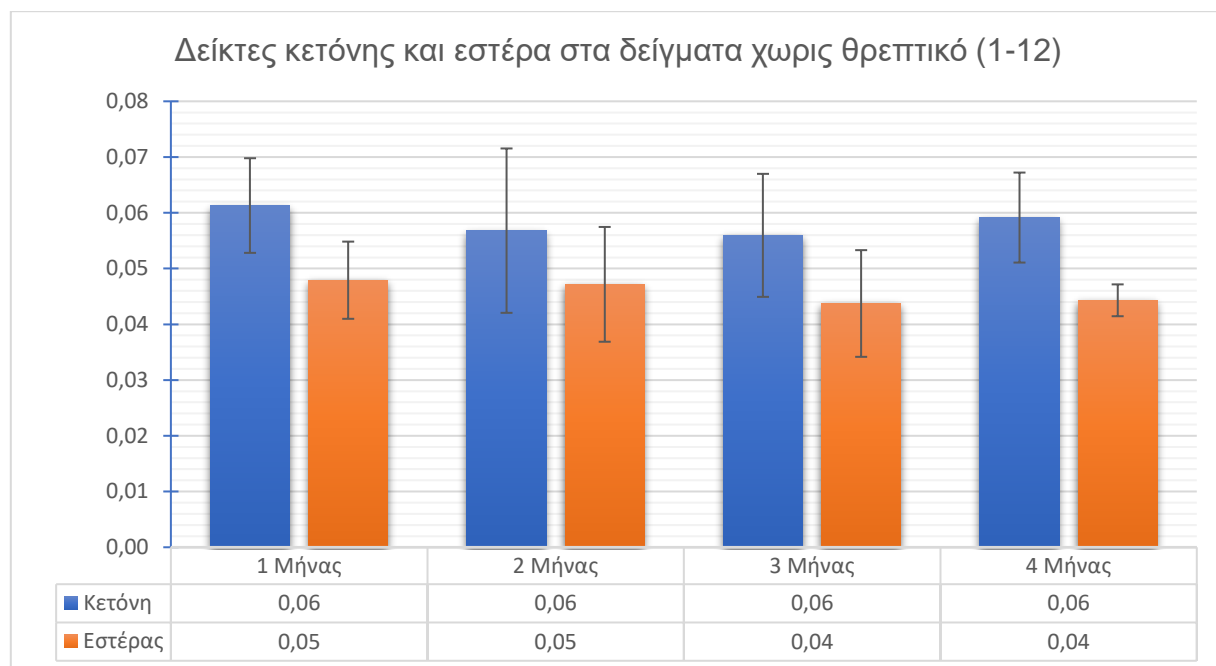


Διάγραμμα 15: Φάσματα ATR-FTIR του δεύτερου πειραματικού μέρους (Δείγματα 13-24).

Τα φάσματα ATR-FTIR του HDPE παρουσιάζουν σχεδόν την ίδια συμπεριφορά και στα δύο μέρη του πειράματος. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του PE συναντώνται στα 2.919 cm^{-1} , 2.850 cm^{-1} (-CH), 1.460 cm^{-1} , 1.470 cm^{-1} (-CH) και $720\text{--}730\text{ cm}^{-1}$ (-CH) (Syranidou et al., 2017), όπου παρέμειναν σταθερές σε όλα τα δείγματα υποδηλώνοντας ότι η βασική μοριακή δομή του πολυμερούς διατηρείται. Η διάταση (-OH) των καρβοξυλικών οξέων στην περιοχή $3000\text{--}3650\text{ cm}^{-1}$ ανιχνεύθηκε στα HDPE που είχαν υποστεί γήρανση (weathered HDPE). Επιπλέον, παρατηρήθηκε η διάταση των δεσμών C=C στα 1600 cm^{-1} τα γηρασμένα μικροπλαστικά. Επίσης για τα MPs που είχαν εκτεθεί μόνο σε UV-A ακτινοβολία, ανιχνεύθηκε

κορυφή στα 1720 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη διάταση του δεσμού $\text{C}=\text{O}$ και αποτελούν ένδειξη φωτοοξειδωσης. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα φάσματα και για τα δύο μέρη του πειράματος που υποβλήθηκαν σε μικροβιακή επεξεργασία ήταν παρόμοια με εκείνα των παρθένων πολυμερών. Η κρυσταλλικότητα, η οποία σχετίζεται με την κορυφή στα 720 cm^{-1} , δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές, γεγονός που δείχνει ότι η δομή του HDPE δεν έχει υποβαθμιστεί σημαντικά σε αυτό το χρονικό διάστημα. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το HDPE δεν έχει υποστεί σημαντική βιοαποδόμηση ή οξείδωση στο υπό μελέτη χρονικό διάστημα, επιβεβαιώνοντας την υψηλή σταθερότητα του υλικού σε θαλάσσιες συνθήκες. Ωστόσο, παρατηρείται πως εξαλείφθηκαν οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας και το γηρασμένο αρχικό πολυμερές μοιάζει με το παρθένο πολυμερές μετά από την έκθεση του στους μικροοργανισμούς.

