

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<< ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ >>

ΤΣΙΩΤΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Καλογεράκης Νικόλαος, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Βενιέρη Δανάη Επίκουρη Καθηγήτρια
Dr. Συρανίδου Ευδοκία**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



**ΧΑΝΙΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2017**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της παρούσας εργασίας και τη συνεργασία που ακολούθησε.

Επίσης, ευχαριστώ τη κ. Βενιέρη , μέλος της τριμελούς επιτροπής ,για το χρόνο που αφιέρωσε για την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ένα ειλικρίνες ευχαριστώ, χρωστάω στη Dr. Ευδοκία Συρανίδου για την άψογη συνεργασία, τη καθοδήγηση και την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Κυρίως θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Καρκανοραχάκη που ήταν συνεχώς στο πλευρό μου κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου κι έδειξε απεριόριστη υπομονή.

Ευχαριστώ, ακόμα, το προσωπικό και τους φοιτητές του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, την Πετρούλα Σερίδου και τη Martina Franchini για τη βοήθειά τους και την υποστήριξή τους, την Αργυρώ Λακιστάκη και τη Γεωργία Χαραλάμπους για την ανοχή και την αντοχή τους, αλλά και την παρέα, τις μέρες που μοιραζόμασταν στο εργαστήριο.

Καταληκτικά θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους καθώς και τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεγάλες ποσότητες πλαστικών καταλήγουν κάθε χρόνο στο υδάτινο περιβάλλον με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται, έχοντας αρνητικές συνέπειες για τη θαλάσσια ζωή. Από το 1970 έχουν παρατηρηθεί μεγάλα κομμάτια πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον ενώ ο τρόπος μεταφοράς και η τύχη των πλαστικών κομματιών, απασχολεί έντονα την ερευνητική κοινότητα τη τελευταία δεκαετία. Τα πλαστικά εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον σε ένα ευρύ φάσμα μεγεθών. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πλαστικά δεν απομακρύνονται ποτέ πλήρως, αλλά θρυματίζονται σε μικροπλαστικά εξαιτίας της έκθεσης σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, ακραίες θερμοκρασίες, μηχανική καταπόνηση από τα κύμματα τον αέρα και τήν άμμο καθώς και βιολογική δράση. Ανάμεσα στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα και άφθονα πολυμερή είναι πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) το οποίο είναι εξαιρετικά υδρόφοβο και υψηλού μοριακού βάρους κάτι που το καθιστά δύσκολα αποδομήσιμο εκτός κι αν υποστεί γήρανση. Ο πραγματικός χρόνος που χρειάζεται το πολυαιθυλένιο να αποδομηθεί εντελώς στο θαλάσσιο περιβάλλον παραμένει άγνωστος.

Στην παρούσα μελέτη, μετά πεντάμηνη έκθεση σε UV-A ακτινοβολία και άσκηση ήπιας μηχανικής καταπόνησης δημιουργήθηκαν δευτερογενή μικροπλαστικά από φιλμ υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων στα δευτερογενή μικροπλαστικά σε προσομειωμένο θαλάσσιο περιβάλλον όπου τα μικροπλαστικά είναι η μοναδική πηγή άνθρακα. Το εύρος διαμέτρου των μικροπλαστικών κυμαινόταν από 2mm έως 250μm. . Στη συνέχεια τα μικροπλαστικά χωρίστηκαν ισόποσα σε κωνικές φυάλες κι αυτές εμβολιάστηκαν με μικροβιακές κοινότητες από τον κόλπο του Άγιο Ονούφριου που είχε ήδη αναπτυχθεί παρουσία πολυαιθυλενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και της Σούδας Χανίων. Μετρήσεις βάρους των μικροπλαστικών, της μικροβιακής ανάπτυξης και δραστηριότητας του μεγέθους των σωματιδίων στο διηθούμενο υγρό κι της χημικής σύστασης της επιφάνειας των μικροπλαστικών πραγματοποιούνταν κάθε μήνα για την παρακολούθηση και εκτίμηση της επίδρασης των αυτόχθονων θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων σε δευτερογενή πλαστικά στο θαλάσσιο περιβάλλον.

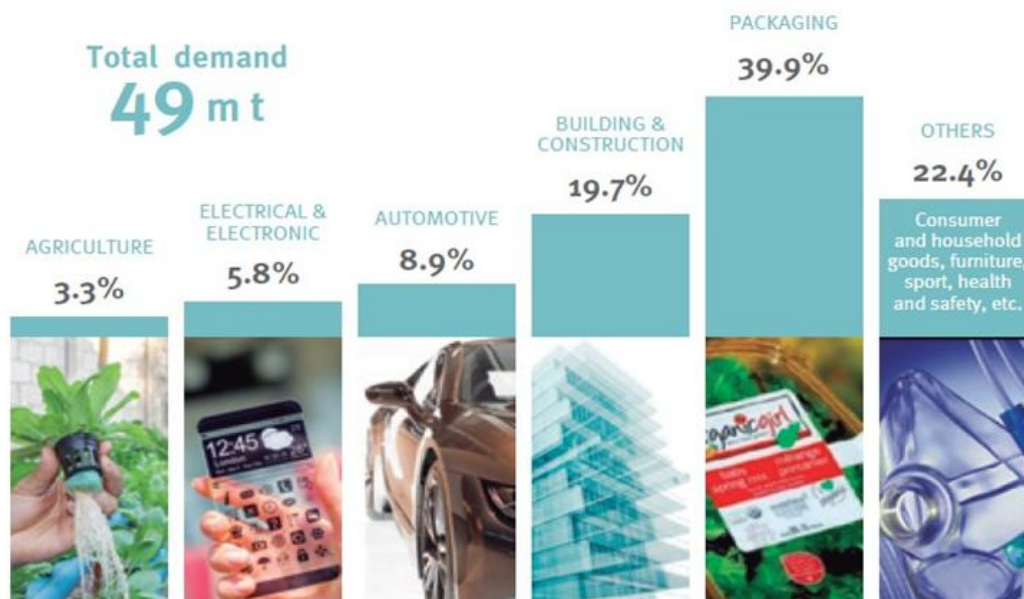
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Τα πλαστικά απορρίμματα στο υδάτινο οικοσύστημα.....	1
1.2 Μικροπλαστικά.....	4
1.3 Επίδραση μικροπλαστικών στο περιβάλλον.....	7
1.4 Κατηγοριοποίηση Μικροπλαστικών.....	10
1.5 Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE).....	11
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
2.1 Υλικά.....	14
2.2 Μέθοδοι.....	15
2.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων.....	16
2.2.2 Ανάπτυξη Μικροοργανισμών.....	16
2.2.3 Σχεδιασμός πειράματος.....	18
2.2.4 Μετρήσεις βάρους.....	19
2.2.5 Εκτίμηση του πληθυσμού των μικροβιακών κοινοτήτων.....	20
2.2.6 Μετρήσεις εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών.....	21
2.2.6.1 Μετρήσεις ολικών πρωτεϊνών.....	21
2.2.6.2 Μετρήσεις ολικών υδατανθράκων	22
2.2.7 Μέτρηση υψηλής ευαισθησίας της κατανομής μεγέθους μικρο και νάνο πλαστικών.....	23
2.2.8 Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier.....	23
2.2.9 Ανάλυση Δεδομένων.....	27
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
3.1 Βακτηριακές κοινότητες.....	28
3.2 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών.....	29
3.2.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	29
3.2.2 Προσδιορισμός υδατανθράκων.....	31
3.3 Κατανομή μεγέθους μικρο και νάνο πλαστικών στο διηθούμενο υγρό.....	33
3.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier.....	38
3.5 Προσδιορισμός της μείωσης βάρους πολυαιθυλενίου.....	42
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	44
5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	46
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τα πλαστικά απορρίμματα στο υδάτινο οικοσύστημα

Η παραγωγή και χρησιμοποίηση πολυμερών έχει αλλάξει σημαντικά την ποιότητα ζωής του ανθρώπου ενώ υπάρχουν αναρίθμητα προϊόντα και υλικά με μεγάλο φάσμα εφαρμογών. Τα πλεονεκτήματα των πλαστικών, συμπεριλαμβανομένης της ευελιξίας, της αντοχής και της ανθεκτικότητάς τους, οδήγησαν στην ευρύτατη χρήση τους συμβάλλοντας στη δημιουργία του όρου 'Εποχή των πλαστικών'. Η παραγωγή πλαστικών αυξήθηκε δραματικά παγκοσμίως κατά τη διάρκεια των τελευταίων 60 ετών, από 0,5 εκατομμύρια τόνους ανά έτος το 1960 σε 269 εκατομμύρια τόνους το 2015. Η Κίνα είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός πλαστικών υλικών* (αφορά θερμοπλαστικά και πολυουρεθάνες), ακολουθούμενη από την Ευρώπη και τη NAFTA (North American Free Trade Agreement). Η Ευρώπη κατέχει τη δεύτερη θέση σε παγκόσμιο επίπεδο. Γίνεται χρήση του 20% της συνολικής παραγωγής ενώ η απαίτηση σε πλαστικά ανέρχεται στα 49 εκατομμύρια τόνους όπου το 70% συγκεντρώνεται σε έξι Ευρωπαϊκές χώρες (Γερμανία, Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία, Ολλανδία). Η αύξηση της παραγόμενης ποσότητας πλαστικών ανταποκρίνεται στις αυξημένες απαιτήσεις για αυτά σε πολλούς τομείς δραστηριοτήτων όπως η συσκευασία προϊόντων, οι κατασκευές, αλλά και ο πρωτογενής τομέας (Plastics Europe, 2016) όπως φαίνεται και από την εικόνα 1:

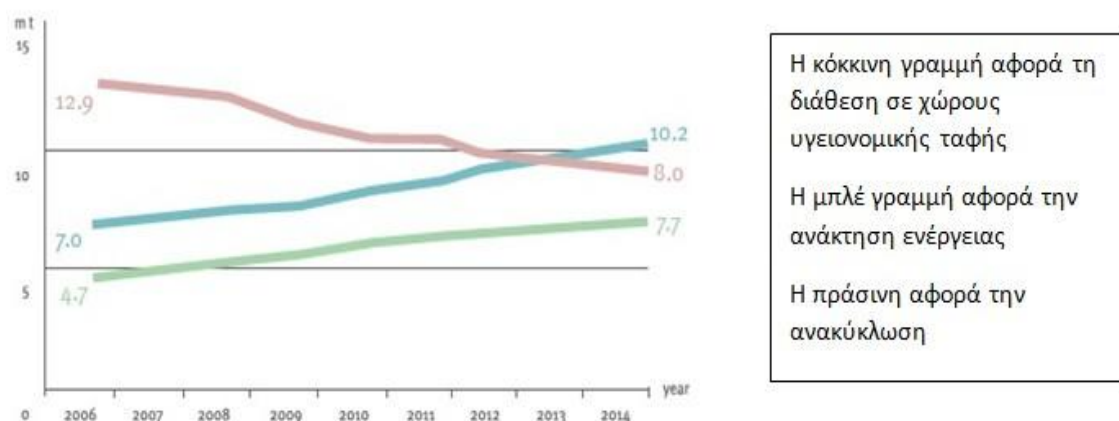


Εικόνα 1: Ποσοστιαίες απαιτήσεις πλαστικών ανά τομέα δραστηριότητας στην Ευρώπη (Plastics Europe, 2016).

Η Ευρωπαϊκή βιομηχανία πλαστικών απασχολεί πάνω από 1,5 εκατομμύρια ανθρώπους, παρέχοντας περίπου 16,5 δισεκατομμύρια ευρώ στη δημόσια οικονομία. Το 2014, 25,8 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών αποβλήτων μετά την κατανάλωση κατέληξαν σε επίσημες ροές αποβλήτων. Το 69,2% ανακτήθηκε μέσω των διαδικασιών ανακύκλωσης και ανάκτησης ενέργειας, ενώ το 30,8% εξακολουθεί να βρίσκεται σε χώρους υγειονομικής

ταφής. Εντός των διαφόρων πλαστικών εφαρμογών, η πλαστική συσκευασία έφτασε το υψηλότερο ποσοστό ανακύκλωσης με 39,5% και αντιπροσώπευε περισσότερο από το 80% των συνολικών ανακυκλωμένων ποσοτήτων (Plastic Europe, 2014 /2015).

2006-2014 waste treatment evolution:



Εικόνα 2: Εξέλιξη επεξεργασίας πλαστικών αποβλήτων το 2006-2014 (Plastics Europe, 2016).

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, τα ποτάμια του πλανήτη και πλήττουν την άγρια ζωή, την αλιεία και τον τουρισμό. Κατά προσέγγιση το 80% των πλαστικών απορριμμάτων που καταλήγουν στα θαλάσσια και παράκτια οικοσυστήματα προέρχονται από απευθείας απόρριψη και διαρροές από τη στεριά (Andrady, 2011; Allsopp et al, 2009). Με τον μισό παγκόσμιο πληθυσμό να κατοικεί εντός ακτίνας 50 μιλίων από την ακτή, τα πλαστικά έχουν μεγάλες πιθανότητες να εισέλθουν στη θάλασσα μέσω των ποταμών και συστημάτων διαχείρισης αποβλήτων (Moore, C.J., 2008; Browne et al., 2007).

Επαγγελματικές δραστηριότητες που σχετίζονται με πλαστικά, όπως η εξόρυξη πετρελαίου, η αλιεία, αλλά και οι υδατοκαλλιέργειες είναι βασικές πηγές πλαστικών αποβλήτων. Για παράδειγμα τα υλικά που χάνονται από την επαγγελματική και ψυχαγωγική αλιεία και τα υπολείμματα που απορρίπτονται από εμπορικά, κρουαζιερόπλοια ή ιδιωτικά πλοία καθώς και απώλειες πλαστικού εξοπλισμού, αλλά και σκόπιμη απόρριψή του, μετά το πέρας της χρησιμότητάς του, έχουν σαν αποτέλεσμα τη συγκέντρωσή του σε περιοχές όπου καταλήγουν θαλάσσια ρεύματα (Sesini, 2011)

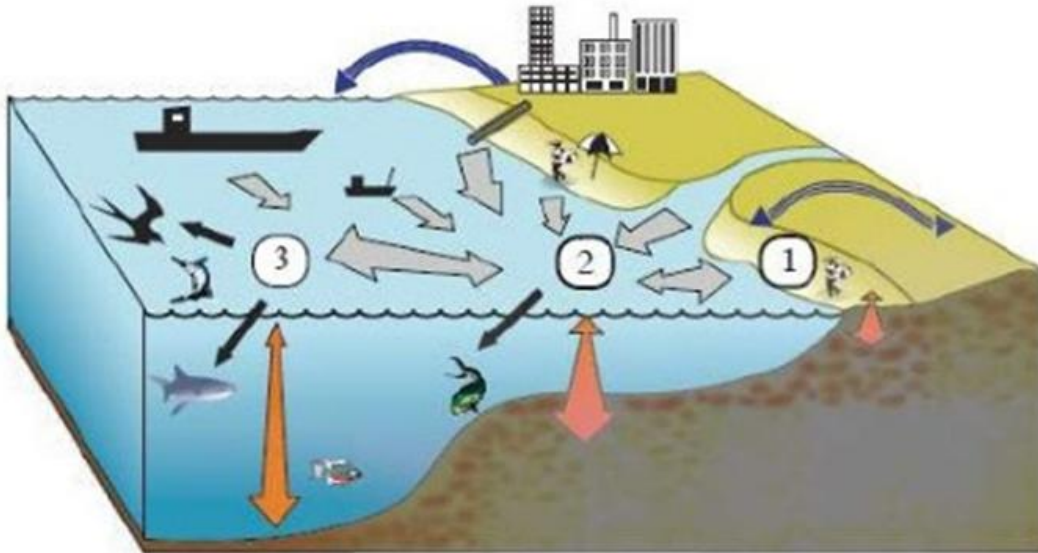
Επίσης ο τουρισμός και οι δραστηριότητες αναψυχής ευθύνονται για την εναπόθεση μιας σειράς από πλαστικά σε παραλίες και ακτές, αν και αξίζει να αναφερθεί πως τα θαλάσσια υπολείμματα που παρατηρούνται στις παραλίες προκύπτουν και από την μεταφορά τους μέσω των ωκεάνιων ρευμάτων. (Rocha-Santos and Duarte, 2015) Η υψηλότερη συγκέντρωση, 258.408 αντικείμενα ανά τετραγωνικό μέτρο, βρέθηκε στο Fan Lau Tung Wan στο Hong Kong (Fok and Cheung, 2015). Στο συγκεκριμένο μέρος πάνω από το 90% των δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατατάσσονταν στα μικροπλαστικά (<5 mm), με το 92% των μικροπλαστικών να είναι διογκωμένο πολυστυρένιο. Η υψηλή συγκέντρωση διογκωμένου

πολυστυρενίου στις παραλίες του Hong Kong μπορεί να αποδοθεί στη μεγάλη πληθυσμιακή πυκνότητα και στον τρόπο ζωής των κατοίκων του Hong Kong, για παράδειγμα η χρήση μονωμένων συσκευασιών για φαγητό προς διανομή ή μεταφορά (Song et al., 2015).

Άλλη αξιοσημείωτη πηγή πλαστικών υπολειμμάτων είναι οι παραγωγοί πλαστικών προϊόντων που χρησιμοποιούν κόκκους και μικρά σφαιρίδια ρητίνης, γνωστά και ως pellets σε πρώτη ύλη (Ivar do Sul et al., 2009). Αυτές οι πρώτες ύλες μπορούν να εισέλθουν στα υδάτινα οικοσυστήματα από τυχαία διαρροή κατά τη μεταφορά υλικών συσκευασίας και άμεσης εκροής από τα εργοστάσια επεξεργασίας, τόσο στη ξηρά όσο και στη θάλασσα. Έχουν εντοπιστεί σε υδάτινα συστήματα παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένου ακόμα και στα μεσοωκεάνια νησιά χωρίς βιομηχανία παραγωγής πλαστικών. Το 1991 υπό την αιγίδα της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ πολλοί παραγωγοί πλαστικών προθυμοποιήθηκαν εθελοντικά να αποτρέψουν τη διαφυγή πλαστικών στη θάλασσα ή και να συλλέξουν τα διεσπαρμένα σωματίδια, μια κίνηση η οποία εξηγεί το γεγονός ότι μειώθηκε σημαντικά η συγκέντρωση των σωματιδίων ρητίνης στον Βόρειο Ατλαντικό μεταξύ του 1986 και του 2008. Πρόσθετα τα μικροπλαστικά που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά, τους ψεκασμούς και οι ίνες ρούχων μπορούν να εισέλθουν στις υδάτινες οδούς μέσω των οικιακών ή βιομηχανικών συστημάτων αποχέτευσης. Παρόλο που οι μονάδες διαχείρισης υδάτινων αποβλήτων μπορούν να παγιδεύσουν μικροπλαστικά μια μεγάλη ποσότητα μικροπλαστικών διαφεύγει μέσω του συστήματος φιλτραρίσματος των μονάδων αυτών (Browne et al., 2007).

Σχεδόν 270.000 τόνοι μεγάλου μεγέθους πλαστικών υπολειμμάτων βρίσκονται στους ωκεανούς σύμφωνα με τα αποτελέσματα 24 αποστολών (2007-2013) στην Αυστραλία, στον κόλπο της Βεγγάλης και στη Μεσόγειο Θάλασσα, (Eriksen et al., 2014). Με βάση το συνολικό αριθμό των πλαστικών σωματιδίων και το βάρος τους, οι ερευνητές χρησιμοποιώντας ένα ωκεανογραφικό μοντέλο διασκορπισμού των κυμαινόμενων θραυσμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τους τη κάθετη ανάμειξη με αιολική κίνηση, υπολόγισαν τουλάχιστον 5,25 τρισεκατομμύρια μικροπλαστικά βάρους 268.940 τόνων. (Eriksen et al., 2014)

Σε μία έρευνα έγινε ποσοτικοποίηση των επιπλέοντων πλαστικών στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπου μέσος όρος πλαστικών μετρήθηκε στα 250.000 αντικείμενα / Km² και συχνότητα εμφάνισης σε 100% των δειγματοληπτικών τοποθεσιών (Cózar et al., 2015). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν συγκρίσιμα με τις ζώνες συσσώρευσης των υποτροπικών ωκεανών, παρόλο που τα πλαστικά υπολείμματα στα μεσογειακά ύδατα κυριαρχούσαν σε θραύσματα μεγέθους χιλιοστών και με μεγαλύτερο ποσοστό μεγάλων πλαστικών αντικειμένων, πιθανώς αντανακλώντας τη στενότερη σύνδεση με πηγές ρύπανσης. Η συσσώρευση πλωτών πλαστικών στη Μεσόγειο Θάλασσα (μεταξύ 1.000 και 3.000 τόνων) πιθανότατα σχετίζεται με την υψηλή πίεση των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και τα ιδιόμορφα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά αυτής της ημι-κλεισμένης λεκάνης, όπου η εκροή πραγματοποιείται κυρίως μέσω στρώματος βαθέων υδάτων. Δεδομένου του βιολογικού πλούτου και της συγκέντρωσης οικονομικών δραστηριοτήτων στη Μεσόγειο, οι επιπτώσεις της πλαστικής ρύπανσης στη θαλάσσια και ανθρώπινη ζωή αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ανησυχητικές (Cózar et al., 2015 ;Giacomo, Gorbi, Regoli, 2017).



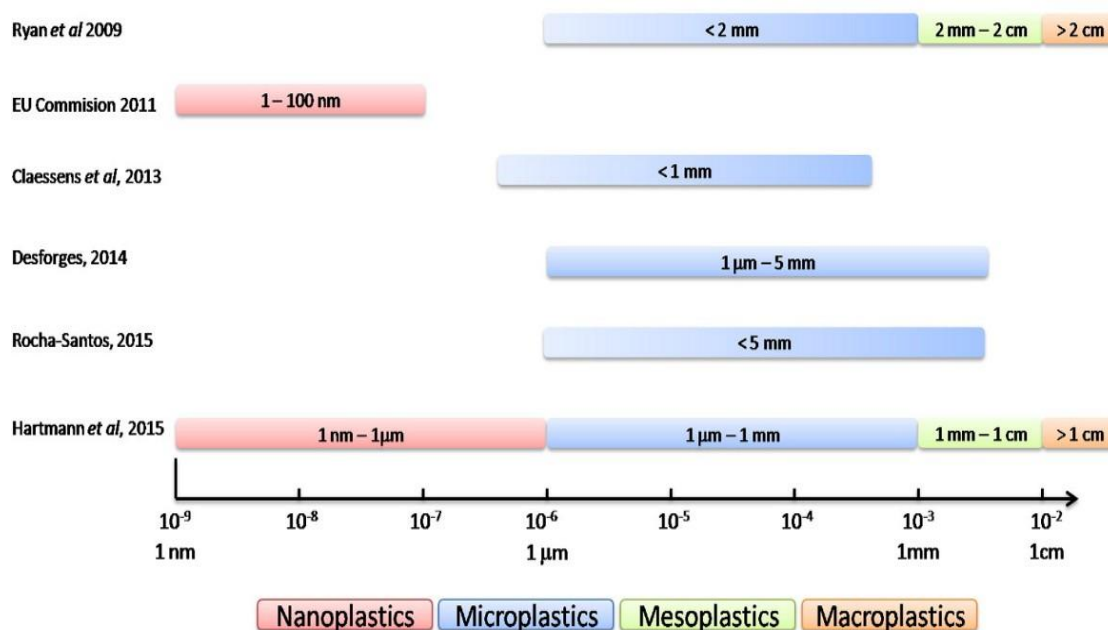
Εικόνα 3: Κύριες πηγές και κίνηση πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Ryan et al. 2009).
 Τα περισσότερα πλαστικά συσσωρεύονται στις παραλίες [1], στα ρηχά νερά [2], και στον ωκεανό [3]. Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τη μεταφορά από τον άνεμο, τα γκρι βέλη τη μεταφορά στο νερό, τα πορτοκαλί βέλη παρουσιάζουν τη κατακόρυφη μετακίνηση στη στήλη νερού καθώς και την εναπόθεση στα ιζήματα ενώ τα μαύρα βέλη παρουσιάζουν τη κατάποση από τους θαλάσσιους οργανισμούς.

