



**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ (PELLETS) ΠΟΛΥΣΤΥΡΕΝΙΟΥ (PS) ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΡΟΠΥΛΕΝΙΟΥ (PP) ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΥΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΚΟΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**ΛΩΛΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καλογεράκης Νικόλαος, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Βενιέρη Δανάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Dr, Συρανίδου Ευδοκία

ΧΑΝΙΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2018

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

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

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δανάη Βενιέρη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη προσεκτική ανάγνωση και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Dr. Συρανίδου Ευδοκία, για την καθοδήγηση της και την άψογη συνεργασία. Οι γνώσεις της και οι εμπειρίες της ήταν άκρως πολύτιμες για την κατανόηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα ειλικρινές ευχαριστώ, χρωστάω στην υποψήφια Διδάκτωρ, Καρκανοραχάκη Αικατερίνη, για την πολύτιμη βοήθεια της, την απεριόριστη υπομονή και ανιδιοτελή βοήθεια που μου χάρισε.

Ευχαριστώ ακόμα, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, και ιδιαίτερα τη Πετρούλα Σερίδου, τη Γεωργία Χαραλάμπους, την Αργυρώ Λακιωτάκη, τη Δέσποινα Μπαρούτα, την Κατερίνα Σάββα καθώς και την κ. Αριάδνη Παντίδου, για την ανοχή και κατανόηση που έδειξαν κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, τη θέληση να μου μεταφέρουν γνώσεις και εμπειρίες και κυρίως για τη παρέα που μου χάρισαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, για την συμπαράσταση και ενθάρρυνση όλους αυτούς τους μήνες, συμβάλλοντας με το δικό τους ξεχωριστό τρόπο στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Κλείνοντας, ευχαριστώ ειλικρινά τους γονείς μου για την ηθική τους στήριξη και συμπαράσταση, την ολόψυχη αγάπη τους και τους ευγνωμονώ που στέκονται πάντα δίπλα μου και στις επιτυχίες μου και στις αποτυχίες μου.

## ΠΕΡΗΛΗΨΗ

Μεγάλο μέρος των πλαστικών αποβλήτων παγκοσμίως καταλήγει στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα, θέτοντας σε κίνδυνο τους οργανισμούς και τη ζωή του ανθρώπου, ενώ παράλληλα υποβαθμίζει την αισθητική αξία της περιοχής και την ανθρώπινη ευημερία. Τα πλαστικά μικροσφαιρίδια (pellets) αποτελούν ένα από τα συνηθέστερα πλαστικά απορρίμματα που συναντώνται στις θάλασσες και στις ακτές παγκοσμίως. Αποτελούν την 1<sup>η</sup> ύλη της πλαστικής βιομηχανίας και η μεταφορά και η συμπεριφορά τους στη θάλασσα αποτελεί ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο για την επιστημονική κοινότητα. Τα μικροσφαιρίδια, κατά την παραμονή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον, εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία, με αποτέλεσμα τη μείωση της δομικής τους ακεραιότητας και το θρυμματισμό τους. Η γήρανση (weathering) που προκαλείται, έχει βρεθεί πως βοηθάει στη διαδικασία της βιοαποδόμησης τους από μικροοργανισμούς.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη της επίδρασης των μικροβιακών κοινοτήτων της πελαγικής ζώνης του Άγιου Ονούφριου, στα μικροσφαιρίδια (pellets) πολυστερενίου και πολυπροπυλενίου, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον, όπου τα μικροπλαστικά είναι η μόνη πηγή άνθρακα. Τα μικροσφαιρίδια αρχικά, παρέμειναν σε θάλαμο ακτινοβολίας με UV-A ακτινοβολία, για διάστημα 4 μηνών, ώστε να επιτευχθεί γήρανση των πλαστικών (weathering). Μετέπειτα τα γηρασμένα πλαστικά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φλάσκες με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και εμβολιάστηκαν με τις θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες. Τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης για 4 μήνες. Εκτιμήσεις βάρους των μικροπλαστικών, της μικροβιακής ανάπτυξης, της ανάπτυξης των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών, της ταχύτητας καθίζησης και της κατανομής του μεγέθους μικροπλαστικών πραγματοποιούνταν κάθε μήνα, για την εκτίμηση της επίδρασης των θαλάσσιων μικροοργανισμών στα μικροσφαιρίδια.