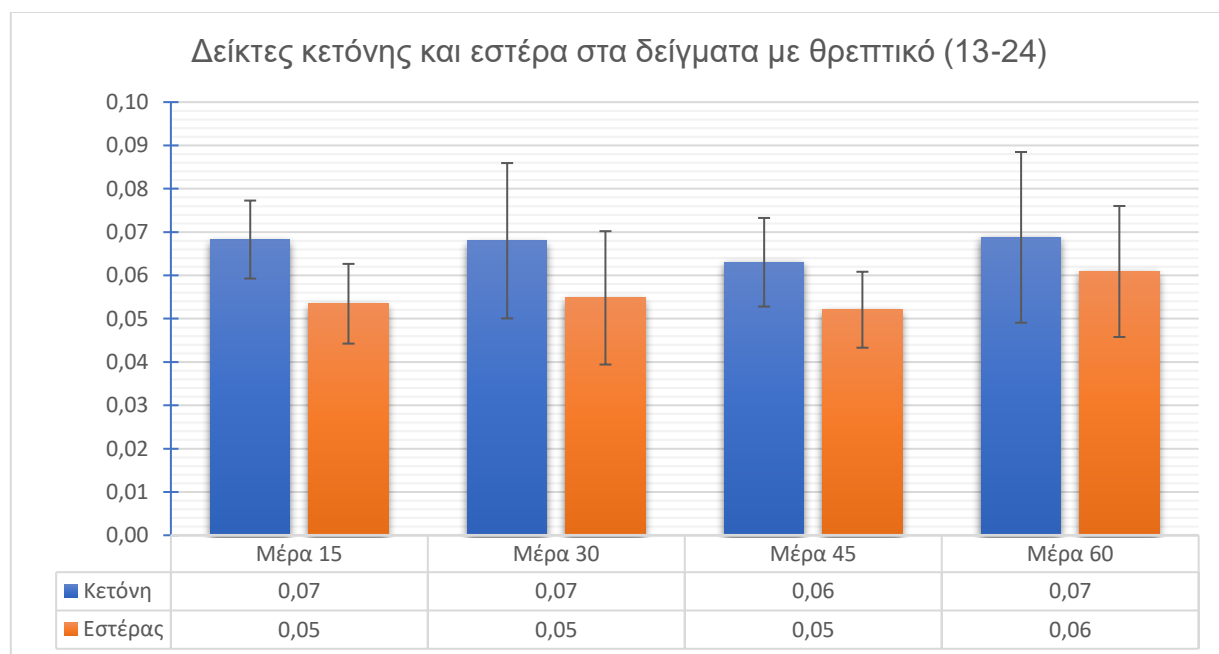
4.8.1 Δείκτες Κετόνης και Εστέρα



Διάγραμμα 16: Δείκτες κετόνης και εστέρα στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12)

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι δείκτες κετόνης και εστέρα για το πρώτο μέρος του πειράματος, που διατηρήθηκαν χωρίς την προσθήκη θρεπτικού μέσου για χρονικό διάστημα τεσσάρων μηνών. Οι εν λόγω δείκτες συνδέονται κυρίως με την έκθεση στην ακτινοβολία, ενώ η δράση των μικροοργανισμών τους επηρεάζει σε μικρότερη κλίμακα. Παρατηρείται ότι οι τιμές της κετόνης παραμένουν σταθερές στους 0,06 κατά τη διάρκεια των τεσσάρων μηνών, ενώ οι τιμές του εστέρα μειώνονται ελαφρώς από 0,05 στους δύο πρώτους μήνες σε 0,04 στους επόμενους δύο. Καθώς το πείραμα διεξήχθη σε εσωτερικό χώρο, χωρίς την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, μπορούμε να πούμε ότι η μείωση οφείλεται σε

βιοαποδόμηση του πολυμερούς με την πάροδο του χρόνου, έστω και σε αυτήν τη μικρή κλίμακα. Ωστόσο οι τιμές είναι πολύ χαμηλές και θεωρούνται μηδενικές.