1.2. Μικροπλαστικά

Τα πιο κοινά πολυμερή είναι πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροπυλένιο (PP), πολυστυρόλιο (PS), πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), πολυαμίδιο (PA), τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), πολυβινυλική αλκοόλη (PVA). Αφού τα πλαστικά απελευθερωθούν στον ωκεανό, η περιβαλλοντική τους τύχη εξαρτάται κυρίως από την πυκνότητα του πολυμερούς, η οποία επηρεάζει την πλευστότητα, τη θέση στη στήλη ύδατος και την επακόλουθη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με τους μικροοργανισμούς (Wright et al., 2013b). Τα πολυμερή πυκνότερα από το θαλασσινό νερό (όπως το PVC, PS, PET) βυθίζονται, ενώ αυτά με χαμηλότερη πυκνότητα (π.χ. PE και PP, LDPE) τείνουν να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού. Διαδικασίες όπως προσρόφηση ρύπων και ο αποικισμός των οργανισμών στην πλαστική επιφάνεια αυξάνουν το βάρος των σωματιδίων, επιταχύνοντας έτσι τη βύθιση τους στο πυθμένα (Andrady, 2011; Bergmann et al., 2015). Παρ' αυτά, η πυκνότητα των μεμονωμένων πλαστικών αντικειμένων μπορεί να τροποποιηθεί στο θαλάσσιο περιβάλλον, για παράδειγμα, χαμηλής πυκνότητας πλαστικά μπορούν να βρεθούν στο βυθό της θάλασσας γιατί η αποδόμηση, η γήρανση και η έκπλυση πρόσθετων στοιχείων μπορούν να αλλάξουν την πυκνότητα των αντικειμένων και την κατανομή τους κατά μήκος της επιφάνειας νερού.

Τα μικρά κομμάτια πλαστικών αποκαλούνται **μικροπλαστικά**, και αναδεικνύονται σε ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που επηρεάζουν τα υδατικά οικοσυστήματα. Τα μικροπλαστικά κατηγοριοποιούνται βάσει μεγέθους, όμως υπάρχει ασυμφωνία στη βιβλιογραφία σχετικά με το ανώτατο μέγεθος και το διαχωρισμό των κλάσεων μεγέθους. Ο ορισμός τους συνεχώς εξελίσσεται καθώς αυξάνεται η ανησυχία και διερευνώνται περισσότερο οι επιπτώσεις αυτών στο περιβάλλον. Η αρχική ταξινόμηση βασίστηκε στους ορισμούς που χρησιμοποιούνται για μη πολυμερή υλικά, υποδηλώνοντας έτσι ότι ένα πλαστικό σωματίδιο λέγεται ότι είναι μικροπλαστικό όταν έχει μέγεθος μικρότερο από 5mm και νανοπλαστικό, αν έχει δύο διαστάσεις του μικρότερες ή ίσες με 100 nm (Rocha-Santos and Duarte, 2015). Άλλες πιο πρόσφατες έρευνες ορίζουν ως μικροπλαστικό το σωματίδιο μικρότερο του 1mm και νανοπλαστικό το σωματίδιο που έχει τουλάχιστον μία διάστασή του μικρότερη από 1μm (Andrady, 2017). Στη παρούσα διπλωματική εργασία στηριζόμενοι στους P. Ryan και C. Moore ορίστηκε ως μικροπλαστικό το σωματίδιο με εύρος μεγέθους 2mm-1μm. .

Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ο χαρακτηρισμός των πλαστικών σωματιδίων βάση μεγέθους όπως έχουν οριστεί από διαφορετικούς συγγραφείς (Rodriguez-Seijo et al., 2017)



Εικόνα 4: Χαρακτηρισμός πλαστικών σωματιδίων, βασισμένος στο μέγεθος των πλαστικών, όπως προτείνεται από διαφορετικούς συγγραφείς(Rocha-Santos and Duarte, 2015; Ryan et al., 2009; Steensgaard et al., 2017; EUCommision 2011, Claessens et al., 2014).

Αν και τα περισσότερα από τα πλαστικά υλικά είναι ανθεκτικά και δεν βιοαποδομούνται εύκολα, υπό την επίδραση των ηλιακών ακτινοβολιών UV, της υψηλής θερμοκρασίας, των κυμάτων και της τριβής του αέρα, οδηγούνται σε γήρανση και διασπώνται σε μικρότερα κομμάτια (Gardette et al., 2013; Singh and Sharma, 2008).

Οι παράγοντες που επιδρούν στη γήρανση είναι οι εξής:

- Ηλιακή ακτινοβολία
- Θερμοκρασία
- Υγρασία
- Μηχανικές καταπονήσεις (αέρας, κύματα, άμμος)

Κατά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες τα πολυμερή εμφανίζουν την τάση όχι μόνο να 'μαλακώνουν' αλλά και να υποβαθμίζονται οι ιδιότητές τους. Η θερμική αποδόμηση οδηγεί σε ανάπτυξη διακλαδώσεων ή σε μεταβολές ομάδων των μακρομορίων, αλλάζοντας τις ιδιότητες του πολυμερούς. Όσο πιο υψηλή η θερμοκρασία τόσο πιο μεγάλο το ποσοστό γήρανσης. Θερμοκρασιακή υποβάθμιση στο φυσικό περιβάλλον συμβαίνει σε θερμοκρασίες κάτω από την θερμοκρασία Tg του πολυμερούς όταν αυτό δεν είναι σε κατάσταση ισορροπίας και αλλάζει προς την κατεύθυνση της θερμοδυναμικής ισορροπίας. Αυτό οδηγεί επιφέρει αλλαγές στις ιδιότητες του πολυμερούς όπως: δυσκαμψία, τάση διαρροής, πυκνότητα, Ρεολογικές ιδιότητες, δυσθραυστότητα, ψαθυροποίηση. Οι αλλαγές εξαρτώνται από την απόσταση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος από την θερμοκρασία Tg.

Τα πλαστικά τα οποία βρίσκονται έξω στο περιβάλλον υπόκεινται σε UV ακτινοβολία. Η ενέργεια της υπεριώδους ακτινοβολίας του ηλίου, απορροφάται επιλεκτικά, από τους ακόρεστους δεσμούς της πολυμερικής αλυσίδας και τις φωτοευαίσθητες ομάδες (που τυχόν περιέχει). Με τον τρόπο αυτό προκαλείται σπάσιμο των δεσμών και κατάτμηση των μακρομοριακών αλυσίδων, με ταυτόχρονη δημιουργία δύο ελεύθερων ριζών. Το είδος των δεσμών που μπορούν να απορροφήσουν ηλιακή ενέργεια, εξαρτάται από τη δομή και την φυσική κατάσταση του πολυμερούς γι' αυτό και η υποβάθμιση συμβαίνει σε διαφορετικά μήκη, για παράδειγμα το καταστροφικό μήκος κύματος για το PE είναι περίπου 300 nm.

Η υγρασία επηρεάζεται από την υπεριώδη ακτινοβολία όπου παράγει διάφορες ελεύθερες ρίζες οι οποίες μπορούν και να οδηγήσουν στην έναρξη αλλά και στην διάδοση της διαδικασίας αποδόμησης. Οι περισσότερες συνθήκες αποδόμησης είναι πολύ πιο αργές σε ζεστά ξηρά κλίματα σε σχέση με τα ζεστά υγρά κλίματα.

Η αποδόμηση είναι μια ακολουθία χημικών μεταβολών που μειώνουν δραστικά το μέσο μοριακό βάρος και τη μηχανική ακεραιότητα του πολυμερούς, που διαμορφώνονται κατά κύριο λόγο από αντιδράσεις όπως φωτο-και θερμική οξειδωση, υδρόλυση και βιοαποδόμηση που προκαλείται από μικροβιακή δραστηριότητα (Singh and Sharma, 2008). Ο ρυθμός αποδόμησης μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την τυπολογία του πολυμερούς, την παρουσία χημικών πρόσθετων, τη διαθεσιμότητα οξυγόνου στο σύστημα, τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε σύγκριση με τις παραλίες, όπου η θερμοκρασία μπορεί να ανέλθει έως και τους 40°C το καλοκαίρι, η γήρανση των πλαστικών είναι σημαντικά πιο αργή σε ψυχρότερο θαλασσινό νερό και θαλάσσια ιζήματα (Andrady, 2011). Σε συνδυασμό με τη φυσική γήρανση, οι καταιγίδες ισχυροί άνεμοι, τα κύματα και η λείανση με άμμο μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλή συγκέντρωση πλαστικών υπολειμμάτων στις παραλίες. Μία έρευνα που διεξήχθη από τους Lee et al. (Lee et al., 2013) μελέτησε την αφθονία των πλαστικών σε διαφορετικές εποχές του χρόνου και βρήκε ότι η συσσώρευση πλαστικών,

ιδιαίτερως μικροπλαστικών, στην άμμο της παραλίας μετά από την περίοδο βροχοπτώσεων ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με την περίοδο πριν τις βροχοπτώσεις.

Η αποδόμηση και η γήρανση των πλαστικών απορριμμάτων με όλους τους τρόπους που αναφέρθηκαν οδηγεί σε θραύση και κατακερματισμό. Τα υποβαθμισμένα πλαστικά γίνονται αρκετά εύθραυστα και μετατρέπονται σε θραύσματα, σε σκόνη και μικροσκοπικά πλαστικά, συνήθως μη ορατά με γυμνό μάτι, που ονομάζονται μικροπλαστικά (Barnes et al., 2009). Η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε παγκόσμια κλίμακα, από τις πολικές περιοχές μέχρι τον ισημερινό, από την ενδιάμεση ζώνη έως τα αβυσικά ιζήματα (Crawford et al., 2017a; Duis and Coors, 2016; Li et al., 2016).



Εικόνα 5: Θραύσματα πλαστικών στη θάλασσα. (blueocean.net).

1.3. Επίδραση μικροπλαστικών στο περιβάλλον

Παρόλο που τα απόβλητα πλαστικών βρίσκονται στο επίκεντρο του περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος εδώ και αρκετό καιρό, μόλις στις αρχές του αιώνα, τα πλαστικά μικροσωματίδια, οι ίνες και οι κόκκοι, γνωστά ως μικροπλαστικά, χαρακτηρίστηκαν ρυπογόνοι παράγοντες (Ryan et al., 2009). Η πλαστική συσσώρευση στο θαλάσσιο περιβάλλον εκτός από την αρνητική αισθητική επίδραση και το οικονομικό κόστος για τον καθαρισμό των παραλιών όπου σύμφωνα με τις τελευταίες συντηρητικές εκτιμήσεις του UNEP (UN Environment Programme) προκαλείται συνολική οικονομική ζημία στα θαλάσσια οικοσυστήματα 13 δισ. δολάρια κάθε χρόνο (Baztan et al., 2017d), εγκυμονεί πολλές βιολογικές και οικολογικές επιπτώσεις.

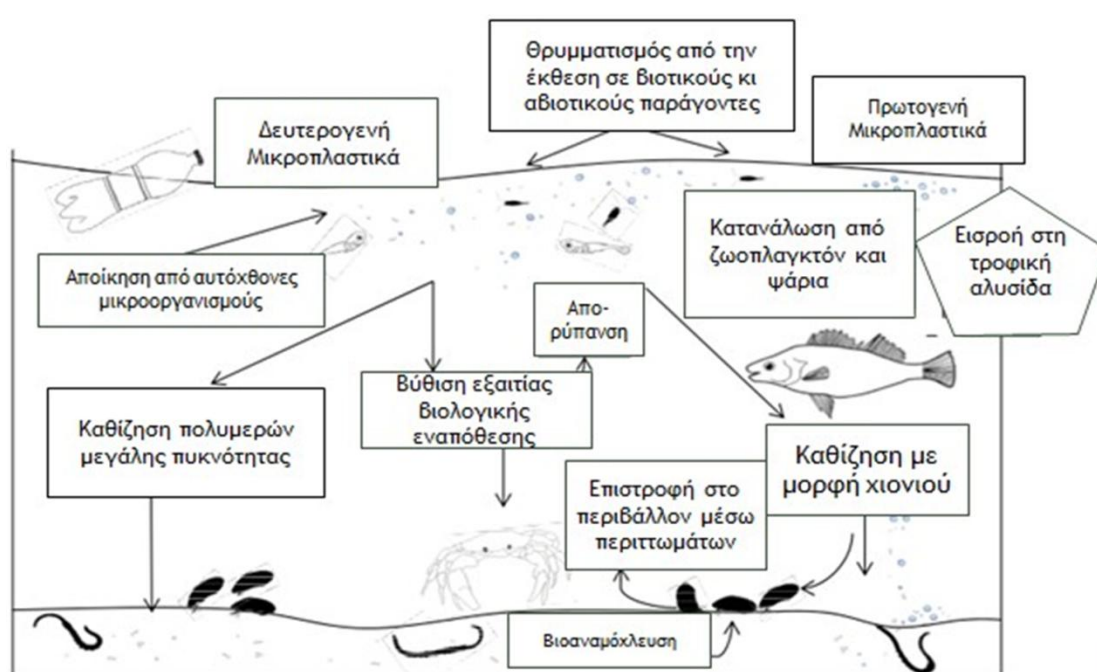
Πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι 663 θαλάσσια είδη αντιμετωπίζουν δυσμενείς επιδράσεις από την αλληλεπίδραση με τα πλαστικά (CBD, 2012), αύξηση κατά 40% σε σύγκριση με προηγούμενη απογραφή (Laist, 1997). Η εμπλοκή και η κατάποση από

μεγάλους οργανισμούς μπορεί να έχει θανατηφόρες συνέπειες, θέτοντας σε κίνδυνο την ικανότητά της θαλάσσιας πανίδας να συλλάβει και να αφομοιώσει τη τροφή. Επίσης τα κομμάτια πλαστικού μπορεί να φράξουν τα μέρη του τροφικού και πεπτικού συστήματος, ή ακόμα και να προκαλέσουν ψευδή αίσθηση κορεσμού με αποτέλεσμα την μειωμένη πρόσληψη τροφής, την εξασθένηση, τη μείωση της μετακίνησης συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης και της διαφυγής από τους θηρευτές.(C.Giacomo,S.Gorbi, 2017) Τα θαλάσσια θηλαστικά, τα θαλάσσια πτηνά, οι χελώνες, τα ψάρια είναι οι πιο επηρεασμένοι οργανισμοί από τα μικροπλαστικά (Bergmann et al., 2015; Crawford et al., 2017b; Wright et al., 2013). Τα πρώτα σωματίδια πλαστικού βρέθηκαν σε γλάρους τη δεκαετία του 1960 όταν η παραγωγή πλαστικού ήταν σχετικά χαμηλή. Δεδομένου ότι η παραγωγή πλαστικών αποβλήτων αυξάνεται συνεχώς, αναμένεται επίσης ότι ο αριθμός των επηρεαζόμενων ειδών να αυξηθεί στο μέλλον.

Μείζον οικολογικό πρόβλημα αποτελούν τα μικροπλαστικά που λόγω του μικρού τους μεγέθους και της παρουσίας τους τόσο στην επιφάνεια όσο και στο βυθό, έχουν μεγάλες πιθανότητες να καταποθούν από ένα ευρύ φάσμα οργανισμών ,ιδιαίτερα όταν οι μηχανισμοί τροφοδοσίας δεν επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ σωματιδίων (Baztan et al., 2017a; Duis and Coors, 2016). Μελέτες έχουν δείξει πως το πλαγκτόν πολλές φορές μπερδεύει τα μικροπλαστικά με τη λεία του λόγω κυρίως του χρώματος κι επειδή ανήκει στο πρωτογενές τροφικό επίπεδο αποτελεί ένα μονοπάτι για τη μεταφορά στην τροφική αλυσίδα. Ορισμένοι οργανισμοί όπως τα καβούρια της θάλασσας πχ: *Carcinus maenas*, δεν καταναλώνουν μόνο μικροπλαστικά μαζί με τα τρόφιμα, αλλά εξαιτίας των μηχανισμών εξαερισμού που έχουν τα μικροπλαστικά προσκολλώνται στα βράγχια τους (Eriksen et al., 2014). Μετά την κατάποση, τα μικροπλαστικά αποβάλλονται μέσω των κοπράνων. Οργανισμοί που τρέφονται με περιττώματα και νεκρή ύλη μπορούν να καταναλώσουν με αυτόν τον τρόπο τα μικροπλαστικά. Ακόμη οι οργανισμοί που κατοικούν σε ιζήματα, όπως η *Arenicola marina*, είναι ικανοί για αναμόχλευση (ανακυκλώνουν τα ανώτερα στρώματα των ιζημάτων) και κομμάτια μικροπλαστικών που έχουν καθιζάνει στον βυθό μπορεί να αναμοχλευθούν με ιζήματα, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμα για τους μικροοργανισμούς που τρέφονται από αυτά.

Η προοπτική για τα μικροπλαστικά να προκαλούν βλάβη στους θαλάσσιους οργανισμούς εξαρτάται από την ευαισθησία των ειδών να καταπιούν και/ή να αλληλεπιδρούν μαζί τους. Σε μία εργαστηριακή μελέτη η οποία ερευνούσε τη σύλληψη σωματιδίων και μεθόδους σίτισης (suspension feeding methods), οι αχινοί, οι αστερίες και άλλοι οργανισμοί αιχμαλώτισαν και έφαγαν μικροσφαιρίδια 10–20 mm PS διβινυλοβενζολίου(More et al., 2014). Πρόσθετα αναλύσεις που έγιναν σχετικά με το περιεχόμενο στομάχου σε τρία διαφορετικά είδη μεγάλων πελαγικών μεσογειακών ειδών (*Xiphias gladius*, *Thunnus thynnus*, *Thunnus alalunga*) έδειξαν την εμφάνιση μικροπλαστικών στο 18,5% των συλλεγόμενων οργανισμών, παρέχοντας την πρώτη ένδειξη πρόσληψης μικροπλαστικών στους κυρίαρχους θηρευτές της Μεσογείου (Romeo et al., 2015) . Τα μικροπλαστικά εξήχθησαν επίσης από ψάρια με υψηλό εμπορικό ενδιαφέρον κατά μήκος της Κεντρικής-Βόρειας Αδριατικής Θάλασσας με 28% αναλυθέντων οργανισμών να περιέχουν αυτά τα σωματίδια στο στομάχι τους (Avio et.al., 2015b). Τα μικροπλαστικά δεν μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα μόνο μέσω της κατάποσης, αλλά έχει παρατηρηθεί και δυνατότητα προσρόφησης σε οργανισμούς. Στη βάση της τροφικής αλυσίδας, τα κύτταρα

των αλγών *Chlorella* και *Scenedesmus* των γλυκών και θαλάσσιων υδάτων αντίστοιχα, προσρόφησαν φορτισμένα νανοπλαστικά (20 nm). Έχει αναφερθεί μια προτίμηση για θετικά φορτισμένα σωματίδια, πιθανόν λόγω της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ των σφαιριδίων και της κυτταρικής σύστασης των ζωντανών κυττάρων. Η προσρόφηση των νανοπλαστικών εξαρτάται και από τη μορφολογία και την κινητικότητα των φυκών, με το *Scenedesmus* να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τα σωματίδια (Bhattacharya et al., 2010). Τα μικροπλαστικά μπορεί να μην επηρεάζουν μόνο τα διάφορα είδη σε επίπεδο οργανισμού, έχουν επίσης την ικανότητα να τροποποιούν τη δομή του πληθυσμού. Είδη που κάποτε ήταν περιορισμένα λόγω έλλειψης σκληρού υποστρώματος, όπως το θαλάσσιο έντομο *H. Sericeus*, πλέον είναι σε θέση να πολλαπλασιαστούν. Αυτό μπορεί να ισχύει για ένα ευρύ φάσμα οργανισμών με δυνητικές επιπτώσεις στη δυναμική των οικοσυστημάτων (Wright et al., 2013). Στη κάτωθι εικόνα παρουσιάζονται συνοπτικά οι σχέσεις αλληλεπίδρασης της θαλάσσιας πανίδας και των μικροπλαστικών.



Εικόνα 6: Αλληλεπίδραση μικροπλαστικών με θαλάσσιους οργανισμούς (Wright et al., 2013).

Πέραν από τις δυσμενείς επιδράσεις που μπορεί να έχει η ίδια η κατάποση των μικροπλαστικών πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη τοξικών αντιδράσεων εξαιτίας της διάχυσης εγγενών ρύπων από τα μικροπλαστικά, αλλά και από εξωγενείς ρύπους που προσκολλώνται σε αυτά. Παρόλο που τα πλαστικά θεωρούνται βιοχημικά αδρανή η πιθανότητα διαρροής των χημικών τους πρόσθετων που συχνά αναφέρονται και ως πλαστικοποιητές εγκυμονεί βιολογικές επιπτώσεις στο περιβάλλον .

Οι πλαστικοποιητές ενσωματώνονται στα πλαστικά κατά τη διάρκεια της κατασκευής για να αλλάξουν τις ιδιότητές ή να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του πλαστικού παρέχοντας αντίσταση στη θερμότητα. Τα πρόσθετα αυτά παρουσιάζουν ανησυχία για το περιβάλλον αφενός γιατί παρατείνουν τους χρόνους διάσπασης των πλαστικών κι αφετέρου γιατί μπορεί να εισάγουν πιθανά επιβλαβή χημικά στους οργανισμούς. Ο ατελής πολυμερισμός

κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των πλαστικών επιτρέπει στα πρόσθετα να αποσπώνται από τον συνθετικό πυρήνα των πλαστικών. Για παράδειγμα οι φθαλικές ενώσεις είναι ουσίες που μαλακώνουν τα πλαστικά μειώνοντας τη συγγένεια μεταξύ των μοριακών αλυσίδων. Η δισφαινόλη Α είναι ένα μονομερές συστατικό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε δοχεία τροφίμων και ποτών. Κανένα από τα δυο συστατικά είναι μόνιμο, αλλά η αστάθεια τους μέσα στα πλαστικά προϊόντα διευκολύνει την απόσπαση τους και έχει αναφερθεί ευρέως ο υψηλός βαθμός παρουσίας τους σε υδάτινα περιβάλλοντα, ιδιαίτερα στις αποστραγγίσεις των χώρων υγειονομικής ταφής (Avio et al., 2017). Λόγω της μεγάλης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο μικροπλαστικών, οι θαλάσσιοι οργανισμοί μπορεί να εκτεθούν απευθείας σε εκπλυόμενα πρόσθετα μετά την κατάποση μικροπλαστικών. Τέτοια πρόσθετα και μονομερή μπορούν να παρεμβληθούν σε βιολογικές σημαντικές διεργασίες, οι οποίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε ενδοκρινικές διαταραχές, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και την καρκινογένεση. Συχνά χρησιμοποιούμενα πρόσθετα, μεταξύ των οποίων και οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλαιθέρες, φθαλικοί εστέρες και η μονομερής δισφαινόλη Α, είναι γνωστό πως διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία καθώς μιμούνται, ανταγωνίζονται ή διαταράσσουν τη σύνθεση των ενδογενών ορμονών. Εκτός από την έκλυση προσθέτων, ο χημικός κίνδυνος των μικροπλαστικών προέρχεται επίσης από την προσρόφηση μιας ευρείας σειράς οργανικών και ανόργανων μολυσματικών ουσιών σε αυτά (Qiu et al., 2016). Εξαιτίας της μεγάλης ειδικής επιφάνειας και της συγγένειας των οργανικών ρύπων με τα υδρόφοβα χαρακτηριστικά των πολυμερών, οι συγκεντρώσεις των περιβαλλοντικών χημικών ουσιών στα μικροπλαστικά είναι συχνά αρκετές τάξεις μεγέθους υψηλότερες από εκείνες που ανιχνεύονται στο θαλασσινό νερό (Crawford et al., 2017a).

Γενικά, ο συνδυασμός φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων επιτρέπει την αύξηση των συγκεντρώσεων των χημικών ρύπων με την πάροδο του χρόνου μέσω της προσρόφησης στα σωματίδια και της συσσώρευσης στο βιοφίλμ (Qiu et al., 2016). Διαφορετικά πολυμερή, όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο, το πολυαιθυλένιο, το πολυπροπυλένιο, το πολυστυρένιο, έδειξαν υψηλή ικανότητα απορρόφησης για DDTs, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH), εξαχλωροκυκλοεξάνια και χλωριωμένα βενζόλια (Baztan et al., 2017c; Ivar do Sul et al., 2009; Lee et al., 2013). Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (POPs), όπως τα πολυχλωροδιφαινύλια (PCB), τα οργανικά αλογονωμένα εντομοκτόνα, η εννεϋλοφαινόλη, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι διοξίνες έχουν ανιχνευθεί σε πλαστικά pellets σε διαφορετικές παραλίες σε ολόκληρο τον κόσμο. Ακόμη μέταλλα έδειξαν επίσης ισχυρή ικανότητα απορρόφησης στο πλαστικό με μετρούμενα επίπεδα έως και 300 $\mu\text{g} / \text{g}$ για τα Al, Fe, Cu, Pb και Zn και μέχρι 80 ng / g για τα Cd, Cr, Co, Ni σε σφαιρικά pellets (Baztan et al., 2017e).