Συνολικά, οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί κατάφεραν να αναπτυχθούν και να ευδοκιμήσουν επιτυχώς στο προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο. Κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα, παρατηρήθηκε μια μείωση στις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες, και συγκεκριμένα στις πρωτεΐνες και στους υδατάνθρακες, καθώς και στην μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ στον 4<sup>ο</sup> μήνα παρουσίασαν μια αυξητική τάση. Για το πολυπροπυλένιο σημειώθηκε μείωση βάρους 6,37% ενώ για το πολυστερένιο η μείωση βάρους υπολογίστηκε 1,30%. Ακόμη παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό νανοσωματιδίων στα δείγματα πολυπροπυλενίου, του 4<sup>ου</sup> μήνα, εξαιτίας της βιοαποδόμησης του από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς.

## **ABSTRACT**

Much of the world's plastic waste ends up in the aquatic and terrestrial ecosystems, endangering organisms and human life, while degrading the aesthetic value of the area and human well-being. Plastic pellets are one of the most common plastic waste found in seas and coasts throughout the world. They consist the raw material of the Plastic Industry and their transfer and behavior at sea is an interesting research field for the scientific community. Microspheres, while being in the marine environment, are exposed to solar radiation, resulting in a decrease of their structural integrity and fragmentation. The weathering which is taking place has been found to help in the process of biodegradation by microorganisms.

The purpose of this dissertation is to study the effect of the microbial communities of the Agios Onoufrios pelagic zone on polystyrene and polypropylene pellets in a simulated marine environment, where microplastics are the only source of carbon. The microspheres were initially kept in a UV-A irradiation chamber for a period of 4 months to achieve aging of the plastic (weathering). Subsequently the weathered plastics were placed in sterile conical flasks with sterile seawater and inoculated with the marine microbial communities. They were placed in a stirring bench for 4 months. Weight estimations of microplastics, microbial growth, extracellular polymer growth, sinking velocity, and microplastic size distribution were performed each month, in order to assess the effect of marine microorganisms on microspheres.