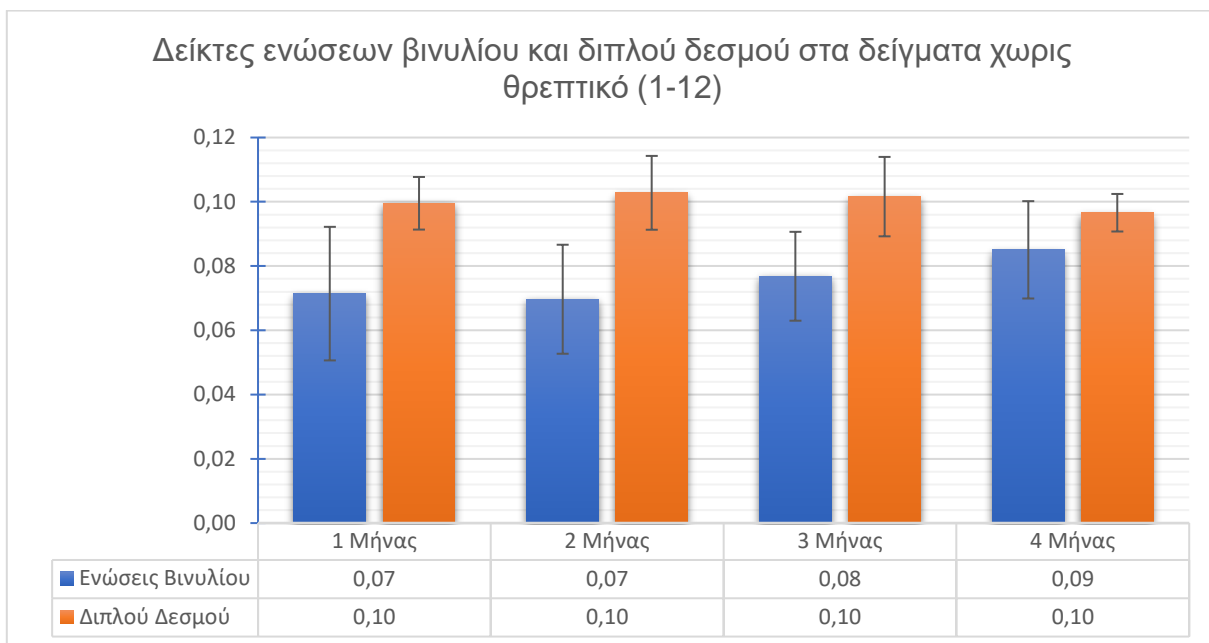


Διάγραμμα 17: Δείκτες κετόνης και εστέρα στα δείγματα με θρεπτικό (13-24)

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 17, οι δείκτες κετόνης και εστέρα στο δεύτερο μέρος του πειράματος ακολουθούν σχεδόν το ίδιο μοτίβο με αυτό του πρώτου. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές των κετονών παραμένουν σχετικά σταθερές στα 0,07 για τις ημέρες 15, 30 και 60, ενώ σημειώνεται μια μικρή μείωση στα 0,06 την ημέρα 45. Οι δείκτες εστέρα διατηρούνται στα 0,05 για τις πρώτες 45 ημέρες, ενώ παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση σε 0,06 την ημέρα 60. Ωστόσο οι τιμές είναι πολύ χαμηλές και θεωρούνται μηδενικές.

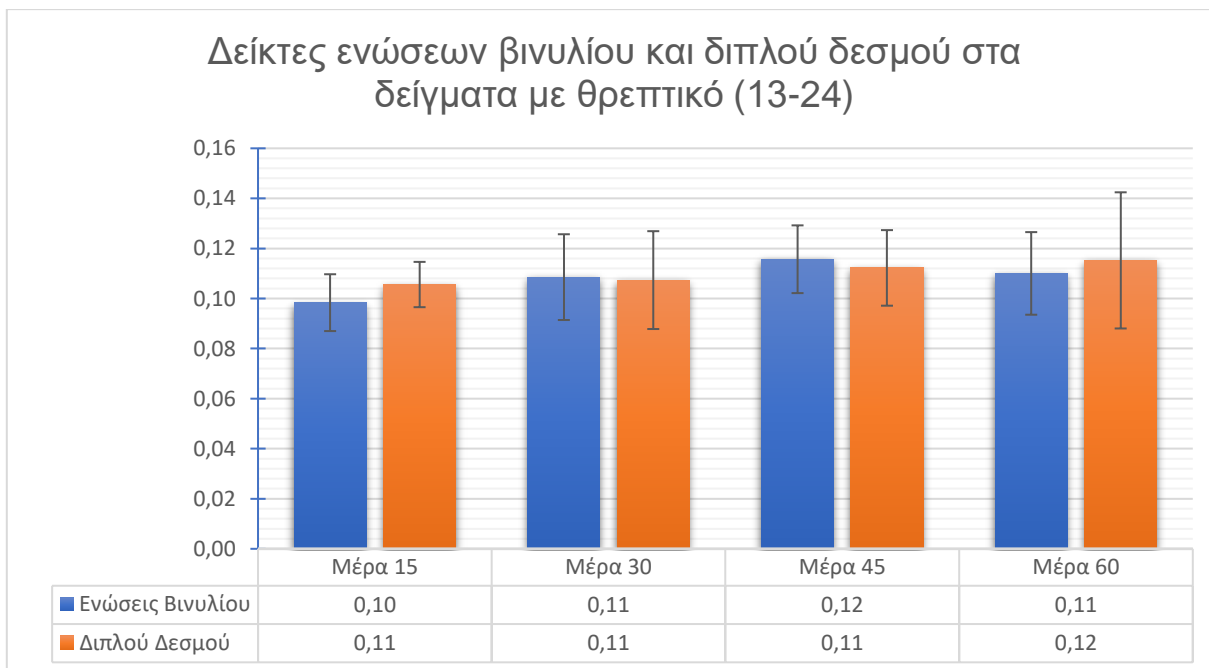
Οι δείκτες κετόνης και εστέρα των γηρασμένων HDPE υπολογίστηκαν 0,28 και 0,14 αντίστοιχα. Παρατηρείται, σε σχέση με τα δύο πειραματικά μέρη, όπως φαίνεται και στα φάσματα παραπάνω, πως εξαλείφθηκαν οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας και το γηρασμένο αρχικό πολυμερές μοιάζει με το παρθένο πολυμερές μετά από την έκθεση του στους μικροοργανισμούς.