1.4. Κατηγοριοποίηση Μικροπλαστικών

Τα πλαστικά που κατασκευάζονται σε μικροσκοπικό μέγεθος ονομάζονται πρωτογενή μικροπλαστικά. Αυτά τα πλαστικά χρησιμοποιούνται σε καθαριστικά προσώπου και καλλυντικά ή ως ψεκαστικά μέσα ενώ έχει αναφερθεί εκτενώς και η χρήση τους σε

φάρμακα σε βιομηχανικά λειαντικά , «αμμοβολή», σε κλωστοϋφαντουργικές εφαρμογές και συνθετικά ρούχα (Crawford, 2016). Τα πρωτογενή μικροπλαστικά , εισάγονται απευθείας στους ωκεανούς μέσω απορροής.

Όμως η πλειοψηφία των μικροπλαστικών στους ωκεανούς είναι δευτερογενή μικροπλαστικά που προέρχονται από το κατακερματισμό μεσοπλαστικών ή μεγαλύτερων πλαστικών αποβλήτων.(Crawford, 2016). Με την πάροδο του χρόνου η κορύφωση των φυσικών, βιολογικών και χημικών διαδικασιών μπορεί να μειώσει τη δομική ακεραιότητα του πολυμερούς με αποτέλεσμα τον θρυμματισμό του. Η έκθεση στο φως του ήλιου ξεκινά την αυτοκαταλυτική θερμική οξείδωση που είναι υπεύθυνη για την αρχική διαδικασία αποδόμησης και συνδυαστικά μπορούν να προκαλέσουν θρυμματισμό των πλαστικών στις παραλίες. Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία του ηλιακού φωτός προκαλεί την οξείδωση της μήτρας του πολυμερούς, οδηγώντας στη διάσπαση των δεσμών και στην αλλαγή των ιδιοτήτων του. Επίσης κατά την παραμονή τους στο περιβάλλον, τα πλαστικά επηρεάζονται από παράγοντες όπως η μηχανική καταπόνηση, οι υψηλές θερμοκρασίες αλλά και από τη δράση μικροοργανισμών (Sivan, 2011). Τέτοιου είδους αποδόμηση μπορεί να έχει επίδραση στα πρόσθετα του πολυμερούς, τα οποία είναι σχεδιασμένα να ενισχύουν την ανθεκτικότητα και την αντοχή στη διάβρωση, και να τα αφαιρέσει από τα πλαστικά. Αν και οι ψυχρές, αλογονούχες συνθήκες του θαλάσσιου περιβάλλοντος είναι πιθανό να αποτρέψουν τη φώτο-οξείδωση τα πλαστικά κομμάτια στις παραλίες έχουν υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου και άμεση έκθεση στο ηλιακό φως, έτσι ώστε με την πάροδο του χρόνου να γίνονται εύθραυστα, να σχηματίζουν ρωγμές και να «κιτρινίζουν»(Andrady, 2017) . Με την μείωση της αντίστασής τους στην οξείδωση και τη γήρανσή , τα πλαστικά είναι όλο και πιο ευαίσθητα στον θρυμματισμό που προκύπτει από την τριβή με τα κύματα την άμμο και τον αέρα. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται, με τα θραύσματα να γίνονται μικρότερα με την πάροδο του χρόνου μέχρι να γίνουν μικροπλαστικά. Θεωρείται ότι τα μικροπλαστικά μπορούν να αποδομηθούν περαιτέρω σε μέγεθος νανοπλαστικών αν και τα μικρότερα μικροσωματίδια που ανιχνεύονται στους ωκεανούς σήμερα έχουν διάμετρο 1,6 μm (Duis and Coors, 2016). Η παρουσία νανοπλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι πιθανό να έχει αυξανόμενη σημασία τα επόμενα χρόνια και οι ερευνητές, συμπεριλαμβανομένου του Andrady (2011), έχουν ήδη αρχίσει να εικάζουν για τον αντίκτυπο που μπορεί να έχει ένας τέτοιος ρύπος στη τροφική αλυσίδα του θαλάσσιου περιβάλλοντος.

1.5. Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE)

Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) είναι ένα από τα συνθετικά πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους και έχει υδρόφοβη φύση. Η φυσική βιοαποδόμηση του HDPE είναι πολύ αργή διαδικασία. Τα μικρόβια δεν εξελίσσονται πλήρως για να αποδομήσουν το συνθετικό πολυαιθυλένιο στην ατμόσφαιρα χωρίς την επίδραση των αβιοτικών παραγόντων. Από την εποχή της δημιουργίας του μέχρι σήμερα έχει υποστεί πολλές αλλαγές στη μορφή του για τη βελτίωση της σταθερότητας και της αποδόμησης του. Για δεκαετίες, οι ερευνητές πραγματοποιούσαν σημαντικές αλλαγές στο πολυαιθυλένιο για να αυξήσουν τη σταθερότητα. Σήμερα, οι πολυάριθμες μεταβολές στο πολυαιθυλένιο περιλαμβάνουν την προσθήκη προ-οξειδωτικών, σύνθετων κυτταρίνης ή μορίων αμύλου στο πολυαιθυλένιο κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού προκειμένου να ενισχυθεί η βιοαποδομησιμότητα. Λόγω της δραματικής αύξησης της κατανάλωσης HDPE, η διαχείριση των αποβλήτων HDPE είναι κρίσιμη και εξελίσσεται ως παράλληλη βιομηχανία (Balasubramanian et al., 2014).

Η διάθεση του HDPE στο περιβάλλον προκαλεί σοβαρά προβλήματα και εντούτοις αποτελεί απειλή για το βιολογικό οικοσύστημα. Το HDPE που συσσωρεύεται στα υδάτινα σώματα ως μορφή θραυσμάτων πλαστικού, μπορεί μερικές φορές να προκαλέσει εμπλοκή στο έντερο των ψαριών, των πτηνών και των θαλάσσιων θηλαστικών στο θαλάσσιο οικοσύστημα (Spear et al., 1995). Η άμεση διάθεση (χωματερές ή ΧΥΤΑ) και η αποτέφρωση (καύση) αυτών των αποβλήτων αποτελεί κοινή πρακτική στις αναπτυσσόμενες χώρες. Όμως και οι δύο μέθοδοι είναι επιβλαβείς για ολόκληρο το οικοσύστημα. Η καύση του HDPE ενθαρρύνει την ατμοσφαιρική ρύπανση, η πλειοψηφία των οποίων είναι εξαιρετικά τοξική και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και οι αναπνευστικές διαταραχές, όπως το άσθμα κλπ. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να επιλυθεί αυτό το παγκόσμιο ζήτημα του πολυαιθυλενίου και να αποκατασταθεί το φυσικό οικοσύστημα με βιολογικά διατηρούμενο τρόπο μέσω της εμπλοκής του φυσικού ανακυκλωτή στη διαδικασία βιοαποδόμησης (Sangale, 2012). Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του, το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας είναι μια θερμοπλαστική ρητίνη. Στην θερμοκρασία δωματίου η πυκνότητα είναι μεταξύ 0.94 και 0.96 g/cm³, περίπου το 60% είναι κρυσταλλικό και το υπόλοιπο είναι άμορφο. Αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες λόγω του τρόπου πολυμερισμού του. Οι γραμμικές αλυσίδες στοιβάζονται μαζί πιο εύκολα. Η ονομαστική τιμή της κρυσταλλικότητας του είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις συνηθισμένες πολυελοφίνες. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g (κάτω από την οποία το υλικό συμπεριφέρεται σαν γυαλί και είναι σκληρό και άκαμπτο) στο πολυαιθυλένιο είναι πολύ χαμηλή (-100°C) κι γ'αυτό χαρακτηρίζεται από εύκαμπτες μοριακές αλυσίδες σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Στα ημι-κρυσταλλικά πολυμερή όπως το PE ή το PP η πίεση που ασκείται δεν οδηγεί στη παραμόρφωση των κρυσταλλινών αλλά στην επέκταση (ή συμπίεση) του άμορφου κλάσματος και των μορίων πρόσδεσης που συνδέουν κρυσταλλίτες μαζί (Andrady, 2017). Οι μηχανικές και χημικές ιδιότητες εξαρτώνται από την κρυσταλλικότητα και τον βαθμό πολυμερισμού, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τον δείκτη ροής τήξης MFI (Melt Flow Index, DIN 16776).

Η κρυσταλλικότητα χαρακτηρίζεται από την πυκνότητα. Η αυξημένη πυκνότητα σημαίνει αυξημένη κρυσταλλικότητα και άρα αυξημένο μέτρο ελαστικότητας, αυξημένη σκληρότητα, αυξημένη αντοχή σε εφελκυσμό και κάμψη, αυξημένη χημική αντοχή, αυξημένη αδιαπερατότητα έναντι των αερίων και ατμών και αυξημένη αντοχή στην θερμότητα. Αυξημένη μοριακή μάζα σημαίνει, αυξημένο βαθμό πολυμερισμού και άρα αυξημένη αντοχή σε κρούση, σε σχηματισμό ρωγμών τάσης και σε χάραξη.

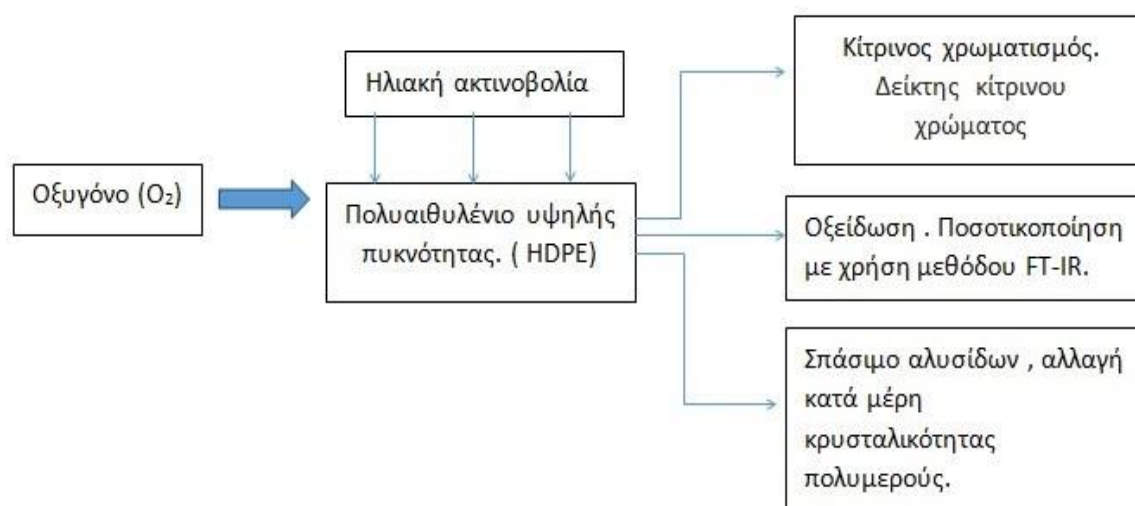
Η ύπαρξη απλών δεσμών μεταξύ των ανθράκων στις πολυολεφίνες τις κάνει υδρόφοβες. Δεν είναι δεκτικές στην υδρολυτική αποδόμηση, μπορούν όμως να αποδομηθούν διαμέσου οξειδωτικών μηχανισμών. Το HDPE αποτελείται από δεσμούς C-C και C-H. Ωστόσο, οι πολυολεφίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές τους μόνο μετά την προσθήκη ορισμένων ποσοτήτων σταθεροποιητών υπεριώδους φωτός (UV). Χωρίς σταθεροποιητές, η αποσύνθεσή τους είναι τόσο γρήγορη, ώστε ο χρόνος ζωής τους θα μπορούσε να είναι μικρότερος του ενός έτους. Αυτό συμβαίνει επειδή οι πολυολεφίνες περιέχουν κάποιες προσμίξεις, οι οποίες σχηματίζονται κατά τη σύνθεσή τους, όπως καρβονύλιο, υπεροξείδιο, υδροξύλιο, υδροϋπεροξείδιο, ακόρεστες ομάδες, και οι οποίες απορροφούν το φως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και οδηγούν στην δημιουργία ελευθέρων ριζών. Αυτές οι προσμίξεις ενεργούν ως εκκινητές για τη φωτοαποδόμηση του HDPE. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα του HDPE στο υπεριώδες, εκτός από την ηλιακή ακτινοβολία, είναι η θερμοκρασία, η κυκλική θέρμανση, η υγρασία, ο καιρός, οι ρύποι και τα πρόσθετα (Balasubramanian et al., 2010; Sangale, 2012).

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις φυσικές και μηχανικές ιδιότητες του HDPE.

Πίνακας 1: Ιδιότητες Πολυαιθυλενίου (ΒΕΗ, τεχνικό φυλλάδιο, www.vei.gr).

Ιδιότητα	Τιμή	Μονάδα SI:
Μέση πυκνότητα	0,94-0,95	g/m ³
Συντελεστής θερμικής διαστολής	$\sim 1,3 \cdot 10^{-4}$	K ⁻¹
Συντελεστής θερμ. αγωγιμότητας	$\sim 0,45$	mK/W
Μέτρο ελαστικότητας	~ 1200	N/mm ²
Δείκτης τήξης MFI	0,45	g/10 min

Τυπικά, παρατηρούνται αρκετές αλλαγές στο πολυαιθυλένιο που υφίσταται γήρανση. Αυτές οι αλλαγές συνοψίζονται στο διάγραμμα .



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα των αλλαγών στο πολυαιθυλένιο που υποβλήθηκε σε ηλιακή ακτινοβολία σε παραλία (Andrady, 2017)

Στην παρούσα μελέτη, μετά πεντάμηνη έκθεση σε UV-A ακτινοβολία και άσκηση ήπιας μηχανικής καταπόνησης δημιουργήθηκαν δευτερογενή μικροπλαστικά από φίλμ υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων στα δευτερογενή μικροπλαστικά σε

προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον όπου τα μικροπλαστικά είναι η μοναδική πηγή άνθρακα. Το εύρος διαμέτρου των μικροπλαστικών κυμαινόταν από 2mm έως 250μm. . Στη συνέχεια τα μικροπλαστικά χωρίστηκαν ισόποσα σε κωνικές φιάλες κι αυτές εμβολιάστηκαν με μικροβιακές κοινότητες από τον κόλπο του Άγιο Ονούφριου που είχε ήδη αναπτυχθεί παρουσία πολυαιθυλενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και της Σούδας Χανίων. Μετρήσεις βάρους των μικροπλαστικών , της μικροβιακής ανάπτυξης και δραστηριότητας του μεγέθους των σωματιδίων στο διηθούμενο υγρό κι της χημικής σύστασης της επιφάνειας των μικροπλαστικών πραγματοποιούνταν κάθε μήνα για την παρακολούθηση και εκτίμηση της επίδρασης των αυτοχθόνων θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων σε δευτερογενή πλαστικά στο θαλάσσιο περιβάλλον.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

Πλαστικές σακούλες από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) προμηθεύτηκαν από μονάδα παραγωγής στο νομό Χανίων. Μετατράπηκαν σε φιλμ συγκεκριμένων διαστάσεων από ειδικό μηχάνημα της εταιρείας ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΡΗΤΗΣ Α.Ε. Τοποθετήθηκαν σε κλειστά σιδερένια δοχεία με άμμο εκτεθειμένα σε UV-A ακτινοβολία για 5 μήνες . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε από το φοιτητή κ. Δημήτρη Ντινόπουλο στα πλαίσια της διπλωματικής του εργασίας.



Εικόνα 7: Φιλμ πλάτους 1cm, μήκους περίπου 9 cm και πάχος 0,1mm



Εικόνα 8: HDPE φιλμ σε άμμο με UV-A ακτινοβολία

Η θερμοκρασία και η ακτινοβολία μετρήθηκαν με καταγραφικά (hobo loggers) και πιο συγκεκριμένα με το HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Το θερμοκρασιακό εύρος που μπορεί να καταγράψει το μοντέλο αυτό είναι από -20 °C έως 70 °C και η φωτεινότητα αντίστοιχα από 0 έως 320,000 lux (0 to 30,000 lumens/ft²). Τα καταγραφικά αυτά τοποθετήθηκαν στα σιδερένια δοχεία και κατέγραφαν τη φωτεινότητα όλου του φάσματος της ακτινοβολίας και θερμοκρασίας. Στους 5 μήνες που έμειναν στον «θάλαμο» ακτινοβολήσης, τα πλαστικά εκτέθηκαν σε 566.413,75 lux όπου:

$$1 \text{ lx} = \frac{1 \text{ lm} < -\text{φωτεινή ισχύς σε lumen}}{1 \text{ m}^2 < -\text{επιφάνεια}}$$

Και η θερμοκρασία ανάλογα τις εξωτερικές συνθήκες μεταβαλλόταν από $T_{\min} = 8,7^{\circ}\text{C}$ σε $T_{\max} = 39,0^{\circ}\text{C}$ με μέση θερμοκρασία $T_{\text{average}} = 25,1^{\circ}\text{C}$

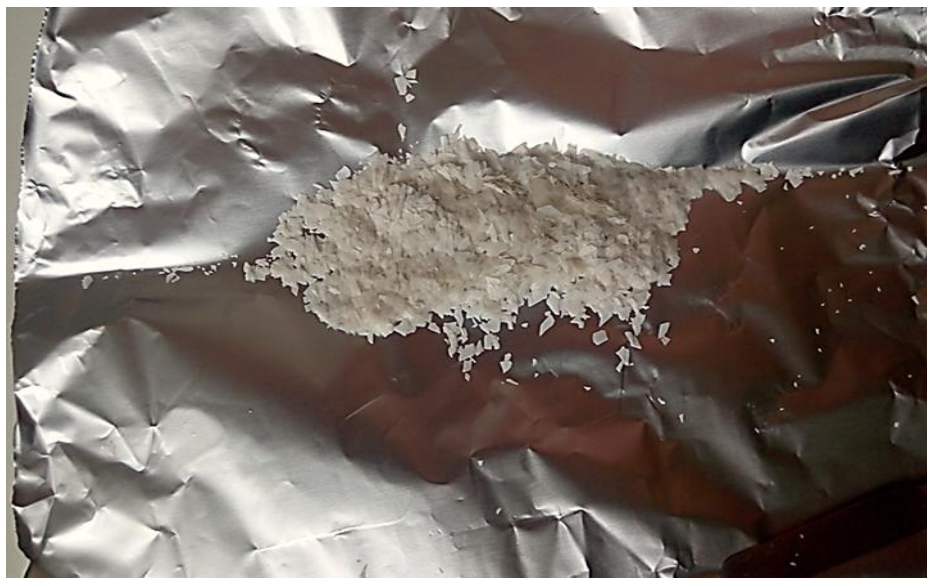


Εικόνα 9: Καταγραφικό hobo logger (πηγή: onsetcomp.com)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων

Στη παρούσα διπλωματική εργασία τα ήδη εκτεθειμένα ,σε UV-A ακτινοβολία ,φίλμ με πλάτος 1cm , μήκος περίπου 9 cm και πάχος 0,1mm ,θρυμματίστηκαν με άσκηση ήπιας μηχανικής καταπόνησης ώστε να προκύψουν τα δευτερογενή μικροπλαστικά. Τα μικροπλαστικά διαχωρίστηκαν και συλλέχθηκαν με τη χρήση δύο κόσκινων με άνοιγμα πόρου 2 mm και 250μm. Τα θραύσματα εκτός της περιοχής αυτής συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά.



Εικόνα 10: Δείγμα μετά την άσκηση ήπιας μηχανικής καταπόνησης και κοσκινίσματος

Τα θραύσματα με επιθυμητό μέγεθος , του καταπονημένου από ακτινοβολία πλαστικού, ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων 10^{-4} g και χωρίστηκαν σε ποσότητες των 50 ± 2 mg. Καθαρίστηκαν με νερό από τα υπολείμματα άμμου και ψεκάστηκαν με 70% διάλυμα αιθανόλης ώστε να απολυμανθούν. Στη συνέχεια ξηράνθηκαν στους 37°C για τρεις μέρες. Μετά το πέρασμα των τριών ημερών χρησιμοποιήθηκαν 26 γυάλινες κωνικές φιάλες των 100 mL όπου προστέθηκε η ζυγισμένη ποσότητα των δευτερογενών μικροπλαστικών καθώς και 50 mL φιλτραρισμένου και αποστειρωμένου θαλασσινού νερού.

2.2.2. Ανάπτυξη Μικροοργανισμών

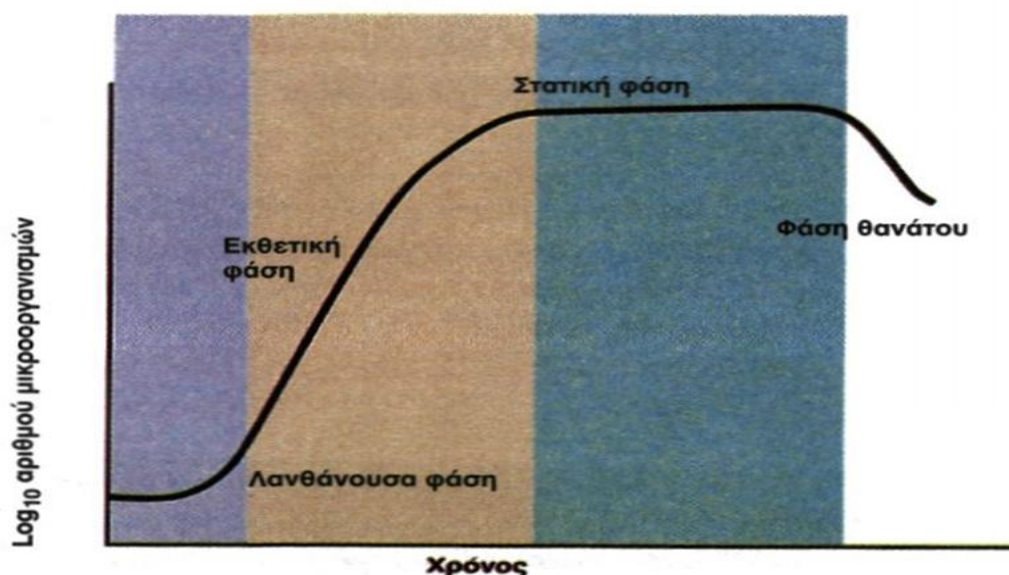
Η πελαγική μικροβιακή κοινότητα συλλέχθηκε από την περιοχή του κόλπου της Σούδας στα Χανιά. Αρχικά συλλέχθηκαν 250 mL θαλασσινού νερού, φιλτραρίστηκαν από μέσο με πόρο 200 μm ώστε να απομακρυνθούν οι ζωοπλαγκτονικοί μικροοργανισμοί και στη συνέχεια επώαστηκαν με 50mg κομματιών πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE) και προσθήκη 0,5mL θρεπτικό διάλυμα DSMZ 453 για 7 ημέρες στους 25°C με ανάδευση στις

120rpm. Η μικροβιακή κοινότητα ονομάστηκε **‘Souda’** και αντιστοιχούσε στην πελαγική μικροβιακή κοινότητα της Σούδας.

Στη συνέχεια 50 mL από την υγρή αυτή καλλιέργεια φυγοκεντρίθηκαν στις 3500rpm για 20 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το στερεό υπόλειμμα μεταφέρθηκε καινούργια αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιείχε 200ml υγρού DSZM 453 ώστε να πραγματοποιηθεί η καμπύλη ανάπτυξης της κοινότητας.

Η δεύτερη θαλάσσια κοινότητα απομονώθηκε στα πλαίσια του FP-7 Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος BIOCLEAR (New BIOTEchnological approaches for biodegrading and promoting the environmental biotransformation of synthetic and polymeric materials) που εκπονήθηκε από το Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης. Είναι μικροβιακή κοινότητα που αρχικά είχε συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του κόλπου του Άγιου Ονούφριου, Χανιά και εγκλιματίστηκε για 6 μήνες σε περιβάλλον με μοναδική πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου και ονομάστηκε **‘Agios’**.