Overall, marine micro-organisms have succeeded in developing and successfully flourishing in the simulated marine microcosm. During the 2nd and 3rd month, there was a decrease in extracellular polymeric substances, namely proteins and carbohydrates, as well as in microbial growth, however during the 4th month they showed an increasing tendency. For polypropylene a weight reduction of 6.37% was observed, while for polystyrene the weight reduction was calculated at 1.30%. Yet a large percentage of nanoparticles were observed in polypropylene samples of the 4th month due to its biodegradation by marine microorganisms.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	ii
ABSTRACT.....	iii
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΛΑΣΤΙΚΑ.....	1
1.2.ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ.....	4
1.2.1.ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ .....	5
1.3.ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	7
1.4.ΝΑΝΟΠΛΑΣΤΙΚΑ .....	12
1.5.ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	13
1.6.ΠΟΛΥΣΤΥΡΕΝΙΟ .....	19
1.7.ΠΟΛΥΠΡΟΠΥΛΕΝΙΟ .....	20
2.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	22
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	23
3.1.ΥΛΙΚΑ.....	23
3.2.ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.2.1.ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	24
3.2.2.ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ .....	28
3.2.3.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ.....	29
3.2.4.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ .....	30
3.2.5.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ .....	31
3.2.6.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ .....	33
3.2.7.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ.....	34
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	37
4.1.ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ PELLETS.....	37
4.2.ΒΑΡΟΣ .....	41
4.3.ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΥΘΗΣΜΟΙ .....	43
4.4.ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ .....	45
4.4.1.ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ .....	46
4.4.2.ΟΛΙΚΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ.....	48
4.5.ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ .....	50
4.6.ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ.....	52
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62
---------------------	----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ζήτηση πλαστικού στην Ευρώπη, 2015 .....	1
Εικόνα 2: Παραγωγή Πλαστικού Παγκοσμίως.....	2
Εικόνα 3: Πηγές θαλάσσιας ρύπανσης από πλαστικά απορρίμματα) .....	3
Εικόνα 4: Χώρες που ρυπαίνουν τον ωκεανό περισσότερο .....	4
Εικόνα 5: Συγκέντρωση μικροπλαστικών στους ωκεανούς παγκοσμίως .....	5
Εικόνα 6: (Δεξιά) Μικρόκοκκοι πλαστικών, (αριστερά) Μικροσφαιρίδια (pellets) .....	6
Εικόνα 7: Δευτερογενή μικροπλαστικά .....	7
Εικόνα 8: Χημικοί Μηχανισμοί Διάσπασης PP,PS και PE κατά τη διάρκεια της φωτο-αποδόμησης .....	9
Εικόνα 9: Μονοπάτια αποδόμησης πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον.....	11
Εικόνα 10: Απεικόνιση νανοπλαστικών με τη βοήθεια μικροσκοπίου.....	12
Εικόνα 11: Φώκια παγιδευμένη σε κομμάτι πλαστικού Horsey Beach, Norfolk. ....	14
Εικόνα 12: Πελαργός παγιδευμένος σε πλαστική σακούλα, Ισπανία .....	14
Εικόνα 13: Χελώνα μπερδεύει την πλαστική σακούλα για τσούχτρα, Ερυθρά Θάλασσα .....	15
Εικόνα 14: Είδη ζωοπλαγκτόν που τράφηκαν με μικροπλαστικά .....	17
Εικόνα 15: Συσώρευση πλαστικών σκουπιδιών ,Καραϊβική Θάλασσα.....	19
Εικόνα 16: Χημικός μοριακός τύπος πουλστυρενίου .....	19
Εικόνα 17: Χημικός μοριακός τύπος πολυπροπυλενίου.....	21
Εικόνα 18: Η ευρωπαϊκή ζήτηση πλαστικών πολυμερών το 2016 .....	21
Εικόνα 19: Pellets PS και PP σε γυάλινο πυρίμαχο σκεύος έτοιμα για ακτινοβόληση .....	23
Εικόνα 20: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	25
Εικόνα 21 : UV-VIS Φασματοφωτόμετρο.....	26
Εικόνα 22: Πειραματική Διάταξη.....	28
Εικόνα 23: Κωνικές φλάσκες με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, μικροοργανισμούς και pellets (Αριστερά PP- Δεξιά PS).....	28
Εικόνα 24: Ζυγαριά ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων.....	29
Εικόνα 25: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	30
Εικόνα 26: Κυψελίδες με εμφανή τον σχηματισμό του έγχρωμου συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης .....	32
Εικόνα 27: Φιαλίδια με εμφανή τον σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης με τα προϊόντα πέψης των υδατανθράκων. ....	33
Εικόνα 28: Ογκομετρικός κύλινδρος για τη μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης .....	34
Εικόνα 29: Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους πλαστικών .....	34
Εικόνα 30: Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός.....	35
Εικόνα 31: Σκέδαση/Περίθλαση φωτός από το σωματίδιο.....	36
Εικόνα 32: Αλλαγή χρώματος στα pellets PP εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας .....	38
Εικόνα 33: Αλλαγή χρώματος στα pellets PS εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας.....	38
Εικόνα 34: Μικροσφαιρίδια (pellets) PS.....	39
Εικόνα 36: Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση $10^{-2}$ .....	43
Εικόνα 37: Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση $10^{-4}$ .....	43
Εικόνα 38: Σχηματισμός biofilm.....	46

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Συνολική ακτινοβολία έκθεσης σε περίοδο 4 μηνών .....	24
Διάγραμμα 2: Θερμοκρασία θαλάμου ακτινοβολήσεως σε περίοδο 4 μηνών.....	37
Διάγραμμα 3: Ένταση ακτινοβολίας θαλάμου σε περίοδο 4 μηνών .....	37
Διάγραμμα 4: Ταχύτητα καθίζησης pellets PS, κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσεως με UV-A .....	40
Διάγραμμα 5: Μείωση Βάρους pellets PP ανά μήνα .....	41
Διάγραμμα 6: Μείωση Βάρους pellets PS ανά μήνα .....	41
Διάγραμμα 7: Αριθμός αποικιών στο δείγμα 'NEPO' .....	44
Διάγραμμα 8: Αριθμός αποικιών στο δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ' .....	45
Διάγραμμα 9: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο δείγμα 'NEPO' .....	47
Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ' .....	48
Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση υδατανθράκων στο δείγμα 'NEPO' .....	49
Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση υδατανθράκων στο δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ' .....	49
Διάγραμμα 13: Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS) .....	51
Διάγραμμα 14: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάσει του αριθμού τους (Number) .....	52
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάσει του όγκου τους (Volume) .....	53
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάσει του αριθμού τους (Number) .....	54
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάσει του όγκου τους (Volume) .....	55
Διάγραμμα 18: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PP βάσει του αριθμού τους ανά μήνα (Number).....	56
Διάγραμμα 19: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PS βάσει του όγκου τους ανά μήνα (Volume) .....	57
Διάγραμμα 20: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PS βάσει του αριθμού τους ανά μήνα (Number).....	58
Διάγραμμα 21: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου μικροσωματιδίων PS βάσει του όγκου τους ανά μήνα (Volume) .....	59