4.8.2 Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού



Διάγραμμα 18: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12)

Στο διάγραμμα 18 παρουσιάζονται οι δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού για το πρώτο μέρος του πειράματος. Διακρίνεται μια σταδιακή και πολύ μικρή αύξηση των ενώσεων βινυλίου από 0,07 τον πρώτο μήνα σε 0,09 τον τέταρτο μήνα, ενώ οι τιμές των διπλών δεσμών παραμένουν σταθερές στα 0,10 καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου.

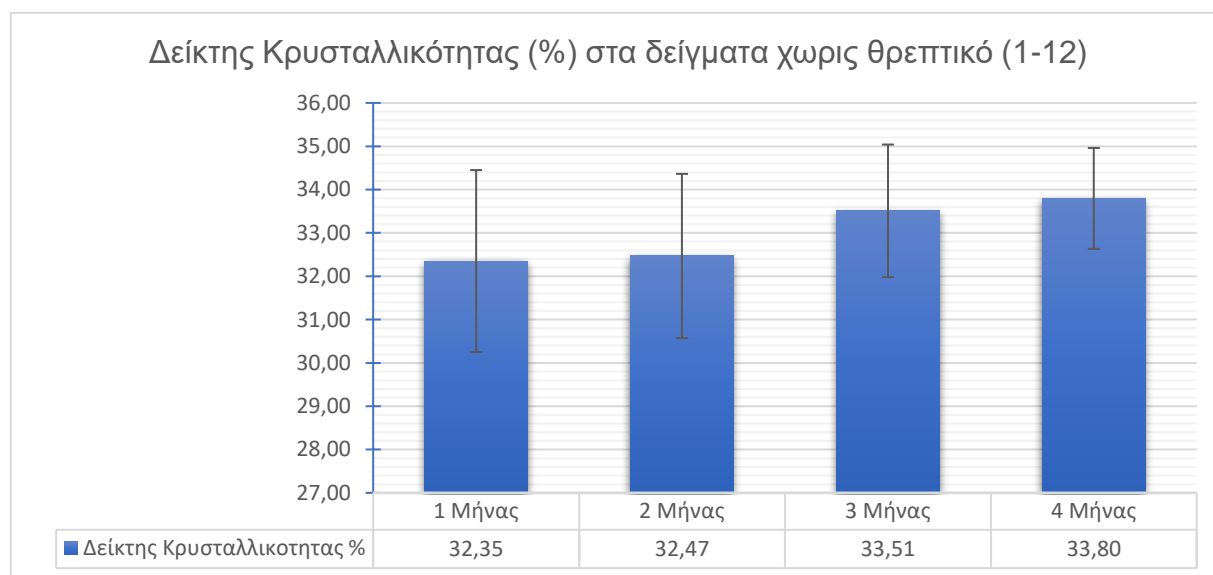


Διάγραμμα 19: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού στα δείγματα με θρεπτικό (13-24)

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος παρουσιάζεται σχεδόν το ίδιο μοτίβο με αυτό του πρώτου. Πιο αναλυτικά, οι δείκτες των ενώσεων βινυλίου παρουσιάζουν μια ελαφρά αύξηση από 0,10 στις ημέρες 15 σε 0,12 την ημέρα 45, πριν μειωθούν ξανά στο 0,11 την ημέρα 60. Καθώς οι αποκλίσεις είναι πολύ μικρές μπορούμε να πούμε, πως οι τιμές διατηρούνται σχεδόν σταθερές σε σχέση με την πάροδο του χρόνου και για τα δύο μέρη του πειράματος. Αυτή η εικόνα υποδεικνύει μια δυσκολία στην αποδόμηση των συγκεκριμένων δεσμών από τις μικροβιακές κοινότητες.