Αρχικά ήταν σημαντικό να μελετηθεί η καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών των δύο κοινοτήτων. Ο προσδιορισμός της καμπύλης ανάπτυξης των δύο διαφορετικών κοινοτήτων στηρίχθηκε στην εκτίμηση της θολερότητας των βακτηριακών αιωρημάτων και προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα (OD) με χρήση UV-VIS φασματοφωτόμετρου στα 600nm. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο φασματοφωτόμετρο επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως διάμετρο, σχήμα, δείκτη διάθλασης και σύσταση των κυττάρων. Στόχος για τον ορισμό της καμπύλης ανάπτυξης των δύο κοινοτήτων ήταν να αποκτηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα σημεία ώστε η αποτύπωση τους σε ημιλογαριθμικό χαρτί να παρουσιάσει όλες τις φάσεις μίας καμπύλης ανάπτυξης.



Εικόνα 11: (Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης (πηγή: ebooks.edu.gr))

Παράλληλα με κάθε μέτρηση της απορρόφησης έγινε μέτρηση των αποικιών των

βακτηρίων σε πιάτα Petri με αραιώσεις $10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}$ προκειμένου να μετρηθεί ο αριθμός των αποικιών (CFU) για κάθε κοινότητα σε αυτή την ειδική τιμή απορρόφησης. Με τη πλήρη περιγραφή της καμπύλης ανάπτυξης καθώς και την ταυτόχρονη μελέτη της δυναμικότητας των μικροβιακών κοινοτήτων βρέθηκαν τα εξής :

- Απορρόφηση (OD) που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση των δύο θαλάσσιων κοινοτήτων.
- Αριθμός αποικιών κάθε θαλάσσιας κοινότητας για τη συγκεκριμένη τιμή απορρόφησης (OD).

Επομένως κατάλληλες τιμές απορρόφησης για την εκθετική φάση είναι :

- Agios ≈ 0.8
- Souda ≈ 0.7
- Στην εκθετική φάση $\frac{\text{ο αριθμός των αποικιών (CFU) για κάθε κοινότητα}}{\text{mL}} \approx 10^7$

Έτσι όταν η απορρόφηση έφθασε στις συγκεκριμένες τιμές OD, η εκάστοτε υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 4500 rpm για 13 λεπτά. Το σφαιρίδιο που δημιουργήθηκε στα τοιχώματα του φάλκον διαλύθηκε σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και επαναφυγοκεντρήθηκε. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Η ποσότητα εμβολιασμού ώστε η αρχική συγκέντρωση να είναι $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ υπολογίστηκε με το νόμο της αραιώσης :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{10^5 \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \cdot 50 \text{ mL}}{4 \cdot 10^7 \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}} = 0,125 \text{ mL}$$

Με την ίδια ποσότητα εμβολιάστηκαν 12 κωνικές φιάλες με μικροοργανισμούς από την υγρή καλλιέργεια 'Agios' και 12 κωνικές φιάλες με μικροοργανισμούς από την υγρή καλλιέργεια 'Souda'.

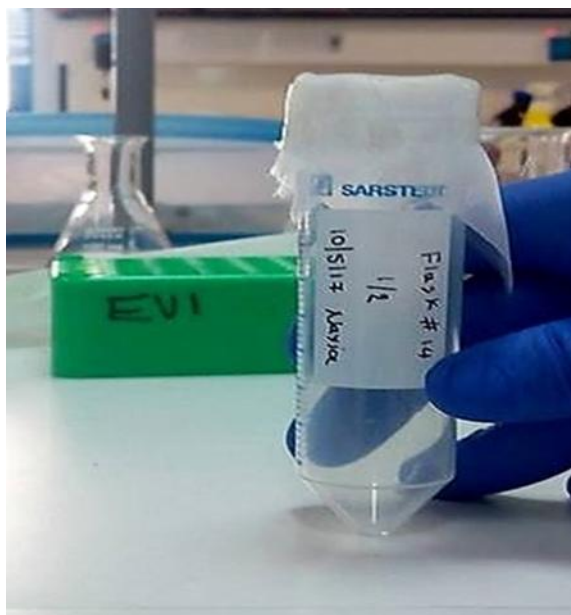
2.2.3. Σχεδιασμός πειράματος

Το πείραμα διεξήχθη σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100mL. Οι φιάλες προσομοιώνουν τις συνθήκες που επικρατούν σε έναν αντιδραστήρα Batch. Αρχικά εισήχθησαν 50 mL φιλτραρισμένου αποστειρωμένου θαλασσινού νερού καθώς και η ποσότητα μικροπλαστικών υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Δώδεκα φιάλες εμβολιάστηκαν με τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς από την περιοχή της Σούδας ενώ οι

άλλες δωδεκάδα εμβολιάστηκαν με τους μικροοργανισμούς του Αγίου Ονουφρίου. Οι 24 μικρόκοσμοι επωάστηκαν στους 25°C σε αναδευόμενη τράπεζα στις 120 rpm για να εξασφαλιστούν οι αερόβιες συνθήκες. Ολο το πείραμα διήρκεσε 4 μήνες. Το πρώτο δεκαήμερο κάθε μήνα τρείς κωνικές φιάλες από κάθε περίπτωση απομακρύνονταν μόνιμα για να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις. Επιπρόσθετα δύο αποστειρωμένες φιάλες στις οποίες είχε εισαχθεί μόνο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και ποσότητα μικροπλαστικών χρησιμοποιήθηκαν σαν αβιοτικά δείγματα ελέγχου από τα οποία το ένα σε αναδευόμενο τραπέζι καθόλη τη διάρκεια του πειράματος και το άλλο βρισκόταν ακίνητο σε σκοτεινό μέρος .

2.2.4. Μετρήσεις βάρους

Για την εκτίμηση της μεταβολής του βάρους των μικροπλαστικών ,που εισήχθησαν μέσα στις κωνικές φιάλες κατά την διάρκεια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ειδικό φίλτρο πλαγκτού με άνοιγμα πόρων 250μm.



Εικόνα 12: (τοποθετημένο φίλτρο πλαγκτού σε falcon 50ml για να διήθηση και συλλογή του υγρού)

Για τη διήθηση του υγρού εντός των κωνικών φιαλών και τη μέτρηση του βάρους ακολουθήθηκαν οι παρακάτω ενέργειες:

- Ξήρανση φίλτρου διάστασης ίσης ή μεγαλύτερης των 6cm*6cm για 5 ημέρες
- Ζύγιση φίλτρου μετά τη ξήρανση
- Διήθηση του υγρού των κωνικών φιαλιδίων και συλλογή του διηθημένου υγρού
- Πλύση των γυάλινων φιαλιδίων και διήθηση του νέου υγρού με σκοπό τη συλλογή όλου του δείγματος μικροπλαστικών.
- Επανάληψη πλύσης με απιονισμένο νερό, 4 φορές σε κάθε κωνική φιάλη

- Καλλιέργεια μίας ποσότητας του διηθούμενου υγρού στο θρεπτικό DSZM 453, με αραιώσεις 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}
- Πλύσιμο των συλλεγμένων μικροπλαστικών σε διάλυμα 2g SDS (sodium dodecyl sulfate) σε 100ml ddl ώστε να επιτευχθεί η απομάκρυνση του δημιουργηθέντος βιοφίλμ από την επιφάνεια των μικροπλαστικών.
- Πλύση των συλλεγμένων μικροπλαστικών σε διάλυμα Tween 80 (δύο φορές) , 3 σταγόνες σε 100ml ddl.
- Εμβάπτιση των μικροπλαστικών σε απιονισμένο νερό ddl (τρεις φορές)
- Εμβάπτιση των μικροπλαστικών σε καθαρή αιθανόλη (δύο φορές)
- Ξήρανση μικροπλαστικών για 5 ημέρες στους 37°C.
- Ζύγιση ξηρού βάρους μικροπλαστικών μέσα στα φίλτρα

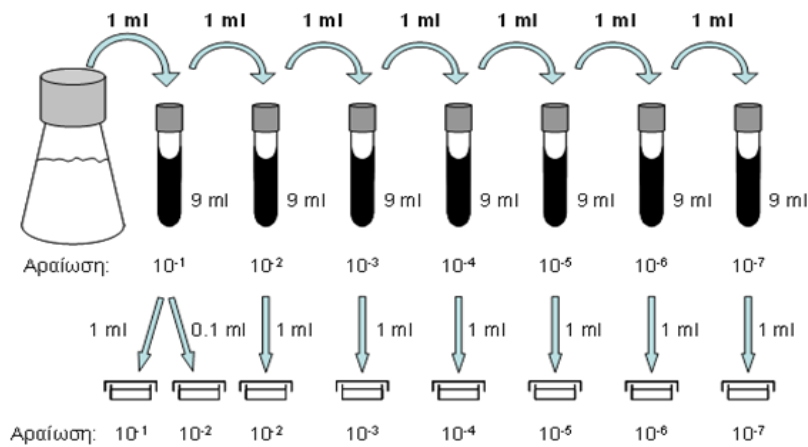
Κατά τη δειγματοληψία του πρώτου μήνα τα συλλεγμένα μικροπλαστικά πλύθηκαν με διάλυμα SDS. Χρειάστηκαν τέσσερις επαναλήψεις ώστε να αποκολληθεί το σχηματισμένο βιοφίλμ από τα μικροπλαστικά. Ακόμη χρειάστηκαν αρκετές πλύσεις με νερό κι αιθανόλη ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το υπόλειμμα του SDS. Συγκρίνοντας τα δύο απορρυπαντικά καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως το διάλυμα Tween 80 ήταν πιο αποτελεσματικό στην απομάκρυνση του βιοφίλμ.

Η διαφορά μεταξύ του τελικού αυξημένου (φίλτρο+μικροπλαστικά) και του αρχικού βάρους στα φίλτρα, θεωρείται ότι είναι το βάρος των μικροπλαστικών που περιέχονται σε κάθε φιάλη. Αυτό το βάρος στη συνέχεια αφαιρέθηκε από το αρχικό βάρος των μικροπλαστικών που εισήχθησαν στις κωνικές φιάλες, δίνοντας μια εκτίμηση της βιοαποδόμησης.

2.2.5. Εκτίμηση του πληθυσμού των μικροβιακών κοινοτήτων

Η εκτίμηση του θαλάσσιου μικροβιακού πληθυσμού βασίστηκε στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και σχηματίζει μια ορατή αποικία.

Ακολούθησε η εκτέλεση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων. Το διηθούμενο υγρό , ομογενοποιήθηκε και δημιουργήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις. Όπως φαίνετε στο παρακάτω σχήμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, μετά από επιτυχή αραιώση , περιέχεται μόνο το ένα δέκατο των κυττάρων σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο δοκιμαστικό σωλήνα. Κατόπιν δείγματα από κάθε αραιώση εμβολιάστηκαν σε τριβλία Petri όπου σχηματίστηκαν αποικίες κι ήταν δυνατή η καταμέτρησή τους τέσσερις μέρες μετά.



Εικόνα 13: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (πηγή : <http://slideplayer.gr>)

Το αποτέλεσμα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU) mL^{-1} δείγματος.

2.2.6. Μετρήσεις εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών.

Η παρουσία εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων (EPS), έχει επιβεβαιωθεί και παρατηρηθεί με τη χρήση διαφόρων τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, σε καθαρές καλλιέργειες, ενεργοποιημένη λάσπη, κοκκώδη ιλύ και βιοφίλμ. Τα εξωκυτταρικά πολυμερή (Extracellular Polymeric Substances, EPS) είναι κυρίως οι εκκρίσεις υψηλού μοριακού βάρους από μικροοργανισμούς και τα προϊόντα κυτταρικής λύσης και υδρόλυσης των μακρομορίων. Σύμφωνα με τους Nielsen και Jahn (1999), τα EPS αποτελούνται από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, χουμικές ουσίες, DNA και RNA. Τα EPS μπορούν να ταξινομηθούν στα διαλυτά EPS (soluble EPS - sEPS) και στα δεσμευμένα EPS (bound EPS - bEPS). (More et al., 2014; Sheng et al., 2010). Τα δεσμευμένα EPS είναι στενά συνδεδεμένα με τα κύτταρα, ενώ τα διαλυτά EPS είναι ασθενώς δεσμευμένα με τα κύτταρα ή διαλύονται εντός του διαλύματος. Τα διαλυτά EPS έχουν ένα μεγαλύτερο κλάσμα πρωτεϊνών από ό, τι τα δεσμευμένα EPS (Marvasi, 2010).

2.2.6.1. Μετρήσεις ολικών πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο, άζωτο και θείο. (<https://el.wikipedia.org>).

Η μέτρηση του ποσού των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαλυμάτων Lowry-Folin. Η μέθοδος Lowry είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ποσοτική μέθοδος για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα

(Lowry et al., 1951). Βασίζεται στον σχηματισμό σε αλκοολικό περιβάλλον, ενός συμπλόκου (που έχει σκούρο μπλε χρώμα), μεταξύ του χαλκού και δομών που διαθέτουν περισσότερους από δυο πεπτιδικούς δεσμούς. Κατά τη διαδικασία κατασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα Α(V=500ml): 2,8598g NaOH + 14,3084g Na₂CO₃

Διάλυμα Β(V=100ml): 1,4232g CuSO₄·5(H₂O)

Διάλυμα Γ(V=100ml): 2,85299g Na₂Tartrate·2(H₂O)

Διάλυμα Lowry: Διάλυμα Α + Διάλυμα Β + Διάλυμα Γ σε αναλογία 100:1:1

Διάλυμα Folin: 5ml Folin + 6 ml απιονισμένο νερό

Σε κενά φιαλίδια τοποθετήθηκαν 0,5ml από το διηθημένο κλάσμα καθώς και 0,7ml διαλύματος Lowry τα οποία αναμιχτήκαν καλά και αποθηκεύτηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα Folin και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν ξανά στο σκοτάδι για διάστημα 30 λεπτών. Τα φιαλίδια ανέπτυξαν ένα θαμπό γαλάζιο χρώμα και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, με τη χρήση του Νόμου Lambert-Beer, στα 750nm.

Για τη καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης (Bovine serum albumin) των 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500μg/ml. Η τελική εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών είναι η εξής :

$$y=0,0045x$$

Η ελάχιστη αποδεκτή απορρόφηση ABS_{min} ορίστηκε στα 0,450 και μέγιστη ABS_{max} στα 0,675.

2.2.6.2. Μετρήσεις ολικών υδατανθράκων

Η ολική ποσότητα πολυσακχαριτών στο δείγμα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Anthron η οποία είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος με σχετική έλλειψη ευαισθησίας στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Το πρώτο βήμα στη μέτρηση των συνολικών υδατανθράκων είναι η υδρόλυση των πολυσακχαριτών και η αφυδάτωση των μονομερών (πέψη με προσθήκη θεικού οξέος και θερμική επεξεργασία). Τα σάκχαρα 5-άνθρακα (πεντόζης) και 6-άνθρακα (εξόζης) μετατρέπονται σε φουρφοουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφοουράλη, αντίστοιχα. Η ανθρόνη (μια αρωματική ένωση), αντιδρά με αυτά τα προϊόντα πέψης και δίνει μια έγχρωμη ένωση. (Gerhardt et al. 1994). Κατά τη διαδικασία παρασκευαζόταν το διάλυμα ανθρακενόνης καθώς και το διάλυμα θεικού οξέος (75%) από την προηγούμενη ημέρα.

Η ποσότητα των συνολικών υδατανθράκων στο δείγμα υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα γλυκόζης των 0.1, 0.5, 1, 5, 8, 10, 15, 20μg/ml. Η

τελική εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών υδατανθράκων είναι η εξής :

$$y=0,0021x + 0,0312$$

2.2.7. Μέτρηση υψηλής ευαισθησίας της κατανομής μεγέθους νανοσωματιδίων.

Για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών διασποράς των μικροπλαστικών σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SALD-7500nano. Στο σύστημα εισήχθησαν 5ml από κάθε δείγμα. Το σύστημα παρέχει μέτρηση ακριβείας και υψηλής ευαισθησίας σε μικρο και νανοσωματίδια. Μπορούν να μετρηθούν δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης κάτω από 1 ppm καθώς και μικρές ποσότητες δείγματος. Με το σύστημα αυτό έγινε δυνατή η αξιολόγηση των, μη ορατών με γυμνό μάτι, μικροπλαστικών που εμπεριέχονταν στα υπό εξέταση δείγματα. Η κλίμακα μέτρησης ορίστηκε από τα 0,005 μm έως 50 μm . Το σύστημα εμφάνισε στοιχεία για τη κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών που εξετάζονται κατά ποσότητα και όγκο σε πραγματικό χρόνο.



Εικόνα 14:Μηχάνημα μέτρησης Διασποράς μεγέθους πλαστικών (πηγή: <http://www.shimadzu.com>)

2.2.8. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier

Το αποτύπωμα των κορυφών απορρόφησης ενός δείγματος, μοιάζει με τις συχνότητες των μεταβολών μεταξύ των δεσμών των ατόμων που συνθέτουν το υλικό. Επειδή κάθε διαφορετικό υλικό είναι ένας μοναδικός συνδυασμός ατόμων, δύο ενώσεις δεν παράγουν το ίδιο ακριβώς υπέρυθρο φάσμα. Επιπλέον, το μέγεθος των κορυφών στο φάσμα είναι μια άμεση ένδειξη της ποσότητας του υπάρχοντος υλικού. Η μέθοδος φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό άγνωστων

υλικών, προσδιορίζοντας την ποιότητα ή τη συνοχή ενός δείγματος και την ποσότητα συστατικών σε ένα μείγμα. Η φασματοσκοπία απορρόφησης με υπεριώδη και ορατή (UV-Vis) είναι η μέτρηση της εξασθένησης μίας φωτεινής δέσμης αφού περάσει από ένα δείγμα ή μετά από ανάκλαση από μια επιφάνεια δείγματος. Στην περίπτωση του φάσματος UV-Vis, λαμβάνεται υπόψη μόνο η απορρόφηση του φωτός από την ύλη, επειδή το φως είναι μια μορφή ενέργειας και η απορρόφηση του φωτός από την ύλη προκαλεί την αύξηση του ενεργειακού περιεχομένου των μορίων ή των ατόμων. Όταν το φως διέρχεται από την ένωση, η ενέργεια από το φως χρησιμοποιείται για την προώθηση ενός ηλεκτρονίου από μια τροχιά σύνδεσης ή μη σύνδεσης σε ένα από τα κενά αντιδραστικά τροχιακά που είναι η αιτία να εμφανιστούν οι κορυφές των ενώσεων. (Ashraf)

Η ανάλυση των χαρακτηριστικών ομάδων στην επιφάνεια των δειγμάτων του HDPE πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου υπερύθρου (Frontier FT-IR spectrometer, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), ενώ τα φάσματα ελήφθησαν και υπέστησαν επεξεργασία με το λογισμικό Spectrum της PerkinElmer. Η ανάλυση σάρωσης (scan resolution) ορίστηκε στα 4cm^{-1} για τιμές απορρόφησης από $4000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$.

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανάλυση υποβάθρου (background scan) για τον ατμοσφαιρικό αέρα και οι τιμές των κορυφών των δειγμάτων λαμβάνονταν μετά από διόρθωση με βάση τις κορυφές του αέρα (baseline correction).



Εικόνα 15: Φασματόμετρο υπερύθρου

Λόγω της μορφής των δειγμάτων, δεν ήταν δυνατή η άμεση εισαγωγή τους στο όργανο. Για το λόγο αυτό τα δείγματα ενσωματώνονταν σε δισκία από βρωμιούχο κάλλιο (KBr) πριν πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις. Το KBr λειτουργεί σαν ένα μη απορροφητικό πρότυπο αναφοράς, ενώ πραγματοποιείται διόρθωση για την παρουσία του από το όργανο, πριν από την εμφάνιση των φασμάτων.

Πριν από την προετοιμασία κάθε δείγματος, ο εξοπλισμός καθαριζόταν με ακετόνη, για την απομάκρυνση τυχόν ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Με μια μικρή σπάτουλα εργαστηρίου, ένα τμήμα του δείγματος (3-5 mg) τοποθετούνταν στο γουδί και στη συνέχεια προστίθετο ποσότητα βρωμιούχου καλλίου (KBr) τέτοια, ώστε να είναι αρκετή η παρασκευή 2-3 δισκίων πάχους 1-2 mm και διαμέτρου περίπου 1 cm. Με το γουδοχέρι πραγματοποιούνταν ισχυρή ανάμιξη, για τη θραύση και την ομογενοποίηση του

μίγματος. Η ανάμιξη αυτή έπρεπε να λαμβάνει χώρα σε μικρό χρονικό διάστημα, γιατί το KBr αποτελεί υγροσκοπική ουσία και έχει την τάση να απορροφά νερό από την ατμόσφαιρα και να αλλοιώνεται, προκαλώντας στη συνέχεια σφάλματα στην ανάλυση.

Μέρος του μίγματος τοποθετούνταν μεταξύ μεταλλικών κυλίνδρων καθαρισμένων με ακετόνη στο εσωτερικό αντλιοπρέσας (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Αντλιοπρέσα.

Το δείγμα στερεώνονταν με τη βοήθεια βαλβίδας στο πλάι της πρέσας και η αντλία ενεργοποιούνταν για 2 min, ώστε να επιτευχθούν συνθήκες κενού. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, με τη βοήθεια μοχλού ασκούνταν πίεση ίση με 5 ton, που ελέγχονταν από μανόμετρο. Η αντλία λειτουργούσε υπό κενό και πίεση για 5 min και στη συνέχεια απενεργοποιούνταν και το δείγμα απομακρύνονταν.

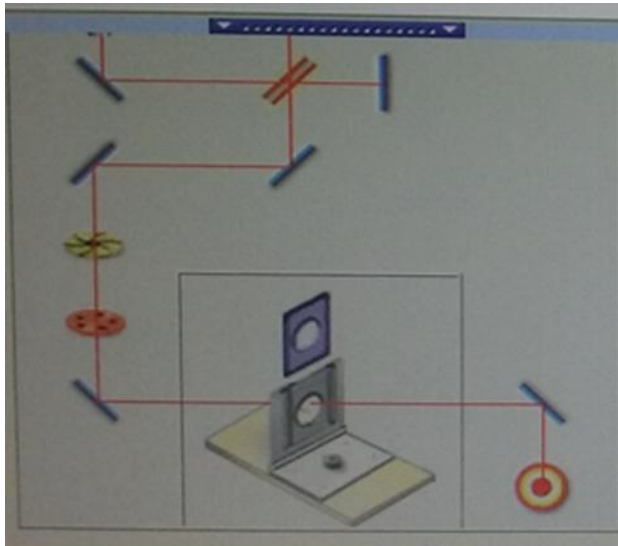
Το δείγμα αφαιρούνταν από την αντλιοπρέσα και είχε τη μορφή διάφανου δισκίου, ενδεχομένως με μικρές άσπρες κηλίδες, σε περιπτώσεις που το μίγμα δεν είχε ομογενοποιηθεί πολύ καλά. Αν το δισκίο είχε ορατές ατέλειες, προετοιμάζοταν ξανά. Τα δισκία τοποθετούνταν στο ειδικό εξάρτημα και εισάγονταν στο όργανο για την πραγματοποίηση των μετρήσεων (εικόνες 17 έως 19).



Εικόνα 17: Εξάρτημα φασματοφωτόμετρου για εισαγωγή δειγμάτων σε μορφή δισκίου



Εικόνα 18: Υποδοχή φασματοφωτόμετρου για εισαγωγή δειγμάτων.



Εικόνα 19: Διάταξη φασματοφωτόμετρου υπερύθρου.

Στο τέλος της διαδικασίας εξάγονται τα φάσματα απορρόφησης των δειγμάτων και γίνεται μέτρηση των εμβαδών των κορυφών που σχηματίζονται και εκφράζονται ως δείκτες

καρβονυλίου, υδροξυλίου , διπλών δεσμών και βινυλίου (Andrady, 2017). Οι δείκτες υπολογίζονται ως εξής :

Δείκτης δεσμού Κετο-καρβονυλίου (Keto-Carbonyl Index) KCBI = $A_{(1715)} / A_{(1465)}$

Δείκτης δεσμού εστέρα-καρβονυλίου ECBI = $A_{(1740)} / A_{(1465)}$

Δείκτης δεσμών βινυλίου (vinyl bond index) VBI= $A_{(1650)} / A_{(1465)}$

Δείκτης εσωτερικών διπλών δεσμών IDBI = $A_{(908)} / A_{(1465)}$

Στη παρούσα διπλωματική εξετάστηκε ο δείκτης δεσμού Κετο-καρβονυλίου και ο δείκτης δεσμών βινυλίου όπου οι τιμές των κορυφών των απορροφήσεων (A) έπεφταν στα κατάλληλα μήκη κύματος .