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

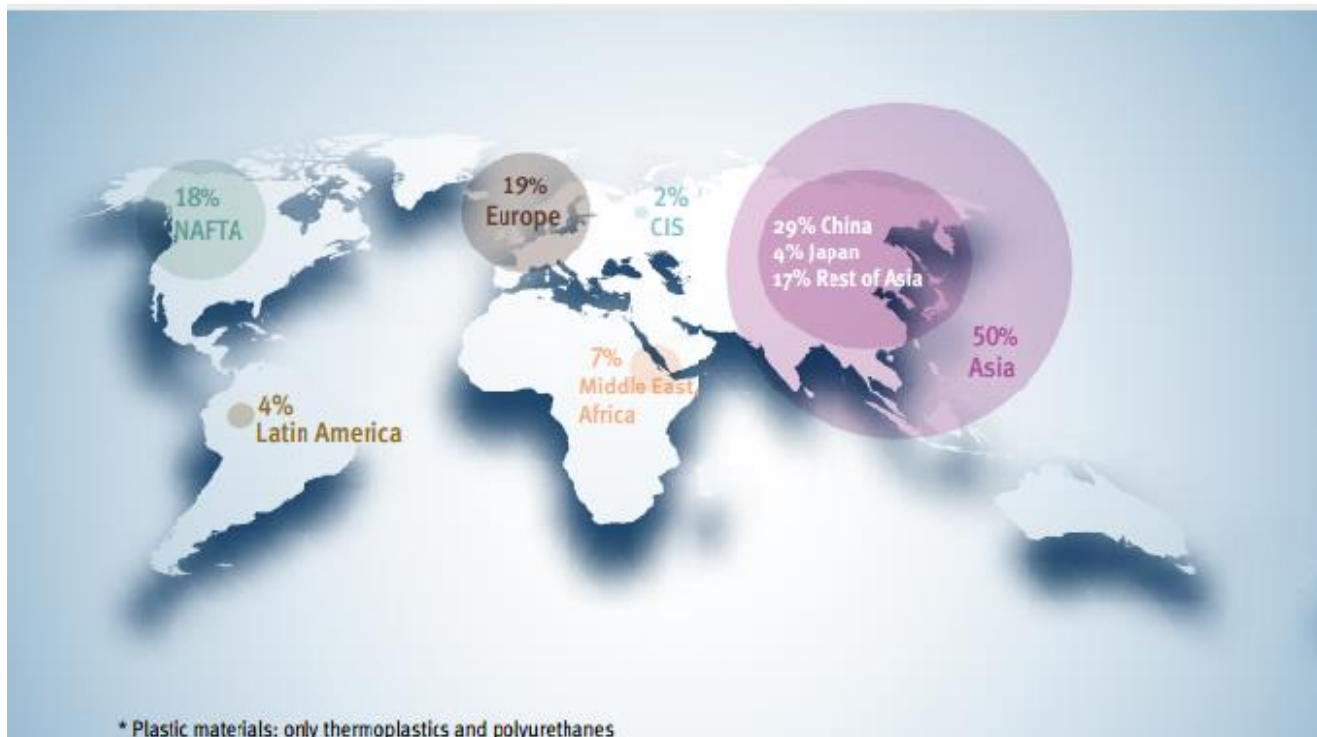
### 1.1.ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Τα πλαστικά διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη σύγχρονη κοινωνία, βρίσκοντας εφαρμογή σε εκτεταμένες εμπορικές, βιομηχανικές και φαρμακευτικές δραστηριότητες. Αποτελούν σημαντικά υλικά που χρησιμοποιούνται καθημερινά από τον άνθρωπο και έχουν μεταβάλλει σημαντικά την ποιότητα ζωής του. Η ανθεκτικότητά τους, το χαμηλό κόστος και η καλή μηχανική αντοχή του, καθιστούν τα πλαστικά πολύ δημοφιλή στους καταναλωτές. Επίσης τα χαμηλά κόστη παραγωγής, οι εξίσου μικρές απαιτήσεις σε πρώτες ύλες και ενέργεια, οι απλές παραγωγικές διαδικασίες και η μεγάλη ποικιλία των πλαστικών βοήθησαν να αναπτυχθεί μια ακμάζουσα βιομηχανία γύρω από την παραγωγή τους (PlasticsEurope 2015).