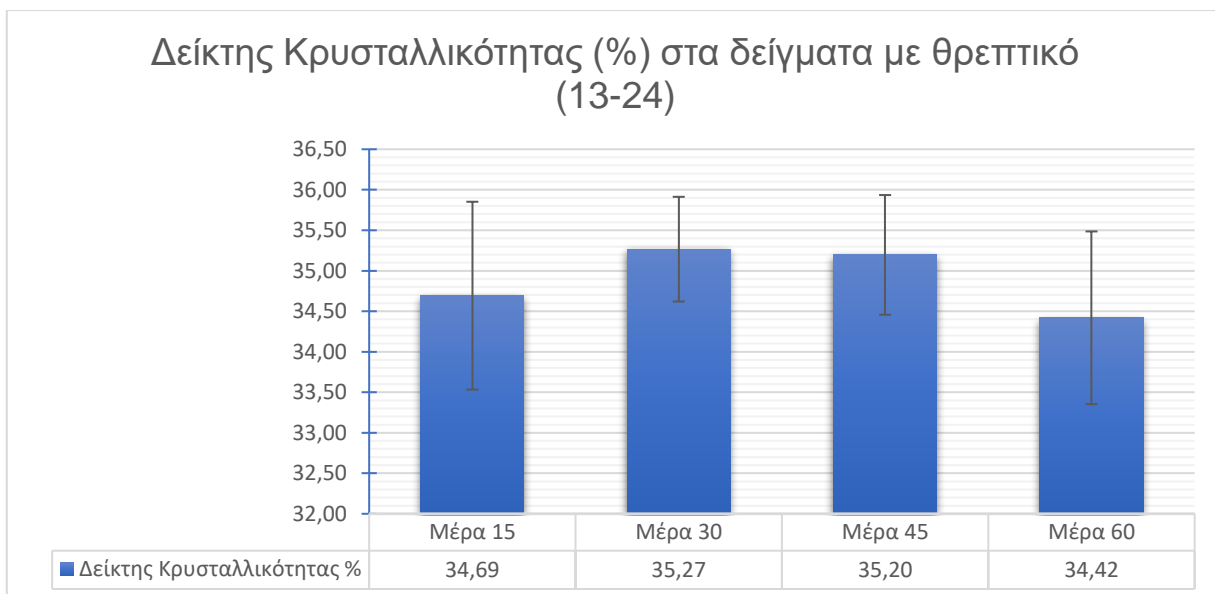
Οι δείκτες των ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού των γηρασμένων HDPE υπολογίστηκαν 0,21 και 0,14 αντίστοιχα, παρατηρώντας και εδώ την αυξητική διαφορά των δεικτών σε σύγκριση με τα δύο πειραματικά μέρη.

4.8.3 Κρυσταλλικότητα



Διάγραμμα 20: Δείκτες Κρυσταλλικότητας στα δείγματα χωρίς θρεπτικό (1-12)

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την εξέλιξη του δείκτη κρυσταλλικότητας (%) στα δείγματα (1-12) του πρώτου μέρους του πειράματος. Όπως διακρίνεται, οι τιμές ξεκινούν από 32,35% τον πρώτο μήνα και αυξάνονται ελαφρώς σε 32,47% τον δεύτερο μήνα, ενώ παρατηρείται μια πιο εμφανής αύξηση στους επόμενους μήνες, φτάνοντας στο 33,51% τον τρίτο μήνα και στο 33,80% τον τέταρτο μήνα. Η αύξηση του ποσοστού της κρυσταλλικότητας μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τις άμορφες περιοχές, δηλαδή τις αποδομημένες περιοχές του υλικού, οδηγώντας σε μείωση τους και συνεπώς σε υψηλότερη αναλογία κρυσταλλικών δομών. Ωστόσο στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση της κρυσταλλικότητας και μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν απαιτείται μεταβολή.



Διάγραμμα 21: Δείκτες Κρυσταλλικότητας στα δείγματα με θρεπτικό (13-24)

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος η κρυσταλλικότητα παρουσιάζει ένα μοτίβο αυξομειώσεων με μικρές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (13-24) σε σύγκριση με την μικρή εκθετική πορεία του πρώτου μέρους. Συγκεκριμένα, οι τιμές κρυσταλλικότητας παρουσιάζουν μικρές διακυμάνσεις, ξεκινώντας από 34,69% την ημέρα 15, αυξάνονται ελαφρώς σε 35,27% την ημέρα 30 και παραμένουν σχεδόν σταθερές στους 35,20% την ημέρα 45. Ωστόσο, την ημέρα 60, η κρυσταλλικότητα μειώνεται ελαφρώς στο 34,42%. Ωστόσο δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση της κρυσταλλικότητας και μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν παραιτείται μεταβολή.