Ακόμη γίνεται έμμεση μέτρηση του ποσοστού κρυσταλλικότητας της επιφάνειας του πολυμερούς . Ο υπολογισμός γίνεται με τον εξής τύπο :

$\% \text{ crystallinity} = 100 - [1 - (I_a(1,233 \cdot I_b) / 1 + (I_a / I_b)) * 100]$

Όπου I_a είναι η απορρόφηση στο 1473 ή 729 μήκος κύματος και I_b είναι η απορρόφηση στο 1463 ή 719 μήκος κύματος . (Zerbi et al., 1989)

2.2.9. Ανάλυση Δεδομένων

Όλοι οι υπολογισμοί και συγκρίσεις έγιναν με χρήση του προγράμματος Excel και αφορούν την ανάπτυξη των μικροβιακών πληθυσμών, τα βάρη μικροπλαστικών, τις ολικές πρωτεΐνες και υδατάνθρακες.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η **μέθοδος Mann Whitney** για Excel. Πρόκειται για μη παραμετρικό έλεγχο της ισότητας δύο μέσων μεταξύ ανεξάρτητων δειγμάτων, τα οποία δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Το κριτήριο Mann-Whitney είναι ένας βαθμολογικός έλεγχος που εξετάζει την υπόθεση ότι το άθροισμα των βαθμών των θέσεων των παρατηρήσεων του ενός δείγματος είναι ίσο με το άθροισμα των βαθμών των θέσεων των παρατηρήσεων του άλλου δείγματος κι είναι τόσο αποτελεσματικό όσο το κριτήριο t-Test σε κανονικοποιημένα δείγματα. Εάν η υπόθεση ότι τα αθροίσματα είναι ίσα δεν απορριφθεί, τότε συνεπάγεται ότι η κατανομή των παρατηρήσεων της μιας ομάδας είναι σχεδόν ίδια με την κατανομή της άλλης. Όταν η τιμή $p\text{-value} > 0,05$ (επίπεδο 5%) τότε δεν μπορώ να ισχυριστώ πως τα δείγματά διαφέρουν .

P-value: Η τιμή σημαντικότητας ($p\text{-value}$) ορίζεται ως η πιθανότητα της απόκτησης ενός αποτελέσματος ίσου ή "πιο ακραίου" από ότι ήταν στην πραγματικότητα παρατηρήσιμο, όταν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής . Αντιπροσωπεύει έναν δείκτη της αξιοπιστίας του αποτελέσματος. Ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται όταν το $p\text{-value}$ είναι μικρότερο από το επίπεδο σημαντικότητας α . (<https://el.wikipedia.org>)

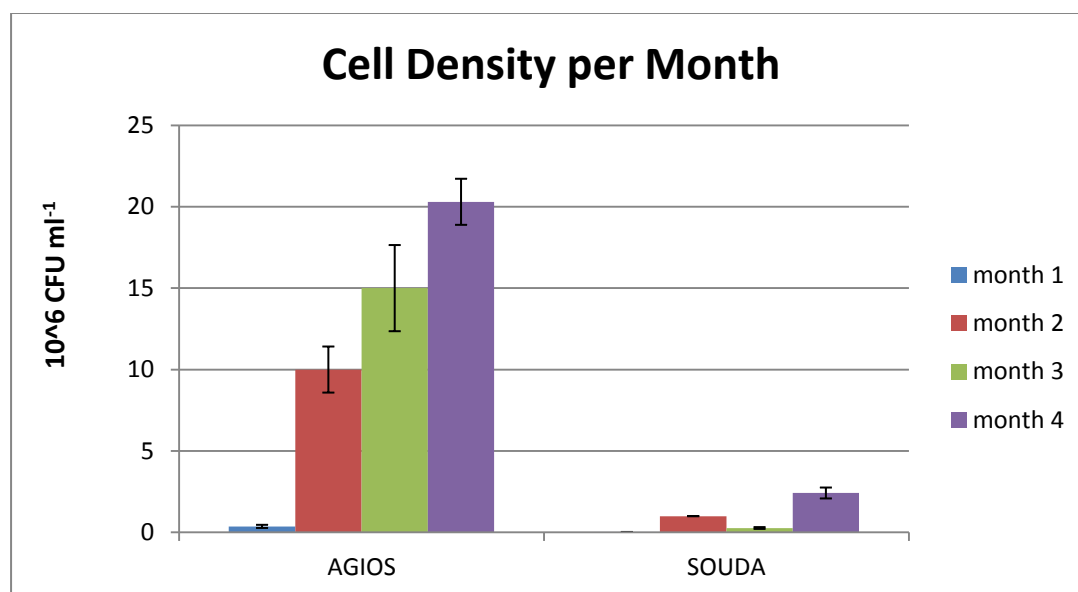
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συμβολή βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων οδηγεί στη δημιουργία μικροπλαστικών στην επιφάνεια του ωκεανού. Για να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος των βιοτικών μηχανισμών, διεξήχθη πείραμα στο οποίο διερευνάται η ικανότητα δύο θαλάσσιων κοινοτήτων να αποδομήσουν δευτερογενή HDPE μικροπλάστικά κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

3.1. Βακτηριακές Κοινότητες

Οι δυο αυτόχθονες θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες που μελετήθηκαν προέρχονται από τη πελαγική ζώνη του κόλπου της Σούδας και του Αγίου Ονουφρίου. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης του βακτηριακού πληθυσμού διεξήχθη με έκχυση 100μl από κάθε υγρή καλλιέργεια ξεχωριστά σε τριβλία petri με θρεπτικό DZM 453. Μετά από μια περίοδο επώασης 96 ωρών, παρατηρήθηκαν μικρές, κυκλικές, κυρτές και ημιδιαφανείς αποικίες στα τριβλία.

Στη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ κάθε υγρής καλλιέργειας, τις πρώτες μέρες κάθε μήνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2



Διάγραμμα 2: Μικροβιακή ανάπτυξη μικροβιακής κοινότητας Αγίου και Σούδας στο διάστημα 4 μηνών.

Ο πληθυσμός των δύο κοινοτήτων αυξήθηκε με τη πάροδο του χρόνου. Στη δειγματοληψία του πρώτου μήνα η συγκέντρωση των κυττάρων για τη κοινότητα 'Agios' έφτασε τα $3,7 \cdot 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ και για τη κοινότητα 'Souda' τα $0,2 \cdot 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Στη δειγματοληψία του τέταρτου μήνα ο πληθυσμός των κυττάρων της κοινότητας 'Agios' άγγιξε τα $20,3 \cdot 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ενώ της κοινότητας 'Souda' τα $2,42 \cdot 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ελέγχοντας τα αποτελέσματα ανάπτυξης των δύο αυτών κοινοτήτων με το μή παραμετρικό έλεγχο Mann Whitney

εξηγήθηκαν τα εξής αποτελέσματα. Οι δύο βακτηριακές κοινότητες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη πορεία ανάπτυξης που ακολουθούν. Παρουσιάζεται αυξητική τάση και στις δύο όμως η κοινότητα 'Agios' έχει αναπτυχθεί περισσότερο στο διάστημα των τεσσάρων μηνών σε σύγκριση με τη κοινότητα 'Souda'. Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση εμβολιασμού (10^5 κύτταρα mL^{-1}) με τη μικρότερη συγκέντρωση που μετρήθηκε στη δειγματοληψία του πρώτου μήνα (αφορά τη κοινότητα 'Agios', 0.37×10^6 κύτταρα mL^{-1}) παρατηρούμε πως δεν υπήρξε κάποια μείωση στο πληθυσμό των κυττάρων της βακτηριακής κοινότητας.

3.2. Προσδιορισμός Εξωτερικών Πολυμερών EPS

Οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά των EPS. Στη μελέτη αυτή μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των ολικών πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, των διαλυτών EPS. Τα EPS θεωρούνται σημαντικοί μεσολαβητές στην προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες. Αυτά εμπλέκονται στη διεργασία προσκόλλησης κατά το σχηματισμό βιοφίλμ και στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των βιοφίλμ και επομένως στη συνολική σταθερότητα των κοινοτήτων βιοφίλμ (Shi et al., 2017). Τα EPS συνδέονται με τα κύτταρα μέσω πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ώστε να σχηματίσουν μια δικτυωτή δομή με περίσσεια νερού που προστατεύει τα κύτταρα από την αφυδάτωση και την επίδραση τοξικών ουσιών. Μέρος των EPS μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγή ενέργειας σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Έχουν σημαντική επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροβιακών συσσωματωμάτων, όπως στην δομή, το επιφανειακό φορτίο, την κροκίδωση, τις ιδιότητες καθίζησης, τις ιδιότητες αφυδάτωσης και την ικανότητα απορρόφησης. (Shi et al., 2017). Τα EPS αποτελούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα βιοφίλμ, με μορφή γέλης, ιδιαίτερα ενυδατωμένο και συχνά φορτισμένο, στο οποίο οι μικροοργανισμοί ενσωματώνονται και ακινητοποιούνται. Το ποσοστό των EPS στα βιοφίλμ κυμαίνεται στα 50 - 90% της συνολικής οργανικής ύλης (Nielsen et al., 1999).

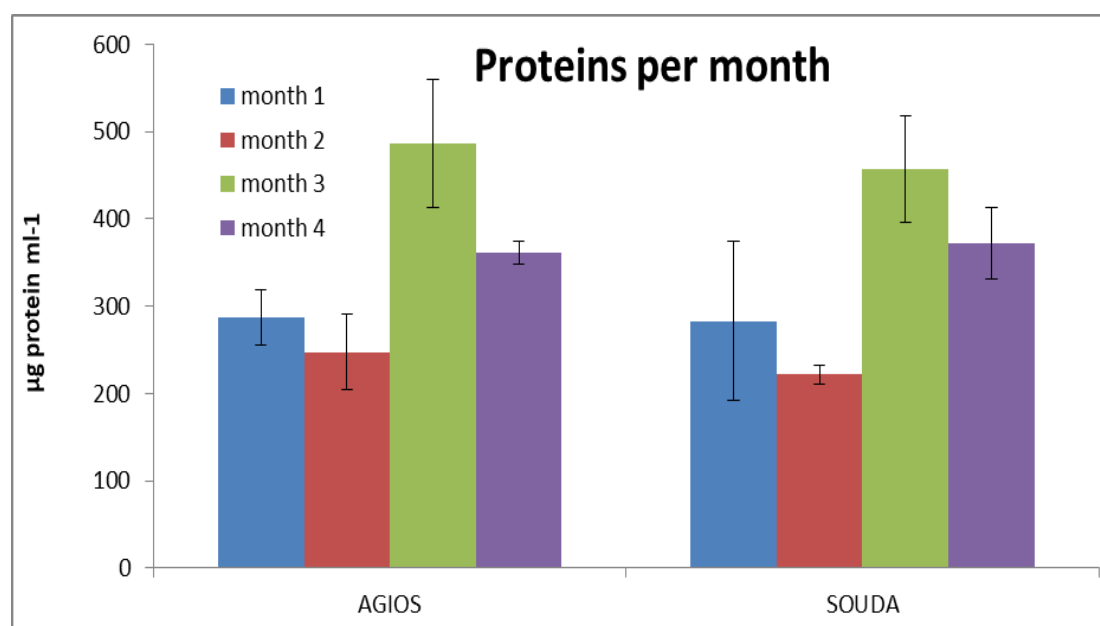
3.2.1. Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών.

Τα EPS περιέχουν μια σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών ως ένζυμα, δομικές πρωτεΐνες καθώς και ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση των EPS. Τα EPS θεωρούνται επίσης σημαντικοί μεσολαβητές στην προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες. Αυτά εμπλέκονται στη διεργασία προσκόλλησης κατά το σχηματισμό βιοφίλμ και στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των βιοφίλμ και επομένως στη συνολική σταθερότητα των κοινοτήτων βιοφίλμ (Marvasi, 2010). Η υδροφοβικότητα και το επιφανειακό φορτίο είναι σημαντικά στοιχεία για τη περιγραφή της προσκόλλησης των μικροοργανισμών σε ένα υπόστρωμα (Shi et al., 2017). Τα EPS σε μικροβιακά συσσωματώματα έχουν πολλές φορτισμένες ομάδες (π.χ., καρβοξύλια, φωσφορικές ομάδες, σουλφυδρύλια, φαινολικές και ομάδες υδροξυλίου) και μη πολικές ομάδες (π.χ., αρωματικά, αλειφατικές ενώσεις πρωτεϊνών και υδρόφοβα τμήματα υδατανθράκων). Ο σχηματισμός των υδρόφοβων

περιοχών των EPS είναι σημαντικός για την προσρόφηση οργανικών ρύπων. Η παρουσία υδρόφιλων και υδρόφοβων ομάδων στα μόρια EPS δείχνει ότι αυτά είναι επαμφοτερίζοντα. Η σχετική αναλογία των δύο αυτών ομάδων σχετίζεται με τη σύνθεση των EPS. Οι Jorand et al. (1998) που χρησιμοποίησαν ρητίνη ΧΑΔ για το διαχωρισμό των υδρόφιλων και υδρόφοβων κλασμάτων EPS, διαπίστωσαν ότι περίπου το 7% ήταν υδρόφοβο και περιελάμβανε κυρίως πρωτεΐνες, ενώ το υδρόφιλο κλάσμα αποτελούνταν κυρίως από υδατάνθρακες. Η ανάλυση του περιεχομένου των μονοσακχαριτών και των αμινοξέων σε EPS αποκάλυψε μετά από υδρόλυση, ότι περίπου το 25% των αμινοξέων ήταν αρνητικά φορτισμένα και περίπου 24% ήταν υδρόφοβα (Shi et al., 2017). Καταδεικνύει, επίσης, τη σημασία των EPS ως θέσεις προσρόφησης οργανικών ρύπων.(Sheng et al., 2010; Shi et al., 2017).

Η παραγωγή των EPS εξαρτάται αρχικά από τον τύπο του υποστρώματος και τη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Τα EPS μπορούν να αποδομηθούν από βακτήρια και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας όταν υπάρχει έλλειψη υποστρώματος. Τα θρεπτικά συστατικά έχουν σημαντική επίδραση στην παραγωγή EPS και τη σύνθεση τους. Το περιεχόμενο των EPS αυξάνεται αναλογικά με αύξηση της τροφής στους μικροοργανισμούς. Οι αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες, επίσης, μπορούν να επηρεάσουν τη παραγωγή EPS (Sheng et al., 2010).

Η μέτρηση του ποσού των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαλυμάτων Lowry-Folin με τη μέθοδο Lowry. Η περιεκτικότητα του διηθούμενου υγρού σε πρωτεΐνες υπολογίστηκε σε όλη την πειραματική περίοδο, διάγραμμα 3.



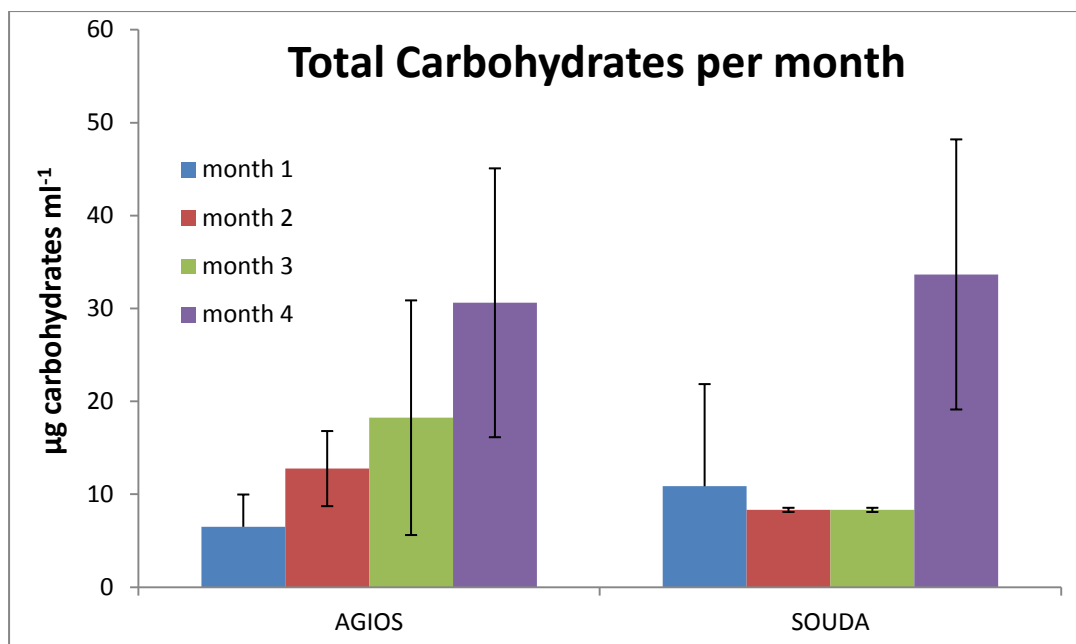
Διάγραμμα 3: Μεταβολή Ολικών Πρωτεϊνών (μg/ml) ανά μήνα

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών της βακτηριακής κοινότητας 'Agios' κατά τη δειγματοληψία του πρώτου μήνα μετρήθηκε στα $287,41 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ενώ της κοινότητας 'Souda' στα $283,16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Το δεύτερο μήνα παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών ενώ το τρίτο μήνα μετρήθηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών για τις δύο κοινότητες στα $485,73 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ για τη κοινότητα 'Agios' και στα $457,78 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ για τη κοινότητα 'Souda'. Το τέταρτο μήνα η συγκέντρωση μειώθηκε σε σύγκριση με το τρίτο μήνα, παρέμεινε όμως μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πρώτου μήνα. Το μοτίβο εξέλιξης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι το ίδιο για της δύο μικροβιακές κοινότητες κι αυτό επιβεβαιώνεται με τη στατιστική σύγκριση με χρήση του μοντέλου Mann Whitney. Σύμφωνα με το μή παραμετρικό στατιστικό έλεγχο κατά Mann Whitney τα αποτελέσματα των δύο βακτηριακών κοινοτήτων δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο διάστημα 1^{ου} με 2^{ου} μήνα μειώθηκε οριακά και στις δύο κοινότητες. Αυτή η αλλαγή πιθανώς να οφείλετε στις ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούν. Κατά τη διάρκεια του τρίτου μήνα ο αριθμός των ολικών πρωτεϊνών στη κοινότητα Agios έφτασε τα $485,73 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ και η κοινότητα τη Souda τα $457,78 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Η αύξηση αυτή πιθανός να οφείλεται στην αύξηση της επιφάνειας υποστρώματος λόγω θρυμματισμού των μικροπλαστικών του δείγματος, που αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των EPS. Το πολυαιθυλένιο χρησιμεύει ως πηγή άνθρακα και ως υπόστρωμα στους μικροοργανισμούς. Δεδομένου ότι η επιφάνεια του πολυαιθυλενίου είναι υδρόφοβη από τη φύση του, έχει προταθεί ότι όσο περισσότερο υδρόφοβη είναι η κυτταρική επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερη είναι η αλληλεπίδραση με το πολυαιθυλένιο ((Orr et al., 2004)

3.2.2. Προσδιορισμός Υδατανθράκων

Η ολική ποσότητα υδατανθράκων στο δείγμα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Anthron η οποία είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος με σχετική έλλειψη ευαισθησίας στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Στο διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η μεταβολή τους σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



Διάγραμμα 4: Μεταβολή Ολικών Υδατανθράκων (μg/ml) ανά μήνα

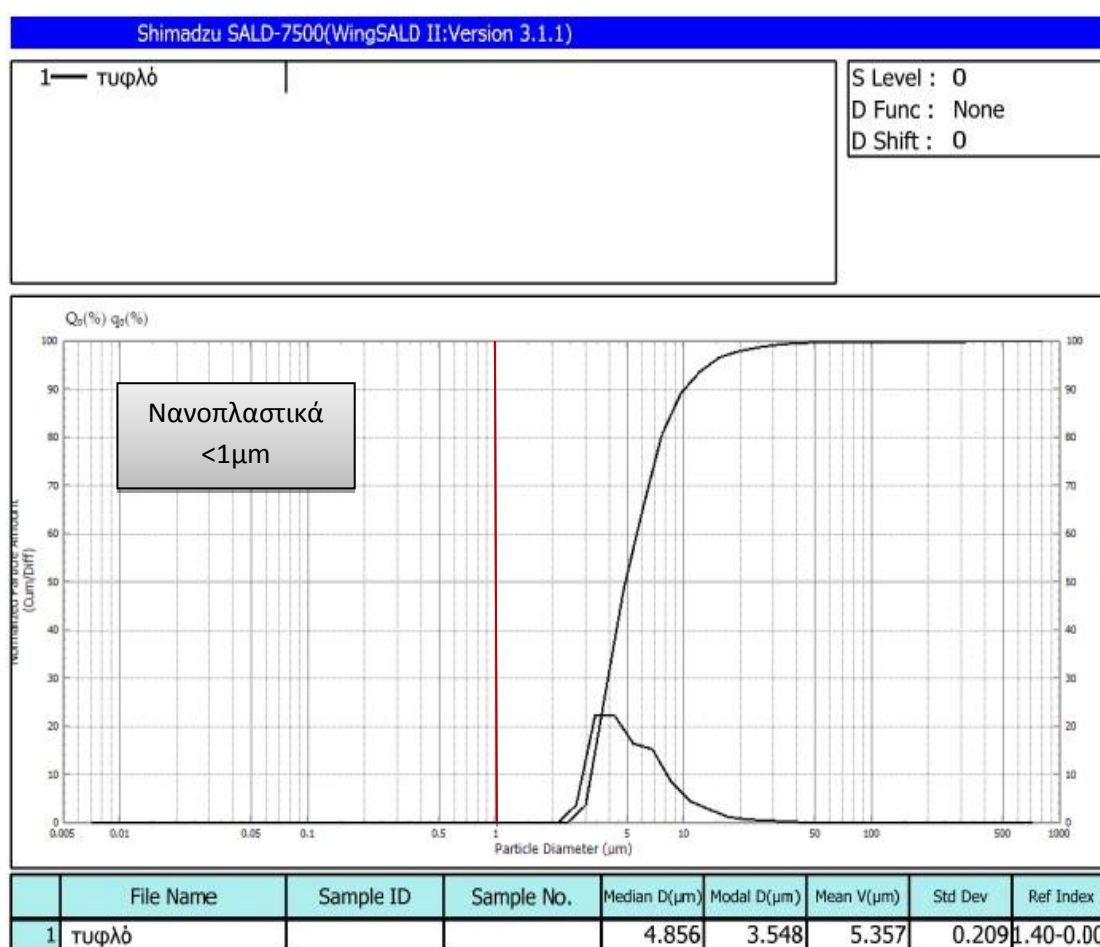
Η συγκέντρωση των ολικών υδατανθράκων αυξήθηκε και στις δύο κοινότητες. Στη κοινότητα 'Agios' η συγκέντρωση των ολικών υδατανθράκων αυξάνεται συνεχώς κατά τη περίοδο των τεσσάρων μηνών. Η αρχική συγκέντρωση μετρήθηκε στα $6,49 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ και η συγκέντρωση του τέταρτου μήνα στα $30,61 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Παρομοίως η κοινότητα 'Souda' παρουσίασε αυξητική τάση στη συγκέντρωση των ολικών υδατανθράκων από τα $10,86 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ το πρώτο μήνα στα $33,66 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ στη τελευταία δειγματοληψία. Όμως το δεύτερο και παρουσιάστηκε μικρή μείωση στη συγκέντρωση η οποία παρέμεινε σταθερή έως το τρίτο μήνα. Σύμφωνα με το στατιστικό έλεγχο κατά Mann Whitney τα δείγματα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Τα εξωκυτταρικά πολυμερή παρουσίασαν αύξητική τάση στη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος, υποδηλώνοντας τον επιτυχή εγκλιματισμό των μικροβιακών κοινοτήτων. Τα εξωκυτταρικά πολυμερή δεν διαφέρουν σημαντικά για τις δυο βακτηριακές κοινότητες. Γενικά ο ρόλος τόσο των πρωτεϊνών όσο και των υδατανθράκων στα εξωκυτταρικά πολυμερή είναι η προσκόλληση και συσσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων καθώς και η προστασία τους από τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Συγκρατούν τα θρεπτικά συστατικά από την υδατική φάση, δημιουργούν ένα προστατευτικό πλέγμα για κατακράτηση νερού και προσρόφηση οργανικών και ανόργανων ενώσεων, δεσμεύουν ενζύμα, δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων και επιτρέπουν στα κύτταρα να λειτουργούν με τρόπο παρόμοιο με τους πολυκύτταρους οργανισμούς (Eriksen et al., 2014; Shi et al., 2017). Αντικρουόμενα αποτελέσματα παρουσιάζονται για την υδροφοβικότητα /υδροφιλικότητα των εξωκυτταρικών ενώσεων. Σύμφωνα με μελέτη σε συγκεκριμένα βακτήρια οι πολυσακχαρίτες βοηθούν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων και στη δημιουργία βιοφίλμ στη υδρόφοβη επιφάνει του πολυαιθυλενίου (Marvasi et al., 2010) ενώ σε άλλη έρευνα προτάθηκε πως το υδρόφοβο κλάσμα των EPS περιελάμβανε κυρίως πρωτεΐνες, ενώ το υδρόφιλο κλάσμα αποτελούνταν κυρίως από υδατάνθρακες (Jorand et al., 1998). Έχοντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στο διηθούμενο υγρό μελέτης και λαμβάνοντας υπόψη έρευνες που υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό

υδρόφοβων επιφανειών υποθέσαμε πως η αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτείνες υποδηλώνει αύξηση της μικροβιακής ικανότητας προσκόλλησης στα μικροπλαστικά. (More et al., 2014; Shi et al., 2017)

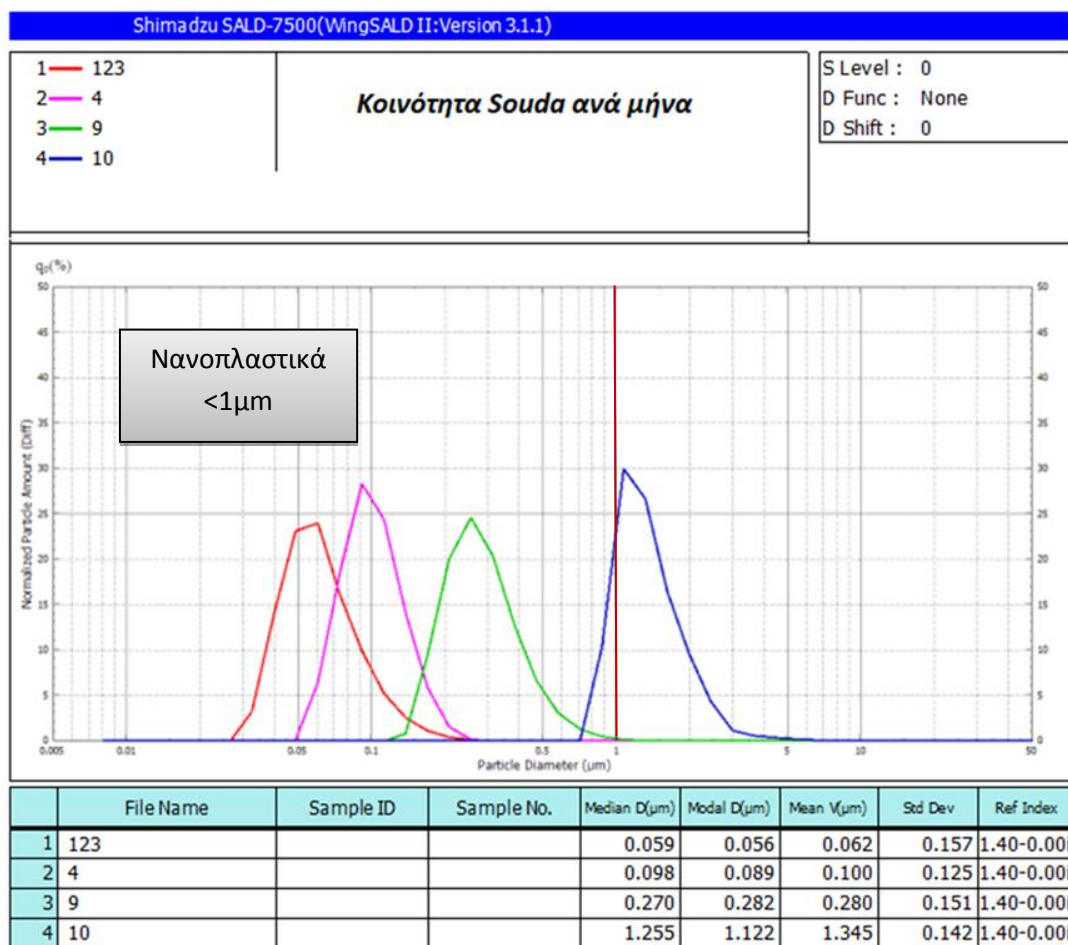
3.3. Κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών στο διηθούμενο υγρό

Το σύστημα SALD-7500nano χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της διακύμανσης διαμέτρου των μικροπλαστικών σε πραγματικό χρόνο. Τα διαγράμματα ποσότητας (number) παρουσιάζουν τη διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών έχοντας μεγάλη ευαισθησία στη συγκέντρωσή των στερεών μικροσωματιδίων, ενώ τα διαγράμματα όγκου (volume) παρουσιάζουν τη διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών έχοντας μεγαλύτερη ευαισθησία στον όγκο των στερεών σωματιδίων που υπάρχουν στο υγρό.



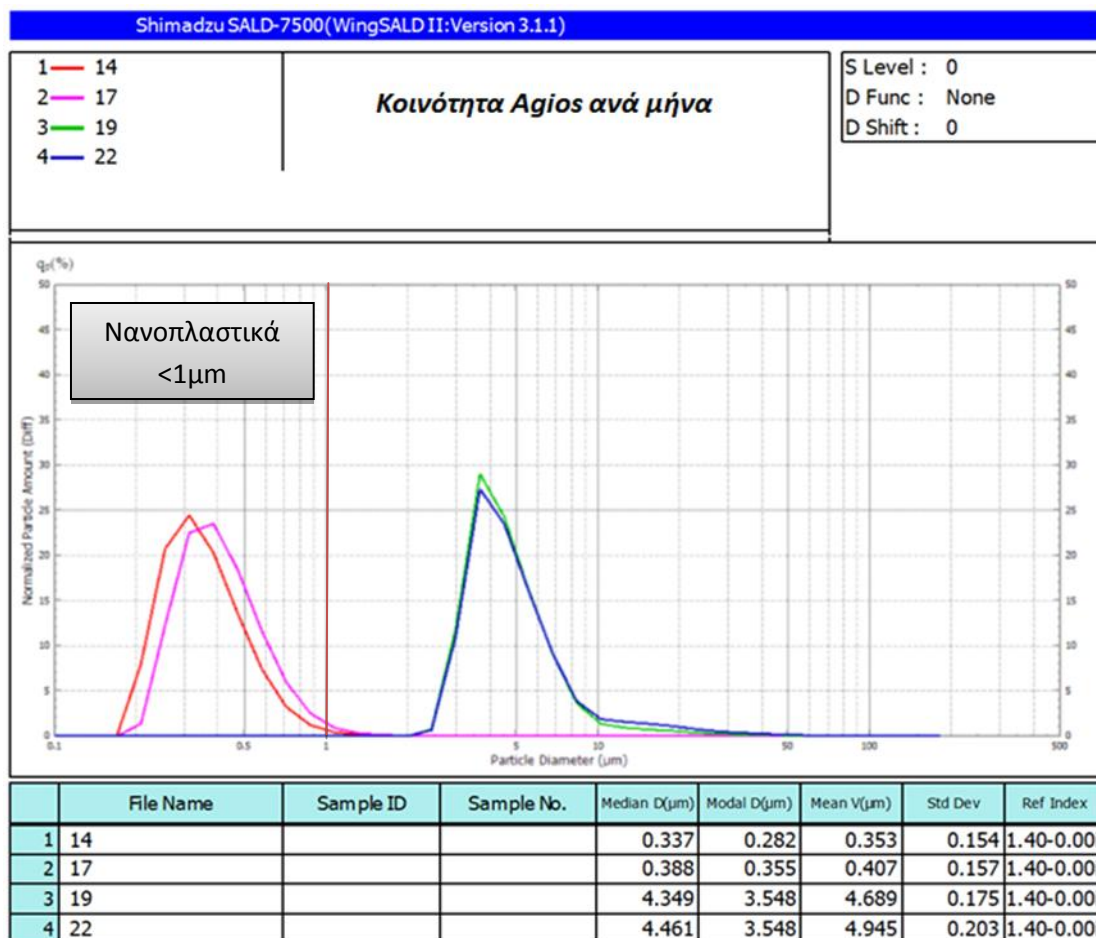
Διάγραμμα(number) 5 : Διασπορά σε υγρό δευτερογενών μικροπλαστικών

Τα φιλμ του πολυμερούς που δέχθηκαν υπεριώδη ακτινοβολία σε διάστημα 5 μηνών, θρυματίστηκαν με άσκηση ήπιας μηχανικής καταπόνησης σε μικροπλαστικά και μοιράστηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 100ml. Ένα φιαλίδιο που δέν εμβολιάστηκε με βακτηριακές κοινότητες αποθηκεύτηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες υπό ανάδευση ώστε να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα ελέγχου. Στο δείγμα ελέγχου που αφορά το χρόνο μηδέν, παρατηρείται η ύπαρξη σωματιδίων με μέση διάμετρο 5,36μm. Κανένα δευτερογενές μικροπλαστικό δεν έχει διάμετρο μικρότερη από 1μm ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.



Διάγραμμα (number) 5: Κατανομή διαμέτρων δευτερογενών μικροπλαστικών βάση της συγκέντρωσής τους ανά μήνα για τη κοινότητα 'Souda'.

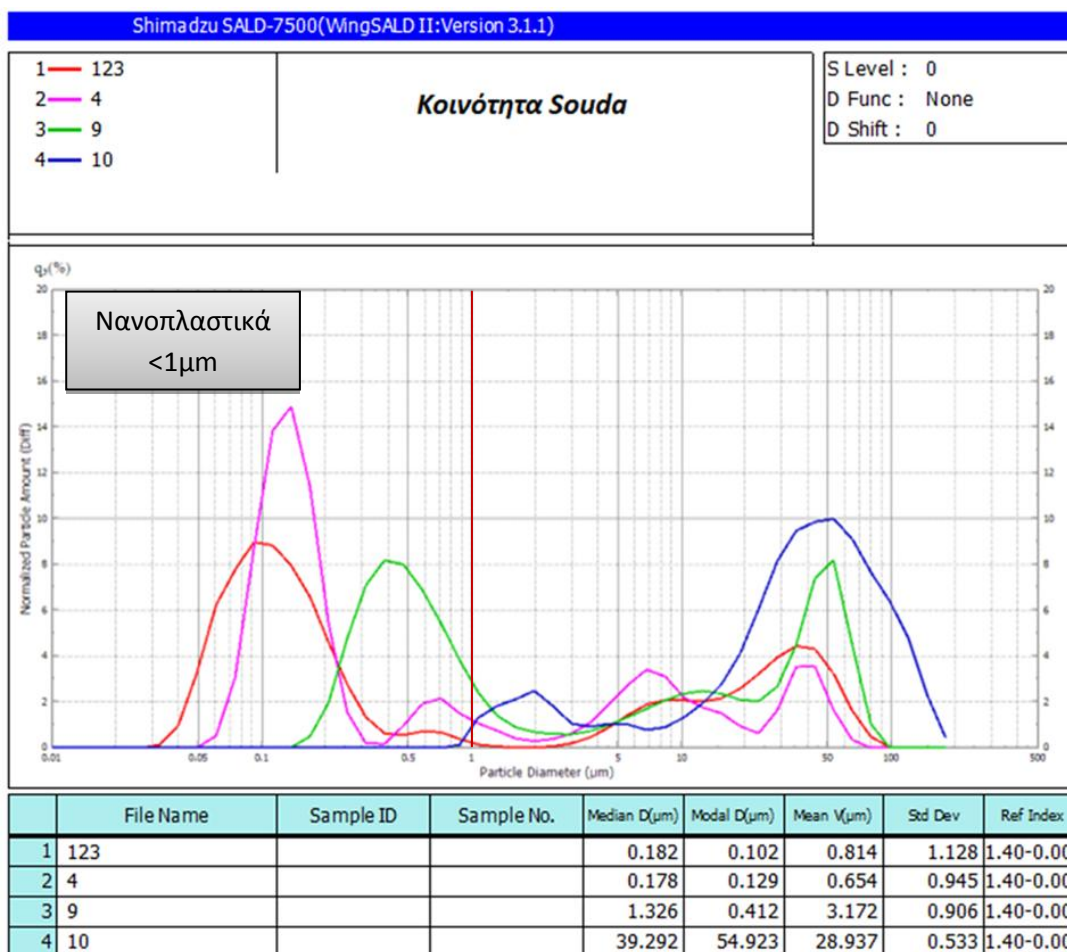
Παρατηρείται πως για τη κοινότητα 'Souda' οι μέσες διαμέτροι των στερεών σωματιδίων αυξάνονται με τη πάροδο των μηνών. Το πρώτο μήνα η μέση διάμετρος μετρήθηκε 0,062μm ενώ το τέταρτο μήνα δειγματοληψίας η μέση διαμετρός ισούται με 1,345μm. Το μέγεθος των θαλάσσιων βακτηρίων κυμαίνεται από 0,5-1,5μm και είναι πιθανό να επηρεάζει τις τιμές του τρίτου και τέταρτου μήνα όπου οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων στη κοινότητα 'Souda' ξεπέρασαν τα $10^5 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Τέλος σύμφωνα με το διάγραμμα για τους τρεις πρώτους μήνες παρουσιάζονται νανοπλαστικά στο διηθούμενο υγρό σε σύγκριση με τον τέταρτο μήνα όπου το μέγεθος των δευτερογενών πλαστικών ανήκει στα μικροπλαστικά.



Διάγραμμα (number) 6: Κατανομή διαμέτρων δευτερογενών μικροπλαστικών βάσει της συγκέντρωσής τους ανά μήνα για τη κοινότητα 'Αγίος'.

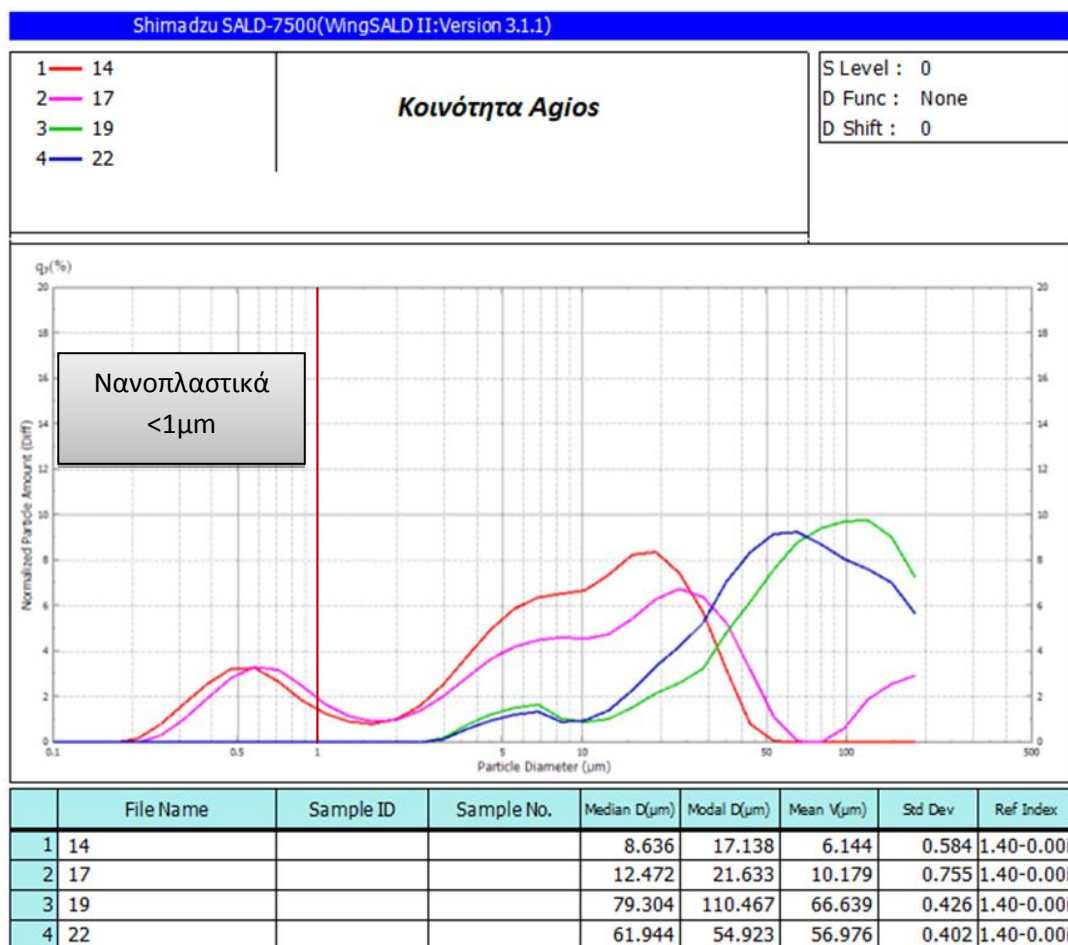
Για τη κοινότητα 'Αγίος' παρατηρείται επίσης μία αύξηση των διαμέτρων των σωματιδίων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι μέσες διαμέτροι των στερεών σωματιδίων αυξάνονται με αρχική μέση διάμετρο του πρώτου μήνα να ισούται με 0,353μm και τελική μέση διάμετρο ίση με 4,954μm. Η κοινότητα 'Αγίος' τον τρίτο και τέταρτο μήνα ξεπέρασε τη συγκέντρωση $10^6 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ κι πιθανός ο αριθμός των βακτηρίων της κοινότητας να επηρεάζει τα αποτελέσματα του διαγράμματος. . Ακόμη σύμφωνα με το διάγραμμα για τους δύο πρώτους μήνες παρουσιάζονται νανοπλαστικά(<1μm) στο διηθούμενο υγρό σε σύγκριση με τον τρίτο και τέταρτο μήνα όπου το μέγεθος των δευτερογενών πλαστικών ανήκει στα μικροπλαστικά.

Οπως αναφέρθηκε κι παραπάνω, στα διαγράμματα (number) παρουσιάζονται τα μικροσωματίδια που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Μέσα στο υποεξέταση υγρό υπάρχουν και μεγαλύτερα σωματίδια τα οποία δεν παρουσιάζονται σε αυτά τα διαγράμματα αλλά στα διαγράμματα διασποράς κατ'όγκο.



Διάγραμμα (volume) 7: Κατανομή διαμέτρων δευτερογενών μικροπλαστικών βάση του όγκου τους ανά μήνα για τη κοινότητα 'Souda'.

Στο διάγραμμα (volume) για τη κοινότητα 'Souda' παρουσιάζεται η διασπορά των πλαστικών σωματιδίων που υπάρχουν στο διηθούμενο υγρό με κριτήριο τον όγκο των σωματιδίων. Παρατηρείται ότι τον πρώτο μήνα η μέση διάμετρος μετρήθηκε στα 0,814μm όπου το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο 0,1μm , το δεύτερο μήνα μετρήθηκε μέση διάμετρος 0,654μm όπου το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε 0,13μm, τον τρίτο μήνα η μέση διάμετρος μετρήθηκε 3,172 και το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο 0,41μm και το τέταρτο μήνα μετρήθηκε μέση διάμετρος στα 28,937μm και το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο στα 52,92 μm. Ομοίως με το διάγραμμα (number) για τη κοινότητα 'Souda', τους τρεις πρώτους μήνες παρουσιάζονται νανοπλαστικά(<1μm) στο διηθούμενο υγρό σε σύγκριση με τον τέταρτο μήνα όπου το μέγεθος των δευτερογενών πλαστικών ανήκει στα μικροπλαστικά.



Διάγραμμα (volume) 8: Κατανομή διαμέτρων δευτερογενών μικροπλαστικών βάση του όγκου τους ανά μήνα για τη κοινότητα 'Αγιος'.

Για τη κοινότητα 'Αγιος' παρατηρείται ότι το πρώτο μήνα η μέση διάμετρος μετρήθηκε στα 6,144μm όπου το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο σωματιδίου στα 17,14μm , το δεύτερο μήνα μετρήθηκε μέση διάμετρος 10,18μm όπου το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο στα 21,63μm, το τρίτο μήνα η μέση διάμετρος μετρήθηκε στα 66,64μm και το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών είχε διάμετρο στα 110,48μm και το τέταρτο μήνα μετρήθηκε μέση διάμετρος στα 56,976μm με το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μικροπλαστικών να έχει διάμετρο στα 54,92μm. Επιπλέον σύμφωνα με το διάγραμμα τους δύο πρώτους μήνες παρουσιάζονται νανοπλαστικά(<1μm) στο διηθούμενο υγρό σε σύγκριση με τον τρίτο και τέταρτο μήνα όπου το μέγεθος των δευτερογενών πλαστικών ανήκει στα μικροπλαστικά.

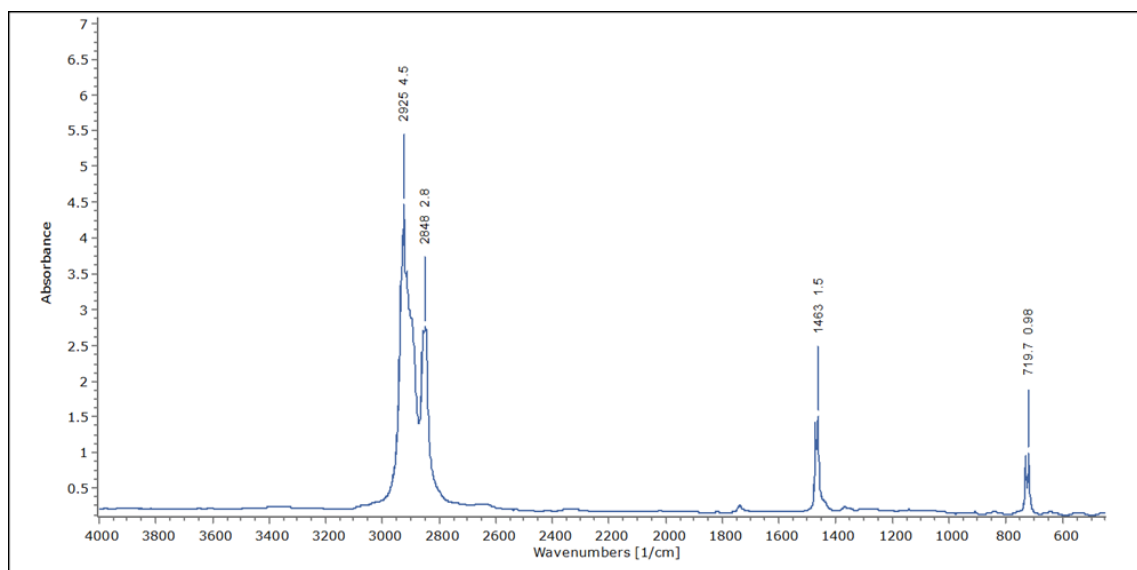
Το μέγεθος των σωματιδίων, όπως εμφανίζονται στα διαγράμματα όγκου και ποσότητας , είναι σε κάθε δείγμα μικρότερο των 250μm ενώ είναι εμφανής η τάση των διαμέτρων των σωματιδίων προς μεγαλύτερα μεγέθη . Αυτό πιθανώς να οφείλεται στα συσσωματώματα των νανοπλαστικών εξαιτίας της ύπαρξης των εξωκυτταρικών πολυμερών των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται κατά τη διάρκεια του πειράματος όμως η συγκέντρωση των εξωκυτταρικών πολυμερών δεν έχει μεταβληθεί τόσο πολύ ώστε να στηριχθεί αυτή η θεωρία. Πιο πιθανή είναι η θεωρία βιοαποδόμησης των δευτερογενών μικροπλαστικών

του πειράματος, από τη δράση των μικροβιακών κοινοτήτων που τροποποιούν και καταναλώνουν το πολυμερές οδηγώντας σε αλλαγές στις ιδιότητές του και το συνεχή θρυμματισμό του. Σύμφωνα με έρευνες εξαιτίας της γήρανσης και της μικροβιακής δράσης οδηγούμαστε σε σπάσιμο της αλυσίδας του πολυμερούς, μείωση του βάρους και αλλαγή του μοριακού βάρους με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοσωματιδίων (nanoplastics). Εντούτις δεν έχει προσδιοριστεί η κατανάλωση πολυμερούς κατά τη διάρκεια πειραμάτων άλλων μελετών κι δεν έχουν γίνει έρευνες που να αποδεικνύουν την ενσωμάτωση του άνθρακα πολυαιθυλενίου στη μακρομοριακή δομή ενός μικροοργανισμού όπως το DNA ή οι πολυσακχαρίτες του. (Balasubramanian et al., 2014; Restrepo-Flórez et al., 2014; Shah et al., 2008).