Εικόνα 1: Ζήτηση πλαστικού στην Ευρώπη, 2015 (Πηγή : [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))

Ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει αυξηθεί δραματικά. Από το 1960 η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει εικοσπλασιαστεί (322 εκατομμύρια τόνους το 2015), και αναμένεται να διπλασιαστεί ξανά την επόμενη 20ετία. Η Ασία είναι η ήπειρος με τη μεγαλύτερη παραγωγή πλαστικού παγκοσμίως με μια οικονομία που βασίζεται κυρίως στη παραγωγή πλαστικού. Αξιοσημείωτο είναι ότι η Κίνα παρασκευάζει το ¼ του πλαστικού παγκοσμίως. Δεύτερη σε κατάταξη παγκοσμίως έρχεται η Ευρώπη, με ποσοστό 19 %. Ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η Γερμανία κυριαρχεί στην παραγωγή πλαστικού λόγω της τεράστιας βιομηχανικής ανάπτυξης της (PlasticsEurope 2015).

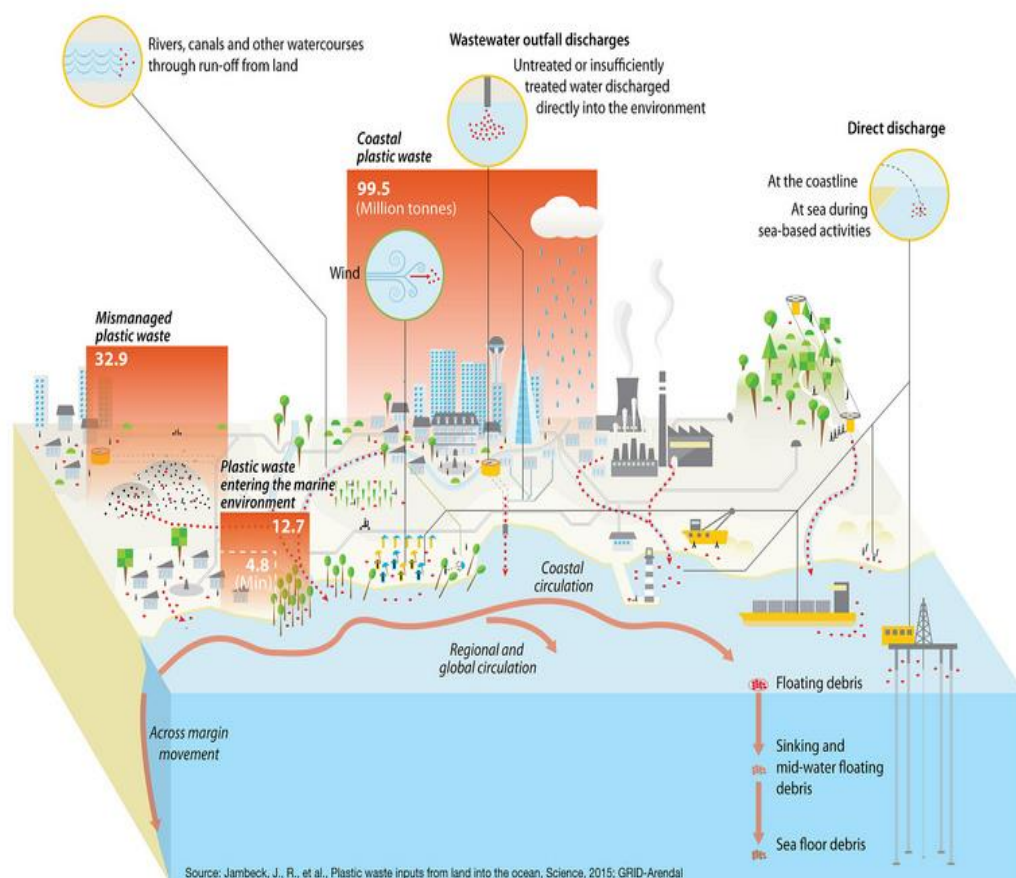


Εικόνα 2: Παραγωγή Πλαστικού Παγκοσμίως (Πηγή: [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))