Η κρυσταλλικότητα των γηρασμένων μικροπλαστικών υπολογίστηκε 33,78%, ποσοστό που υποδεικνύει ξανά, ότι δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση της κρυσταλλικότητας και στα δύο πειραματικά μέρη και μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν παραιτείται μεταβολή.

Συμπεράσματα

Τα μικροπλαστικά αποτελούν μία από τις σοβαρότερες περιβαλλοντικές προκλήσεις της εποχής μας, καθώς ανιχνεύονται σε υδάτινα οικοσυστήματα, εδάφη και στην τροφική αλυσίδα, επηρεάζοντας τόσο τη θαλάσσια ζωή όσο και την ανθρώπινη υγεία. Παρά τις αυξανόμενες ανησυχίες, η κατανόηση της βιοαποδόμησης τους από μικροοργανισμούς παραμένει περιορισμένη. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τη βιοαποδόμηση γερασμένων μικροπλαστικών πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας από θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες του κόλπου της Σούδας, με ή χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί κατόρθωσαν να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να ευδοκιμήσουν σε περιβάλλον όπου τα μικροσφαιρίδια HDPE αποτελούσαν τη μοναδική διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Ωστόσο, η απώλεια βάρους των HDPE

pellets ήταν ελάχιστη, γεγονός που καταδεικνύει την εξαιρετικά αργή διαδικασία αποδόμησης αυτού του πολυμερούς. Η προσθήκη γλυκόζης ως εναλλακτική πηγή άνθρακα φάνηκε να αυξάνει τη μικροβιακή δραστηριότητα, χωρίς όμως να επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση του HDPE. Η φασματοσκοπική ανάλυση (ATR-FTIR) έδειξε ότι η χημική δομή του πολυμερούς παρέμεινε σε μεγάλο βαθμό ανέπαφη, με περιορισμένες ενδείξεις φωτοοξείδωσης ή μικροβιακής αποδόμησης. Η αύξηση της συγκέντρωσης διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στα δείγματα υποδηλώνει ότι το μικροβιακό βιοφίλμ ενδέχεται να συμβάλλει στην αποδόμηση, αλλά με πολύ χαμηλό ρυθμό. Επιπλέον, η κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών μεταβλήθηκε με την πάροδο του χρόνου, με τις συνθήκες του πειράματος να επηρεάζουν τη συσσωμάτωση των σωματιδίων για το πρώτο μέρος του πειράματος και τον κατακερματισμό των σωματιδίων για το δεύτερο μέρος του πειράματος, οδηγώντας στο σχηματισμό νανοπλαστικών.

Συνολικά, η μελέτη επιβεβαιώνει ότι η βιοαποδόμηση του HDPE από θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες είναι δυνατή αλλά εξαιρετικά περιορισμένη στο φυσικό περιβάλλον. Η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις παραμέτρους που μπορούν να επιταχύνουν τη διαδικασία είναι επιτακτική, ειδικά όσον αφορά την εφαρμογή βιοτεχνολογικών λύσεων για την αντιμετώπιση της μικροπλαστικής ρύπανσης.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η βιοαποδόμηση των πλαστικών αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από πλήθος παραμέτρων. Μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην απομόνωση και χαρακτηρισμό μικροοργανισμών με εξειδικευμένες ικανότητες αποδόμησης πολυαιθυλενίου, καθώς και στην ανάλυση ενζύμων ή γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία. Παράλληλα, η αξιοποίηση γενετικά τροποποιημένων μικροβίων ή συνθετικών μικροβιακών κοινοτήτων θα μπορούσε να προσφέρει νέα εργαλεία για την ενίσχυση της αποδόμησης. Η μελέτη των περιβαλλοντικών παραμέτρων (όπως το pH, η θερμοκρασία, η αλατότητα και η παρουσία φωτός) κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα η μικροβιακή συμπεριφορά σε ρεαλιστικές συνθήκες. Απαραίτητες είναι και μακροχρόνιες μελέτες σε πραγματικές συνθήκες πεδίου ή πειραματικά θαλάσσια οικοσυστήματα, ώστε να εκτιμηθεί ρεαλιστικά η δυναμική της διαδικασίας. Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στην ανάλυση των προϊόντων αποδόμησης, τόσο για την κατανόηση των μηχανισμών όσο και για την αξιολόγηση της τοξικότητάς τους στη θαλάσσια ζωή και τον άνθρωπο. Τέλος, πέρα από την αναγκαιότητα περαιτέρω επιστημονικής έρευνας γύρω από τη βιοαποδόμηση και τις επιπτώσεις των μικροπλαστικών, είναι εξίσου σημαντικό να αναγνωρίσουμε την προσωπική ευθύνη που φέρει ο καθένας μας. Η μείωση της χρήσης πλαστικών στην καθημερινότητά μας, η ενσυνείδητη επιλογή εναλλακτικών υλικών και η ενεργή συμμετοχή στην ανακύκλωση αποτελούν βασικά βήματα για την αποτροπή της περαιτέρω επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Η αντιμετώπιση της πλαστικής ρύπανσης δεν είναι αποκλειστικά θέμα τεχνολογίας ή επιστήμης, αλλά και στάσης ζωής.