3.4. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier

Η ανάλυση των χαρακτηριστικών ομάδων στην επιφάνεια των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός φασματομέτρου υπερύθρου (Frontier FT-IR spectrometer, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), ενώ τα φάσματα ελήφθησαν και υπέστησαν επεξεργασία με το λογισμικό Spectrum της PerkinElmer. Η ανάλυση σάρωσης (scan resolution) ορίστηκε στα 4cm^{-1} για τιμές απορρόφησης από $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$.

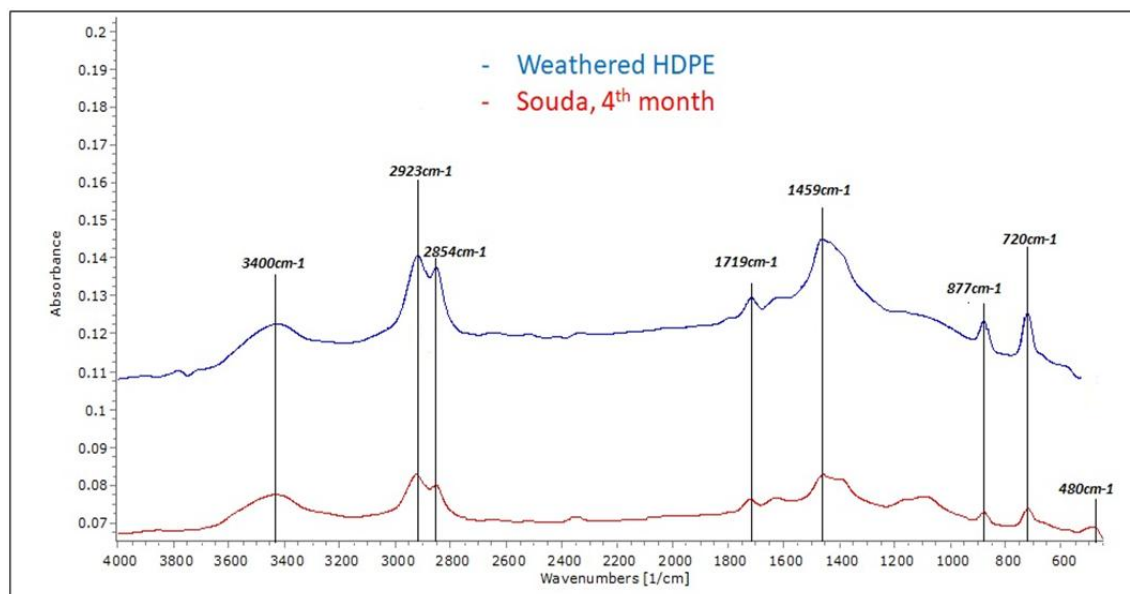
Οι κορυφές ενός παρθένου HDPE εμφανίζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



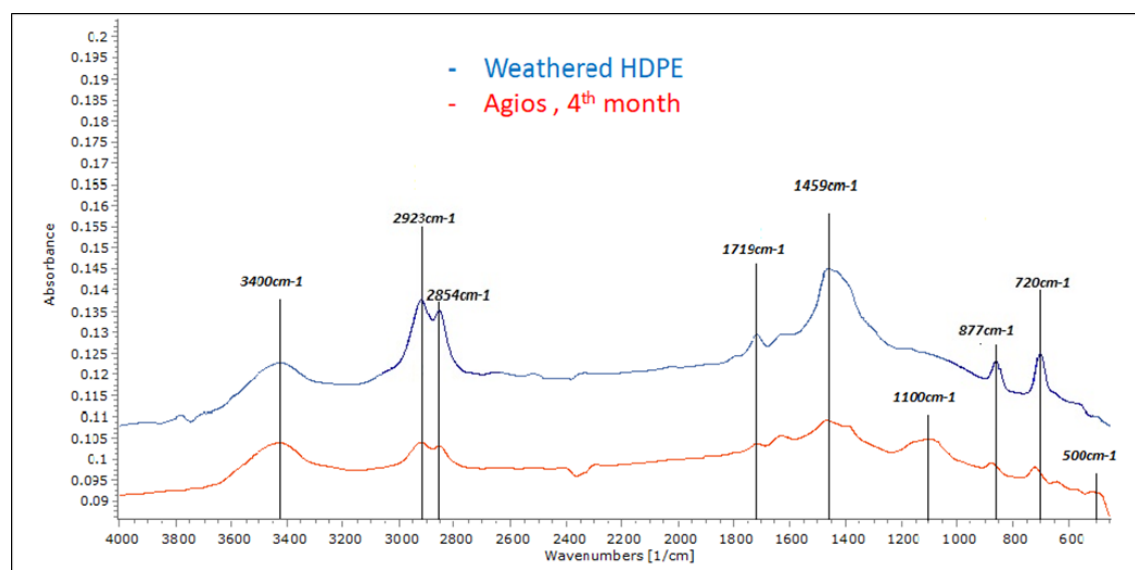
Διάγραμμα 9: HDPE, χαρακτηριστικό φάσμα παρθένου υλικού

Παρατηρείται ότι εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του παρθένου υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Κοντά στα 2850 cm^{-1} εμφανίζεται η κορυφή της μεθυλομάδας (R-CH_3) του πολυαιθυλενίου, η οποία δίνει τη χαρακτηριστική απορρόφηση της συμμετρικής τάσης του δεσμού C-H στο μήκος κύματος αυτό και την απορρόφηση της ασύμμετρης τάσης στα 2920 cm^{-1} . Επίσης η συμμετρική παραμόρφωση του μορίου (με το άνοιγμα των γωνιών των ατόμων υδρογόνου) και η ασύμμετρη παραμόρφωση εμφανίζονται περίπου, στα 1470 cm^{-1} . Η διπλή κορυφή στα 720 cm^{-1} περίπου, οφείλεται στις δονήσεις κάμψης του απλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C).

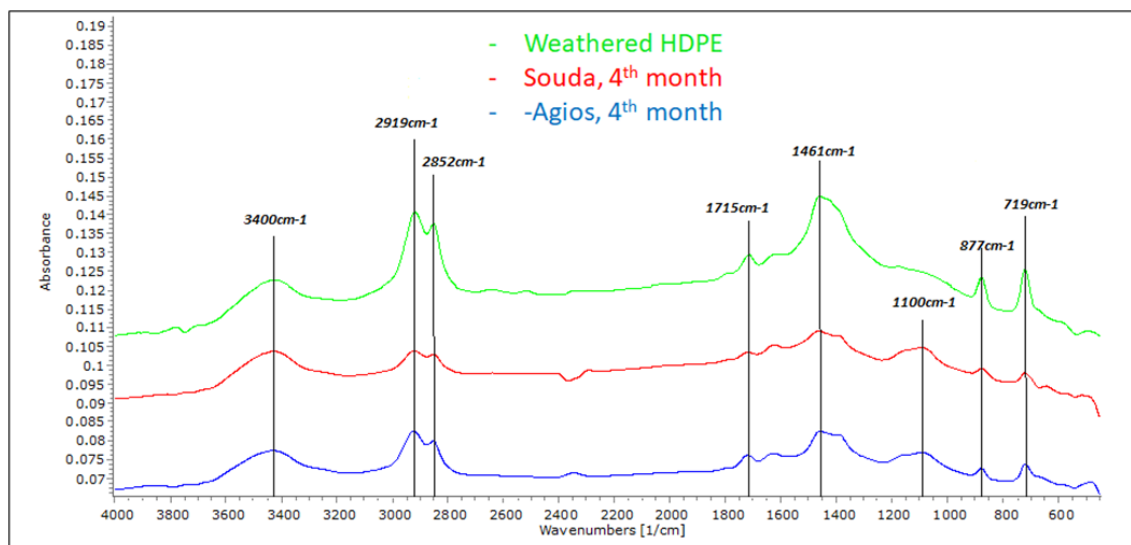
Από τη μελέτη των φασμάτων FT-IR, με μικροπλαστικά που έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία και σε βιολογική δράση, αντλούνται σημαντικές πληροφορίες. Στα παρακάτω διαγράμματα (10-11-12) παρουσιάζονται συγκριτικά οι μεταβολές στους δεσμούς της επιφάνειας των μικροπλαστικών οφειλόμενοι σε φωτοοξείδωση και βιοαποδόμηση δευτερογενών μικροπλαστικών.



Διάγραμμα 10: HDPE, χαρακτηριστικό φάσμα δευτερογενών μικροπλαστικών και δευτερογενών μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στη κοινότητα 'Souda'.



Διάγραμμα 11 HDPE, χαρακτηριστικό φάσμα δευτερογενών μικροπλαστικών και δευτερογενών μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στη κοινότητα 'Agios'



Διάγραμμα 12 : HDPE, χαρακτηριστικά φάσματα δευτερογενών μικροπλαστικών και δευτερογενών μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στις δύο μικροβιακές κοινότητες.

Οι συγκεντρώσεις στα φάσματα δεν ξεκινούν από την αρχή των αξόνων γιατί έχει επηρεαστεί η συγκέντρωσή τους κατά τη προετοιμασία των δειγμάτων για μέτρηση του φάσματος .

Οι πιο σημαντικές αλλαγές, στο φάσμα του HDPE που έχει δεχθεί UV ακτινοβολία, είναι στις περιοχές που απορροφώνται οι υδροξυλικές (R-OH , $3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) και οι καρβονυλικές ομάδες (>C=O , $1700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$). Παρατηρήθηκε αύξηση των εντάσεων των απορροφήσεων για τις ομάδες αυτές μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας που δέχθηκαν τα δείγματα . Το γηρασμένο HDPE περιέχει ακόρεστους δεσμούς, που ,κυρίως, οδηγούν σε αντιδράσεις διάσπασης αλυσίδας. Μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία παρατηρείται ότι σχηματίζονται νέοι χημικοί δεσμοί, ομάδες υδροξυλίου (R-OH) και καρβοξυλικά οξέα (R-COOH) με διευρυμένες κορυφές . Αυτό οφείλεται στη δημιουργία πολλαπλών προϊόντων οξείδωσης, όπως εστέρες (1735 cm^{-1}), καρβοξυλικά οξέα (1713 cm^{-1}) συζευγμένες κετόνες (1718 cm^{-1}) και βινυλικές ομάδες (1640 και 915 cm^{-1}). Η αύξηση της βινυλικής ομάδας εκφράζει το σχηματισμό του διπλού δεσμού $\text{C}=\text{C}$. Οι απορροφήσεις στα συγκεκριμένα μήκη κύματος αποδεικνύουν την έκταση της επίδρασης της UV-ακτινοβολίας (Andrady, 2017).

Τα φάσματα που αντιστοιχούν στο πολυαιθυλένιο που έχει εκτεθεί σε UV ακτινοβολία και στη μικροβιακή δραστηριότητα_διαφέρουν από το φάσμα του πολυαιθυλενίου που έχει δεχθεί μόνο UV ακτινοβολία. Η περιοχή του φάσματος απορρόφησης του καρβονυλικού δεσμού μειώθηκε μετά από τέσσερις μήνες βιολογικής δράσης. Επίσης η ένταση του φάσματος απορρόφησης των διπλών δεσμων των καρβοξυλικών οξέων και κετονών έχει μειωθεί.

Εκτός από τις παραπάνω διαφοροποιήσεις στα φάσματα απορρόφησης των δειγμάτων μετρήθηκαν τα εμβαδά των κορυφών που σχηματίζονται και εκφράστηκαν ως δείκτες καρβονυλίου και βινυλίου. Στους παρακάτω πίνακες (3,4) παρουσιάζεται η διακύμανση των δεικτών ανάλογα με τις επιδράσεις που έχουν δεχτεί τα δείγματα.

Πίνακας 3: δείκτης δεσμού Κετο-καρβονυλίου

Keto carbonyl bond index	UV –A (5 months)	1 ^{ος} μήνας	4 ^{ος} μήνας
Για τη κοινότητα Souda	0,890	0,916	0,973
Για τη κοινότητα Agios	0,890	0,945	0,984

Πίνακας 4 : δείκτης δεσμού βινυλίου

Vinyl bond index	UV –A (5 months)	1 ^{ος} μήνας	4 ^{ος} μήνας
Για τη κοινότητα Souda	0,897	0,928	1,013
Για τη κοινότητα Agios	0,897	0,963	1,016

Για πρώτη φορά περιγράφονται και συγκρίνονται οι δείκτες καρβονυλίου και βινυλίων σε δευτερογενή μικροπλαστικά που έχουν εκτεθεί σε μικροβιακή δραστηριότητα. Παρατηρείται αύξηση του δείκτη καρβονυλίου στο διάστημα των τεσσάρων μηνών όπου τα δευτερογενή μικροπλαστικά εμβολιάστηκαν με τη κοινότητα 'Agios'. Τον πρώτο μήνα δειγματοληψίας ο δείκτης καρβονυλίου μετρήθηκε 0,945 ενώ το τέταρτο μήνα ο δείκτης μετρήθηκε 0,984. Ομοίως ο δείκτης βινυλίων αυξήθηκε από 0,963 σε 1,016, στο διάστημα των τεσσάρων μηνών όπου τα δευτερογενή μικροπλαστικά εμβολιάστηκαν με τη κοινότητα 'Agios'. Υπάρχουν έρευνες που συμφωνούν με τα αποτελέσματα αυτά (Balasubramanian et al., 2010; Harshvardhan and Jha, 2013) ενώ άλλες έρευνες παρουσιάζουν μείωση των δεικτών καρβονυλίου, υπό παρουσία μικροοργανισμών ((Orr) et al., 2004; Hadad et al., 2005)(Hadad et al., 2005)(Hadad et al., 2005)(Hadad et al., 2005). Συγκρίνοντας την κλίση ευθειών (βλ. Παράρτημα) που σχηματίζουν τα αποτελέσματα των δεικτών για τη κοινότητα 'Agios' παρατηρείται μεγαλύτερη αλλαγή στο δείκτη καρβονυλίων από το δείκτη βινυλίων. Για τα δευτερογενή μικροπλαστικά που εμβολιάστηκαν με τη κοινότητα 'Souda' εξήχθησαν παρόμοια αποτελέσματα. Ο δείκτης καρβονυλίου αυξήθηκε στο διάστημα των τεσσάρων μηνών από 0,916 σε 0,973 και ο δείκτης βινυλίων από 0,928 σε 1,013. Συγκρίνοντας τις κλίσεις ευθειών των αποτελεσμάτων των δεικτών για τα δευτερογενή μικροπλαστικά που εμβολιάστηκαν με τη κοινότητα 'Souda' παρατηρείται μεγαλύτερη αλλαγή στο δείκτη καρβονυλίων από το δείκτη βινυλίων. Τέλος συγκρίνοντας συνολικά την επίδραση των βακτηριακών κοινοτήτων στα δευτερογενή μικροπλαστικά παρατηρείται ότι η κοινότητα 'Agios' παρουσίασε μεγαλύτερες αλλαγές σε σύγκριση με τη κοινότητα 'Souda'. Η μελέτη της χημείας της επιφάνειας του πολυαιθυλενίου είναι σημαντική διότι οι οξειδωμένες ομάδες ρυθμίζουν τη μικροβιακή προσκόλληση αυξάνοντας την υδροφιλικότητα της επιφάνειας.

Ακόμη από τα φάσματα των δειγμάτων εξήχθησαν κι έμμεσα αποτελέσματα για την αλλαγή της κρυσταλικότητας του πολυμερούς. Τα φίλμ πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας

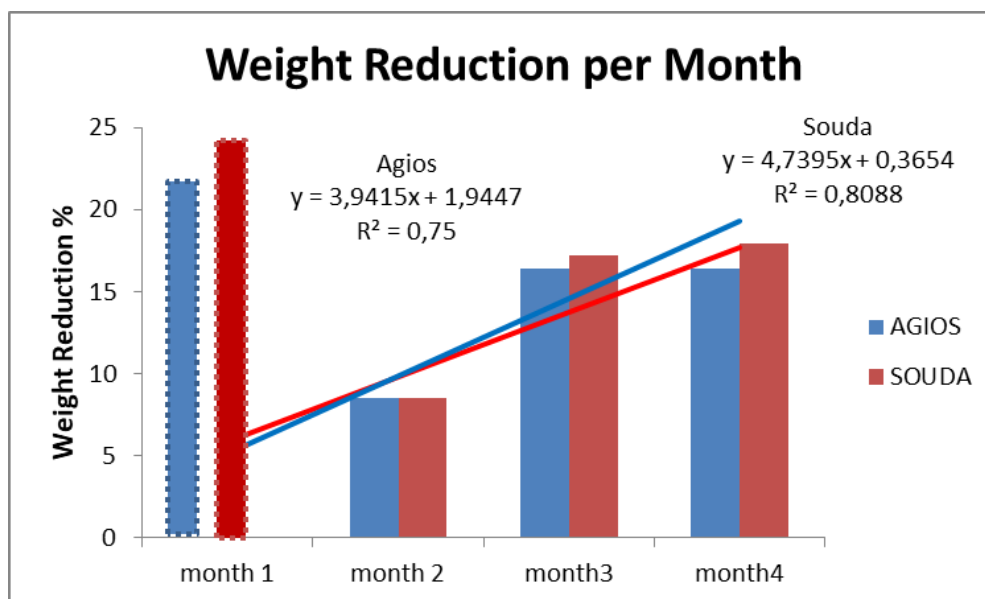
παρουσίασαν αύξηση στη κρυσταλλικότητα τους μετά την έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία. Το ποσοστό κρυσταλλικότητας του παρθένου πολυμερούς μετρήθηκε 83% κι μετά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία μετρήθηκε 90,1%. Ακόμη η μέτρηση του ποσοστού κρυσταλλικότητας για τα δευτερογενή μικροπλαστικά που εμβολιάστηκαν με βακτήρια μετρήθηκε 90,26% για τη κοινότητα 'Souda' και 90,36% για τη κοινότητα 'Agios' το τέταρτο μήνα δειγματοληψιών. Το ποσοστό κρυσταλλικότητας στην επιφάνεια του πολυμερούς αυξάνεται λόγω κατανάλωσης των άμορφων περιοχών που είναι πιο προσιτές στους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν μελέτες που συμφωνούν με την αύξηση της κρυσταλλικότητας σε πολυαιθυλένιο που έχει εκτεθεί σε μικροβιακές κοινότητες (Muthukumar et al., 2014; Restrepo-Flórez et al., 2014).

3.5. Προσδιορισμός της μείωσης βάρους του πολυαιθυλενίου.

Κατά τη δειγματοληψία κάθε μήνα τα μικροπλαστικά που συγκρατούντουσαν σε ένα φίλτρο με πόρο 250μm ,δέχτηκαν δύο πλύσεις με διάλυμα Tween 80 ώστε να απομακρυνθεί το προσκολλημένο βιοφίλμ από την επιφάνεια και να μην αλιωθούν οι μετρήσεις βάρους. Στή συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις με νερό και καθαρή αιθανόλη. Τα μικροπλαστικά ξυράνθηκαν στους 37°C για 5 ημέρες. Με το πέρας των πέντε ημερών τα πλαστικά ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό του νέου βάρους. Η μέτρηση αυτή αποτελεί το τελικό βάρος των μικροπλαστικών. Το αρχικό βάρος είναι η ποσότητα των μικροπλαστικών που εισήχθη στις κωνικές φυάλες . Το ποσοστό απώλειας βάρους για τα μικροπλαστικά HDPE εξαιτίας της αποδόμησής τους από μικροβιακές κοινότητες υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Ποσοστό Μείωσης Βάρους} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος} - \text{Τελικό Βάρος}}{\text{Αρχικό Βάρος}} \times 100$$

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μεταβολές στο βάρος στο διαστημα των τεσσάρων μηνών από κάθε μικροβιακή κοινότητα ξεχωριστά.



Διάγραμμα 13: Ποσοστό Μείωσης Βάρους ανά μήνα και μικροβιακή κοινότητα.

Στο διάγραμμα παρουσιάζεται μία συνεχή μείωση του βάρους των μικροπλαστικών πολυαιθυλενίου κι από τις δύο κοινότητες . Οι τιμές του πρώτου μήνα δεν λαμβάνονται υπόψη λόγω λάθους κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας πιθανός οφειλόμενο σε μή σωστή προετοιμασία της δειγματοληψίας . Το δεύτερο μήνα το ποσοστό μείωσης του βάρους για τα δευτερογενή μικροπλαστικά μετρήθηκε 8,52% και για τις δύο μικροβιακές κοινότητες . Τον τρίτο μήνα το ποσοστό που μετρήθηκε ήταν 16,4% για τη κοινότητα 'Agios' και 17,2% για τη κοινότητα 'Souda'. Το τέταρτο μήνα η κοινότητα 'Agios' παρουσίασε ίδια αποτελέσματα με του τρίτου μήνα κι αυτό πιθανός οφείλεται σε πειραματικά λάθη οφειλόμενα κυρίως σε κακή πλύση τού σχηματιζόμενου βιοφίλμ στα δευτερογεννή μικροπλαστικά. Η κοινότητα 'Souda' παρουσίασε μείωση βάρους 18%. Υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν αποτελέσματα με μείωση 17% του βάρους HDPE μακροπλαστικών σε 6 μήνες (Muthukumar et al., 2014) με καλλιέργεια βακτηρίων και 9,4% σε 30 ημέρες (Balasubramanian et al., 2014) με καλλιέργεια μυκήτων. Η μείωση του βάρους αποτελεί ένα δείκτη βιοαποδόμησης των μικροπλαστικών αλλά η αλλαγή στο μοριακό βάρος είναι η μέτρηση που οδηγεί σε αυτό το συμπέρασμα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το αποτέλεσμα της συσσώρευσης εκατομμυρίων τόνων πλαστικών απορριμμάτων στα θαλάσσια και παράκτια συστήματα έχει σημασία τόσο από περιβαλλοντική όσο κι από οικονομική σκοπιά. Η ικανότητα των θαλάσσιων μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν πλαστικά πολυμερή ως πηγή άνθρακα πρόσφατα ξεκίνησε να μελετάται εμφανίζοντας σημαντικές πληροφορίες για τη τύχη των πλαστικών. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση της επίδρασης των βιοτικών παραγόντων σε δευτερογενή μικροπλαστικά υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου που έχουν γηρανθεί. Τα δευτερογενή μικροπλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από λεπτά γηρασμένα φιλμ υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Αναλύοντας τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

- Οι μικροοργανισμοί όχι μόνο μπορούν να αναπτυχθούν αλλά επίσης να ευδοκιμήσουν υπό oligοτροφικές συνθήκες όπου τα δευτερογενή HDPE μικροπλαστικά είναι η μόνη διαθέσιμη πηγή άνθρακα.
- Τα εξωκυτταρικά πολυμερή παρουσίασαν αύξητική τάση στη συγκέντρωση στους κατά τη διάρκεια του πειράματος, υποδηλώνοντας τον επιτυχή εγκλιματισμό των μικροβιακών κοινοτήτων. Τα εξωκυτταρικά πολυμερή διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωσή τους ανάλογα με τη μικροβιακή κοινότητα όμως το μοτίβο ανάπτυξης για τις δυο αυτές βακτηριακές κοινότητες είναι πανομοιότυπο. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες υποδηλώνει αύξηση της μικροβιακής ικανότητας προσκόλλησης στα μικροπλαστικά.
- Λαμβάνοντας υπόψη τη συνεχή αύξηση των ετερότροφων βακτηρίων, την αύξηση της συγκέντρωσης των εξωκυτταρικών πολυμερών αλλά και τα διάγραμμα διασποράς μεγέθους των δύο πρώτων μηνών, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων επιδρά θετικά στη διάσπαση του πολυμερούς οδηγώντας στο σχηματισμό νανοπλαστικών.
- Ακόμη η κοινότητα 'Agios' παρουσίασε πιο γρήγορη αύξηση των μεγεθών των πλαστικών σωματιδίων , σε σύγκριση με τη κοινότητα 'Souda'. Συμπεραίνεται ότι η κοινότητα 'Agios' είναι πιο αποτελεσματική στη αποδόμηση των δευτερογενών μικροπλαστικών.
- Στην ανάλυση των φασμάτων του γηρασμένου πολυμερούς δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις ακόλουθες λειτουργικές ομάδες: καρβονύλια (1715 cm^{-1}), εστέρες (1740 cm^{-1}), βινύλια (1650 cm^{-1}) και διπλούς δεσμούς (908 cm^{-1}). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης FT-IR , όσον αφορά τα μικροπλαστικά που έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, παρουσιάζουν αύξηση σε οξυγονωμένα τμήματα της αλυσίδας των μικροπλαστικών όπως αλδεΐδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα καθώς και αύξηση του δείκτη καρβονυλίου και βινιλίου που εξηγεί τον θρυματισμό των φιλμ πολυαιθυλενίου.
- Επίσης η έκθεση σε βακτηριακή δραστηριότητα οδήγησε σε αλλαγές στις απορροφήσεις των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια του υποστρώματος πολυαιθυλενίου. Η μείωση της απορρόφησης συγκεκριμένων κορυφών υποδηλώνει τη κατανάλωση των λειτουργικών ομάδων της πολυμερικής αλυσίδας (κατανάλωση καρβονυλίων , κετόνων και καρβοξυλικών οξέων) από τους

ετερότροφους μικροοργανισμούς. Η κατανάλωση των οξειδωμένων μορίων της αλυσίδας του HDPE από βακτήρια θα αποσαφηνιστεί καλύτερα με τη μελλοντική μέτρηση της αλλαγής του μοριακού βάρους.