Η τεράστια ζήτηση πλαστικών προϊόντων παράλληλα επιφέρει και αυξημένη παραγωγή πλαστικών αποβλήτων. Το 2016, στην Ευρώπη, η Νορβηγία και η Ελβετία παρήγαγαν 60 εκατομμύρια τόνους πλαστικών δημιουργώντας 27 εκατομμύρια τόνους πλαστικών αποβλήτων. Μόλις το 31% των αποβλήτων ανακυκλώθηκε, ενώ το 27% κατέληξε σε χωματερές, και τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ενέργειας ως καύσιμο υλικό (PlasticsEurope 2015).

Η θαλάσσια ρύπανση από πλαστικό αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα και αυξανόμενο σοβαρό κίνδυνο για τη βιοποικιλότητα, την υγεία των ανθρώπων και του οικοσυστήματος, την οικονομία και την κοινωνία. Οι σημερινές εκτιμήσεις κάνουν λόγο για πάνω από 150 εκατομμύρια τόνους πλαστικών στον ωκεανό (Thompson et al. 2009). Κάθε θαλάσσια περιοχή έχει το δικό της ρυπαντικό αποτύπωμα όσον αφορά στον τύπο των απορριμμάτων και κυρίως τις πηγές που την ρυπαίνουν. Τα πλαστικά απορρίμματα αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες πηγές θαλάσσιας ρύπανσης παγκοσμίως, καθώς το 60-80% των απορριμμάτων που καταλήγουν στη θάλασσα αποτελούνται από πλαστικό. Από το ποσοστό αυτό, το 80% προέρχεται από χερσαίες πηγές ενώ το υπόλοιπο 20% από θαλάσσιες δραστηριότητες. Ρυπαντικές χερσαίες δραστηριότητες είναι οι ανεξέλεγκτες χωματερές, η απευθείας απόρριψη στις ακτές, τα αστικά κέντρα, οι βιομηχανίες, οι τουριστικές εγκαταστάσεις, κ.α. Θαλάσσιες πηγές θεωρούνται η ναυσιπλοΐα (εμπορικός και επιβατικός στόλος, σκάφη αναψυχής) και η αλιεία (αλιευτικός στόλος, ιχθυοκαλλιέργειες) (Andrady 2011).