Βιβλιογραφία

- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>
- Albertsson, A.-C., Andersson, S. O., & Karlsson, S. (1987). The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 18(1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(87\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0141-3910(87)90084-X)
- Albertsson, A.-C., Barenstedt, C., & Karlsson, S. (1994). Abiotic degradation products from enhanced environmentally degradable polyethylene. *Acta Polymerica*, 45(2), 97–103. <https://doi.org/10.1002/actp.1994.010450207>
- Al-Salem, S. M. (2019). Introduction. In *Plastics to Energy* (pp. 3–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813140-4.00001-7>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Andrady, A. L. (2015). *Plastics and Environmental Sustainability*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119009405>
- Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>
- Antunes, J. C., Frias, J. G. L., Micaelo, A. C., & Sobral, P. (2013). Resin pellets from beaches of the Portuguese coast and adsorbed persistent organic pollutants. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.06.016>
- Ashton, K., Holmes, L., & Turner, A. (2010). Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 2050–2055. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.014>
- Balasubramanian, V., Natarajan, K., Rajeshkannan, V., & Perumal, P. (2014). Enhancement of in vitro high-density polyethylene (HDPE) degradation by physical, chemical, and biological treatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(21), 12549–12562. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3191-2>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009a). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009b). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>

- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009c). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Coulter, B. (2015). *Instructions for Use CytoFLEX Flow Cytometer*. www.beckmancoulter.com
- Dennis D. Focht. (2014). *Biodegradation*. www.accessscience.com
- Derraik, J. G. B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5)
- European Parliament. (2018). *Microplásticos: causas, efectos y soluciones*. European Parliament.
- Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2012). Surface properties of beached plastic pellets. *Marine Environmental Research*, 81, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.08.010>
- Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2017). *Degradation of Various Plastics in the Environment* (pp. 71–92). https://doi.org/10.1007/698_2017_11
- Galgani, L., Engel, A., Rossi, C., Donati, A., & Loiselle, S. A. (2018). Polystyrene microplastics increase microbial release of marine Chromophoric Dissolved Organic Matter in microcosm experiments. *Scientific Reports*, 8(1), 14635. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32805-4>
- García Rellán, A., Vázquez Ares, D., Vázquez Brea, C., Francisco López, A., & Bello Bugallo, P. M. (2023). Sources, sinks and transformations of plastics in our oceans: Review, management strategies and modelling. *Science of The Total Environment*, 854, 158745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158745>
- Gu, J.-G., & Gu, J.-D. (2005). Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(1), 65–74. <https://doi.org/10.1007/s10924-004-1230-7>
- Hooda, S., Annu, & Mondal, P. (2023). Insights into the degradation of high-density polyethylene microplastics using microbial strains: Effect of process parameters, degradation kinetics and modeling. *Waste Management*, 164, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.04.002>
- Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A.-L., & Ghiglione, J.-F. (2019). Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>

- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jeyakumar, D., Chirsteen, J., & Doble, M. (2013). Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes. *Bioresource Technology*, 148, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.074>
- Kaile, N., Lindivat, M., Elio, J., Thuestad, G., Crowley, Q. G., & Hoell, I. A. (2020). Preliminary Results From Detection of Microplastics in Liquid Samples Using Flow Cytometry. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.552688>
- Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., & Knepper, T. P. (2018). *Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment* (pp. 51–67). https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_3
- Kumar, N., Ukey, P. D., Francis, V., Singh, R. P., & Sahu, S. (2022). Plastic pellets. In *Polymers for 3D Printing* (pp. 307–323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818311-3.00019-7>
- Kurtz, S. M. (2016). A Primer on UHMWPE. In *UHMWPE Biomaterials Handbook* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35401-1.00001-6>
- Lacerda, A. L. d. F., Rodrigues, L. dos S., van Seville, E., Rodrigues, F. L., Ribeiro, L., Secchi, E. R., Kessler, F., & Proietti, M. C. (2019). Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula. *Scientific Reports*, 9(1), 3977. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40311-4>
- LI, W. C., TSE, H. F., & FOK, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of The Total Environment*, 566–567, 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084>
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J.-E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Maier, R. M. (2009). Bacterial Growth. In *Environmental Microbiology* (pp. 37–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
- Menges, F. n. d. “Spectragryph-O. S. Software. .” (n.d.). <https://www.effemm2.de/spectragryph/>.
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>
- Nielsen, T. D., Hasselbalch, J., Holmberg, K., & Strippel, J. (2020). Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. *WIREs Energy and Environment*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/wene.360>
- Ostle, C., Thompson, R. C., Broughton, D., Gregory, L., Wootton, M., & Johns, D. G. (2019). The rise in ocean plastics evidenced from a 60-year time series. *Nature Communications*, 10(1), 1622. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09506-1>
- Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., Berndt, L., Weiss, M. S., Bornscheuer, U. T., & Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading Ideonella sakaiensis

MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, 10(1), 1717.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>

Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C. Q., Yu, H., & Ge, C. (2020). Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment*, 698, 134254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134254>

Plastics-the Facts. (2022). *Plastics-the Facts 2022 OCTOBER 2022*.