- Οι δείκτες δεσμού Κετο-καρβονυλίου (KCBI) και δεσμών βινυλίου (VBI) αυξήθηκαν από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και την έκθεση σε βιολογική δραστηριότητα στην επιφάνεια των δευτερογενών μικροπλαστικών καθώς και η ποσοστιαία κρυσταλλικότητα λόγω κατανάλωσης των άμορφων περιοχών που είναι πιο προσιτές στους μικροοργανισμούς.
- Εξετάζοντας τις μετρήσεις μείωσης του βάρους παρατηρείται μείωση του βάρους τόσο στα δευτερογενή μικροπλαστικά που έχουν εκτεθεί στη μικροβιακή δράση της κοινότητας 'Souda' όσο και σε αυτά που έχουν εκτεθεί στη μικροβιακή δράση της κοινότητας 'Agios' . Η μείωση του βάρους αποτελεί δείκτη αποδόμησης όμως σε τόσο μικρά μεγέθη είναι δύσκολο να μην επηρεαστεί από ανθρωπογενείς παράγοντες .

Όλα τα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα της αποδόμησης των δευτερογενών μικροπλαστικών από τις μικροβιακές κοινότητες . Η μέτρηση της αλλαγής του μοριακού βάρους των μικροπλαστικών θα επαληθεύσει τα συμπεράσματα. Η διαδικασία βιοαποδόμησης του πολυαιθυλενίου αν και γίνεται στη φύση είναι εξαιρετικά αργή (Andrady, 2017; Hakkarainen and Albertsson, 2004) αλλά ακόμη κι υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε εργαστηριακό περιβάλλον οι τέσσερις μήνες δεν είναι αρκετοί για την ολική αποδόμηση του , Χρειάζεται περισσότερος χρόνος ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός αποδόμησης. Η χρησιμοποίηση αυτού του πολυμερούς από μικροοργανισμούς περιορίζεται λόγω της αδιαλυτότητάς του στο νερό και του υψηλού μοριακού βάρους. Παρόλο που υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν τη βιοαποδόμηση του πολυαιθυλενίου, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη γνώσης σχετικά με τις πλήρεις μεταβολικές οδούς που εμπλέκονται στη διαδικασία . Η απομόνωση και η ταυτοποίηση των ενζύμων που μπορούν να οξειδώσουν και να σπάσουν τις αλυσίδες πολυαιθυλενίου καθώς και το μέγεθος των αλυσίδων πολυαιθυλενίου που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από τα κύτταρα είναι αντικείμενα έρευνας. Ένας άλλος σημαντικός τομέας έρευνας είναι η αναγνώριση της τύχης του πολυαιθυλενίου εντός μικροοργανισμών.

Τα μικροπλαστικά αντιπροσωπεύουν ένα κίνδυνο για ολόκληρο το οικοσύστημα. Εφόσον, αρχίζουν να γίνονται γνωστές και κατανοητές οι ιδιότητες ρύπανσης από μικροπλαστικά είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα ατομικά και κρατικά για τον περιορισμό, αφενός της ρύπανσης στην πηγή της, αλλά και της αντιμετώπισής της εκεί που υφίσταται, και στη συνέχεια της εξυγίανσής της, με παραδοσιακές αλλά και καινοτόμες μεθόδους.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα κριτηρίου Mann Whitney

H_0 : Τα δύο δείγματα ακολουθούν την ίδια κατανομή.

H_a : Οι κατανομές των δύο δειγμάτων είναι διαφορετικές.

Για την διαφορά στην ανάπτυξη των μικροβιακών κοινοτήτων 'Agios' και 'Souda'

P value	0,125	
alpha	0,05	
The risk to reject the null hypothesis H_0 while it is true is 12,5%.		

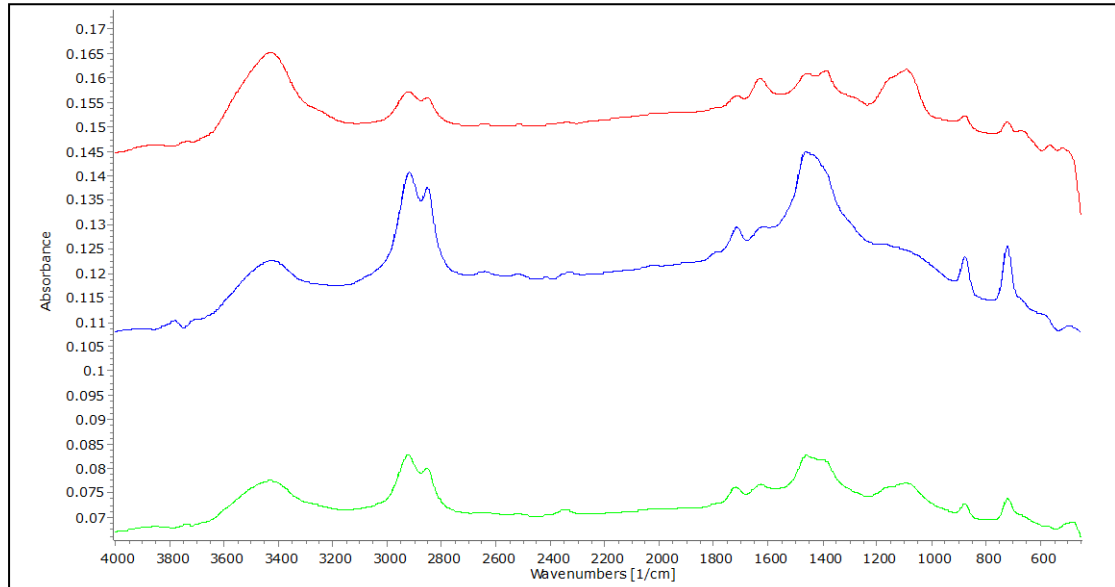
Για την διαφορά στην ανάπτυξη των πρωτεϊνών των μικροβιακών κοινοτήτων 'Agios' και 'Souda'

P value	0,606	
alpha	0,05	
The risk to reject the null hypothesis H_0 while it is true is 60,63%.		

Για την διαφορά στην ανάπτυξη των υδατανθράκων των μικροβιακών κοινοτήτων 'Agios' και 'Souda'

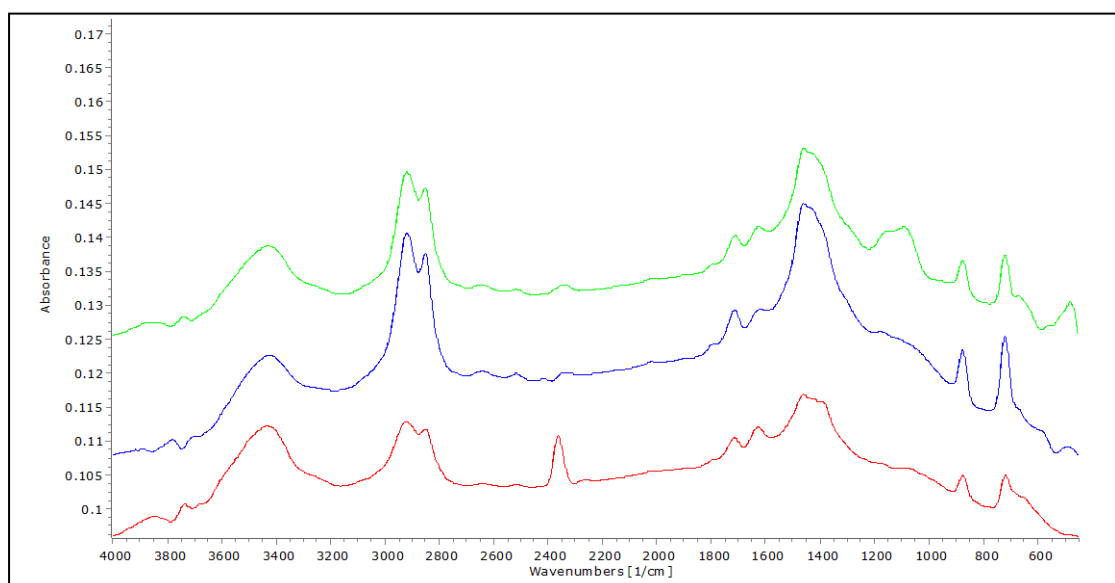
P value	0,959	
alpha	0,05	
The risk to reject the null hypothesis H_0 while it is true is 95,91%.		

- HDPE 5 months UV weathering
- HDPE Souda 1 month
- HDPE Souda 4 months



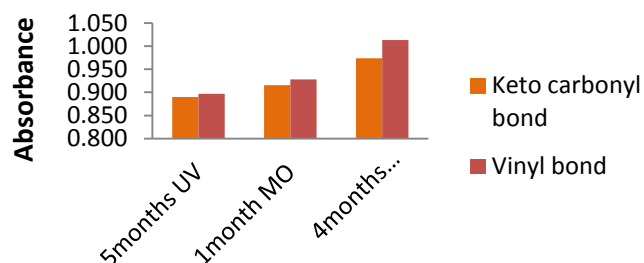
Χαρακτηριστικά φάσματα HDPE, δευτερογενών μικροπλαστικών και δευτερογενών μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στη κοινότητα ' Souda'

- HDPE 5 months UV weathering
- HDPE Agios 1 month
- HDPE Agios 4 months

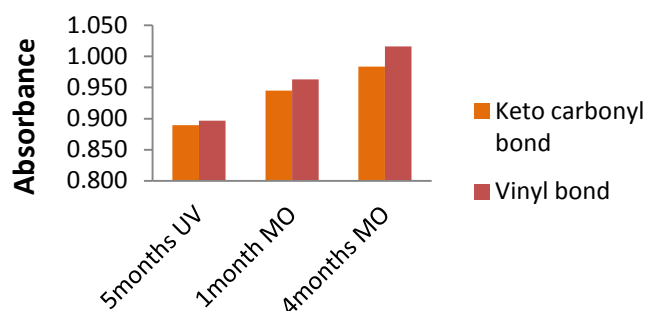


Χαρακτηριστικά φάσματα HDPE, δευτερογενών μικροπλαστικών και δευτερογενών μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στη κοινότητα ' Agios'

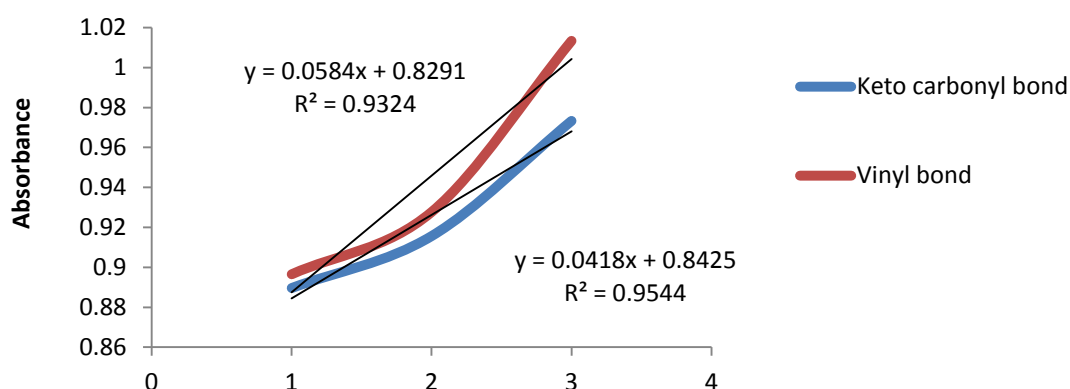
Μεταβολή δεικτών για τη βακτηριακή κοινότητα 'Souda'



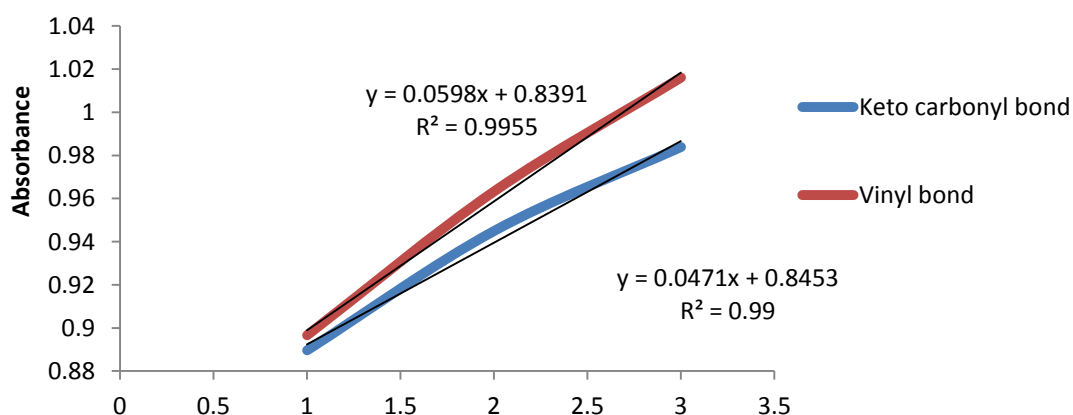
Μεταβολή δεικτών για τη βακτηριακή κοινότητα 'Agios'



Μεταβολή δεικτών για τη μικροβιακή κοινότητα 'Souda'



Μεταβολή δεικτών για τη μικροβιακή κοινότητα 'Agios'



Διαγράμματα που παρουσιάζουν την επίδραση της βακτηριακής δράσης στους δείκτες καρβονυλίου και βινυλίου για τις δύο μικροβιακές κοινότητες .

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (Orr), I. G., Hadar, Y., and Sivan, A. (2004). Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 97–104. doi:10.1007/s00253-004-1584-8.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 119, 12–22. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.01.082.
- Ashraf, A. Al Analysis of Polymer. *FTIR UV-Vis Anal. Polym. Samples*. doi:10.13140/2.1.3819.0880.
- Association of Plastics Manufacturers in Europe, and European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations (2016). Plastics – the Facts 2016. Available at: http://www.plasticseurope.org/documents/document/20161014113313-plastics_the_facts_2016_final_version.pdf.
- Avio, C. G., Gorbi, S., and Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* 128, 2–11. doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.012.
- Balasubramanian, V., Natarajan, K., Hemambika, B., Ramesh, N., Sumathi, C. S., Kottaimuthu, R., et al. (2010). High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 205–211. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02883.x.
- Balasubramanian, V., Natarajan, K., Rajeshkannan, V., and Perumal, P. (2014). Enhancement of in vitro high-density polyethylene (HDPE) degradation by physical, chemical, and biological treatments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 12549–12562. doi:10.1007/s11356-014-3191-2.
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., and Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1985–1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205.
- Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R. C., Vanderlinden, J.-P., Alomar, C., et al. (2017a). “Microplastic Effects in *Mullus surmuletus*: Ingestion and Induction of Detoxification Systems,” in *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems*, 59–60. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00055-7.
- Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R. C., Vanderlinden, J.-P., Fossi, M. C., et al. (2017b). “Microplastics, Convergence Areas, and Fin Whales in the Northwestern Mediterranean Sea,” in *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems*, 31–32. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00032-6.
- Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R. C., Vanderlinden, J.-P., Napper, I. E., et al. (2017c). “Characterization, Quantity, and Sorptive Properties of Microplastics Extracted

- From Cosmetics,” in *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems*, 63–64. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00060-0.
- Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R. C., Vanderlinden, J.-P., Rochman, C. M., et al. (2017d). “What Do We Know About the Ecological Impacts of Microplastic Debris?,” in *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems* doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00052-1.
- Baztan, J., Jorgensen, B., Pahl, S., Thompson, R. C., Vanderlinden, J.-P., van Oyen, A., et al. (2017e). “Plastic and Restricted Heavy Metals,” in *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems* doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00001-6.
- Bergmann, M., Gutow, L., and Klages, M. (2015). *Marine anthropogenic litter*. doi:10.1007/978-3-319-16510-3.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., and Ke, P. C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *J. Phys. Chem. C* 114, 16556–16561. doi:10.1021/jp1054759.
- Browne, M. A., Galloway, T., Thompson, R., and Chapman, P. M. (2007). Learned discourses. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 297–297. doi:10.1002/ieam.5630030215.
- Carlo Giacomo Avio, Stefania Gorbi, F. R. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* 128, 2–11. doi:10.1016/J.MARENRES.2016.05.012.
- Crawford, C. B. (2016). *Microplastic pollutants*. Elsevier Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128094068> [Accessed October 2, 2017].
- Crawford, C. B., Quinn, B., Crawford, C. B., and Quinn, B. (2017a). “1 – The emergence of plastics,” in *Microplastic Pollutants*, 1–17. doi:10.1016/B978-0-12-809406-8.00001-3.
- Crawford, C. B., Quinn, B., Crawford, C. B., and Quinn, B. (2017b). “7 – The biological impacts and effects of contaminated microplastics,” in *Microplastic Pollutants*, 159–178. doi:10.1016/B978-0-12-809406-8.00007-4.
- Duis, K., and Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* 28. doi:10.1186/s12302-015-0069-y.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., et al. (2014). Plastic Pollution in the World’s Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0111913.
- Fok, L., and Cheung, P. K. (2015). Hong Kong at the Pearl River Estuary: A hotspot of microplastic pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 99, 112–118. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.050.
- Gardette, M., Perthue, A., Gardette, J. L., Janecska, T., Földes, E., Pukánszky, B., et al. (2013). Photo- and thermal-oxidation of polyethylene: Comparison of mechanisms and influence of unsaturation content. *Polym. Degrad. Stab.* 98, 2383–2390. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.07.017.

- Hadad, D., Geresh, S., and Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1093–1100. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x.
- Hakkarainen, M., and Albertsson, A.-C. (2004). Environmental Degradation of Polyethylene. 177–200. doi:10.1007/b13523.
- Harshvardhan, K., and Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 100–106. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.025.
- Ivar do Sul, J. A., Spengler, Â., and Costa, M. F. (2009). Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1236–1238. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.05.004.
- Lee, J., Hong, S., Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, Y. C., Jang, M., et al. (2013). Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 349–354. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.08.013.
- Li, W. C., Tse, H. F., and Fok, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Sci. Total Environ.* 566–567, 333–349. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.084.
- Marvasi (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: Polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 313, 1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x.
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manage.* 144, 1–25. doi:10.1016/j.jenvman.2014.05.010.
- Muthukumar, T., Aravinthana, A., Dineshram, R., Venkatesan, R., and Doble, M. (2014). Biodegradation of Starch Blended High Density Polyethylene using Marine Bacteria Associated with Biofilm Formation and its Isolation Characterization. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6, 116–122. doi:10.4172/1948-5948.1000131.
- Qiu, Q., Tan, Z., Wang, J., Peng, J., Li, M., and Zhan, Z. (2016). Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 176. doi:10.1016/j.ecss.2016.04.012.
- Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., and Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 83–90. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.014.
- Rocha-Santos, T., and Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 65, 47–53. doi:10.1016/j.trac.2014.10.011.
- Rodriguez-Seijo, A., Lourenço, J., Rocha-Santos, T. A. P., da Costa, J., Duarte, A. C., Vala, H., et al. (2017). Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environ. Pollut.* 220. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.092.
- Ryan, P. G., Moore, C. J., van Franeker, J. A., and Moloney, C. L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1999–2012. doi:10.1098/rstb.2008.0207.

- Sangale, M. K. (2012). A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *J. Bioremediation Biodegrad.* 3. doi:10.4172/2155-6199.1000164.
- Sesini, M. (2011). The Garbage Patch in the Oceans: the problem and possible solutions. *Earth Inst. - Columbia Univ.*, 23.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., and Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.
- Shi, Y., Huang, J., Zeng, G., Gu, Y., Chen, Y., Hu, Y., et al. (2017). Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere* 180, 396–411. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.042.
- Singh, B., and Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 561–584. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 422–426. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.013.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Han, G. M., Rani, M., Lee, J., et al. (2015). A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 93. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.01.015.
- Steensgaard, I., Syberg, K., Rist, S., Hartmann, N., Boldrin, A., and Hansen, S. F. (2017). From macro- to microplastics - Analysis of EU regulation along the life cycle of plastic bags. *Environ. Pollut.* 224. doi:10.1016/j.envpol.2017.02.007.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 178. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- Zerbi, G., Gallino, G., Fanti, N. Del, and Bains, L. (1989). Structural depth profiling in polyethylene films by multiple internal reflection infra-red spectroscopy. 30, 2324–2327.
- Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842e852
- Lee, M.J., Kang, D., Shim, W.J., 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Mar. Pollut.*
- Laist, D.W., 1997. Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records.
- Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.), *Marine Debris: Sources, Impact and Solutions*. Springer-Verlag, New York, pp. 99e139.

Allsopp, M., Walters, A., Santillo, D., Johnston, P., 2006. Plastic Debris in the World's Oceans. Greenpeace, Netherlands.

Romeo, T., Battaglia, P., Ped_a, C., Consoli, P., Andaloro, F., Fossi, M.C., 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 358e361.

Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F., 2015b. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 111, 18e26.

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015a. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ. Pollut.* 198, 211e222.

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2012. Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2782e2789.

M. Claessens, L. Van Cauwenberghe, M.B. Vandegehuchte, C.R. Janssen
New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 70 (2013), pp. 227-233

N. Hartmann, T. Nolte, M. Sørensen, P. Jensen, A. Baun . Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics. *Lessons Learned From Nanoecotoxicology*, DTU Environment (2015)

Perez-de-Mora A, Engel M, Schlöter M. Abundance and Diversity of n-Alkane- degrading Bacteria in a Forest Soil Co-Contaminated with Hydrocarbons and Metals: A Molecular Study on alkB Homologous Genes. *Microb Ecol.* 2011;62(4):959–72.

Jin CE, Kim MN. Change of bacterial community in oil-polluted soil after enrichment cultivation with low-molecular-weight polyethylene. *Int Biodeterior Biodegradation* [Internet]. 2017;118:27–33. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300252>

K. Bhuyan, "On the mechanism of sds-induced protein denaturation," *Biopolymers*, vol. 93, no. 2, pp. 186–199, 2010. doi: 10.1002/bip.21318.

Dey U, Mondal NK, Das K, Dutta S (2012) An approach to polymer degradation through microbes. *IOSR J Pharm* 2:385–388

By J.F. Rabek: Polymer Photodegradation: Mechanisms and experimental methods
https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=0MTrCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR15&dq=Rabek+J+OF.+Polymer+Photodegradation:+mechanisms+and+experimental+methods,+Chapter+3.+London:+Chapman+%26+Hall,+1995&ots=UmMlfzxM0p&sig=hXNF0xG589sO3Z3SQQ2Oh789R70&redir_esc=y#v=onepage&q=esters&f=false