Rani, M. (2021). *Plastic Degradation and its Environmental Implications* (pp. 290–324).
<https://doi.org/10.21741/9781644901335-12>

Romera-Castillo, C., Pinto, M., Langer, T. M., Álvarez-Salgado, X. A., & Herndl, G. J. (2018). Dissolved organic carbon leaching from plastics stimulates microbial activity in the ocean. *Nature Communications*, 9(1), 1430. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03798-5>

Ronca, S. (2017). Polyethylene. In *Brydson's Plastics Materials* (pp. 247–278). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00010-4>

Ruiz, I., Ana J., A., Basurko, O. C., & Rubio, A. (2022). Modelling the distribution of fishing-related floating marine litter within the Bay of Biscay and its marine protected areas. *Environmental Pollution*, 292, 118216. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118216>

Ryan, P. G., Moore, C. J., van Franeker, J. A., & Moloney, C. L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1999–2012. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0207>

Sangale, M. K. (2012). A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 03(10). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000164>

Sangeetha Devi, R., Ramya, R., Kannan, K., Robert Antony, A., & Rajesh Kannan, V. (2019). Investigation of biodegradation potentials of high density polyethylene degrading marine bacteria isolated from the coastal regions of Tamil Nadu, India. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 549–560.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.001>

Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., & Palanisami, T. (2021). Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>

Sherrington. (2016). *Plastics in the Marine Environment*. C. Sherrington.

Spear, L. B., Ainley, D. G., & Ribic, C. A. (1995). Incidence of plastic in seabirds from the tropical pacific, 1984–1991: Relation with distribution of species, sex, age, season, year and body weight. *Marine Environmental Research*, 40(2), 123–146. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00140-K](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)00140-K)

Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P. S., & Venkatesan, R. (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.011>

Syranidou, E., Karkanorachaki, K., Amorotti, F., Repouskou, E., Kroll, K., Kolvenbach, B., Corvini, P. F.-X., Fava, F., & Kalogerakis, N. (2017). Development of tailored indigenous marine consortia for the

degradation of naturally weathered polyethylene films. *PLOS ONE*, 12(8), e0183984.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183984>

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838–838.

<https://doi.org/10.1126/science.1094559>

Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

Vassilenko, E., & Baldwin, S. A. (2014). Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific Coast of Southern British Columbia, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*, 117, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.002>

Vimala, P. P., & Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus Subtilis*. *Procedia Technology*, 24, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.031>

Weinstein, J. E., Crocker, B. K., & Gray, A. D. (2016). From macroplastic to microplastic: Degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1632–1640. <https://doi.org/10.1002/etc.3432>

Wootton, N., Nursey-Bray, M., Reis-Santos, P., & Gillanders, B. M. (2022). Perceptions of plastic pollution in a prominent fishery: Building strategies to inform management. *Marine Policy*, 135, 104846. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2021.104846>

Zerbi, G., Gallino, G., Del Fanti, N., & Baini, L. (1989). Structural depth profiling in polyethylene films by multiple internal reflection infra-red spectroscopy. *Polymer*, 30(12), 2324–2327.

[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(89\)90269-3](https://doi.org/10.1016/0032-3861(89)90269-3)

Κουή, Μ. Ν. Α. Π. Θ. and Ε. Χ. (2015). Μη Καταστρεπτικές και Φασματοσκοπικές Μέθοδοι Εξέτασης των Υλικών Θεωρία, Τεχνικές και Εφαρμογές. www.kallipos.gr

Κουτσουμπίδης, Γ. Ε. (2018). ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ Ανάλυση Φασματοσκοπίας και Φασματομετρίας FTIR και Εφαρμογή σε Μέτρηση Συγκέντρωσης Αέριων Εκπομπών σε Καυσάεργα από Scrubbers ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ.

Σοφία Κυρίτση. (2021). ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ LDPE ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΟΦΙΑΣ ΚΥΡΙΤΣΗ.

<https://www.analytik-jena.com/>. (n.d.).

<https://www.analytik-jena.com/products/chemical-analysis/toc-tnb-analysis/toc-tnb/multi-n-c-series/>. (n.d.).

<https://www.istockphoto.com/search/2/image-film?phrase=HDPE>. (n.d.).

<https://www.istockphoto.com/search/2/image-film?phrase=plastics%20in%20sea>. (n.d.).

<https://www.ssi.shimadzu.com/>. (n.d.).