## Pathways and fluxes of plastics into the oceans

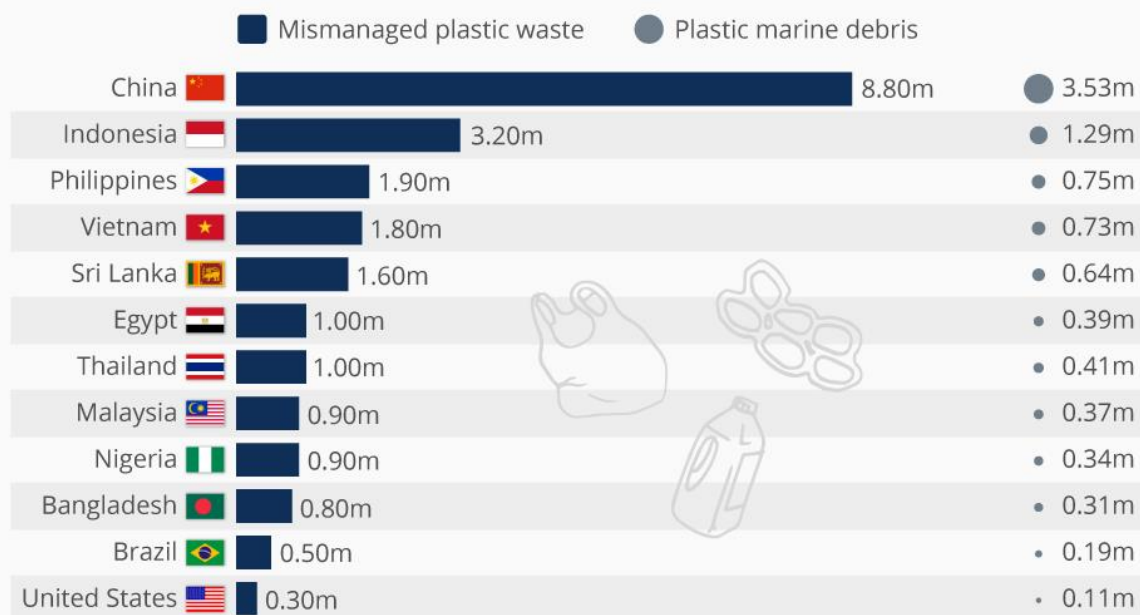


Εικόνα 3: Πηγές θαλάσσιας ρύπανσης από πλαστικά απορρίμματα (Πηγή: <http://www.grida.no/resources/6921>)

Ωστόσο οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διασπορά και την τύχη των θαλάσσιων απορριμμάτων είναι πολλοί. Οι βροχοπτώσεις, οι απορροές, η ροή των ποταμών, τα θαλάσσια ρεύματα, οι άνεμοι και η γεωμορφολογία κάθε περιοχής μπορεί να επηρεάσουν την προέλευση των απορριμμάτων. Σημαντικό ρόλο παίζει και η ίδια η φύση κάθε απορρίμματος, όπως για παράδειγμα η πλευστότητα και η ανθεκτικότητά του. Έτσι, τα απορρίμματα μπορεί να συγκεντρώνονται κοντά στο σημείο απόρριψής τους, αλλά και να ταξιδεύουν για πολλά χρόνια από τη στιγμή που εισήλθαν στη θάλασσα, καλύπτοντας πολύ μεγάλες αποστάσεις (UNEP 2015).

## The Countries Polluting The Oceans The Most

Annual metric tons of mismanaged plastic waste and total amount ending up in global waters\*



\* Generated in 2010 (selected countries)  
Source: The Wall Street Journal

statista

Εικόνα 4: Χώρες που ρυπαίνουν τον ωκεανό περισσότερο (Πηγή : <https://www.statista.com>)

### 1.2.ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα που επηρεάζουν τα υδάτινα οικοσυστήματα αποτελούν τα μικροπλαστικά, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν διαφορετικές αναφορές για το εύρος του μεγέθους των μικροπλαστικών και κατά συνέπεια των διαχωρισμό των κλάσεων μεγέθους. Σύμφωνα με τους Graham και Thompson (2009), μικροπλαστικά ορίζονται ως τα σωματίδια με διάμετρο  $<10$  mm, ενώ σύμφωνα με άλλες έρευνες μικροπλαστικά ορίζονται ως τα σωματίδια με διάμετρο μικρότερη των 6 mm και 5 mm (Barnes et al. 2009;Derraik 2002). Ωστόσο, πρόσφατα προτάθηκε από τον Andrady (2011), την διάκριση των μικροπλαστικών από τα μακροπλαστικά, με τα τελευταία να έχουν μικρό μέγεθος μεν, αλλά να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Σα μικροπλαστικά ορίζονται τα σωματίδια με διάμετρο  $< 5$  mm που δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι, μόνο με τη βοήθεια κατάλληλων οργάνων π.χ. ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Thompson et al. 2004).

## Plastic pollution released into the world's oceans

The global release of primary microplastics into oceans is estimated at 1.5 million tons per year



Εικόνα 5: Συγκέντρωση μικροπλαστικών στους ωκεανούς παγκοσμίως (Πηγή : <https://www.iucn.org>)

### 1.2.1.ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Τα μικροπλαστικά που συναντώνται στο υδάτινο περιβάλλον διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας τους και την προέλευση τους σε δυο κατηγορίες:

- Τα πρωτογενή μικροπλαστικά
- Τα δευτερογενή μικροπλαστικά

#### Πρωτογενή μικροπλαστικά

Τα πρωτογενή μικροπλαστικά (PMs, Primary Microplastics) είναι τα μικροπλαστικά που απελευθερώνονται στο περιβάλλον απευθείας με τη μορφή μικρών σωματιδίων. Περιέχονται σε προϊόντα καθημερινής περιποίησης και καλλυντικά (π.χ. οδοντόκρεμα, αφρός ξυρίσματος, κρέμες απολέπισης, αντηλιακά, σαμπουάν, αποσμητικά κ.λπ.), καθώς επίσης εμπεριέχονται σαν συνθετικές μικροίνες στα συνθετικά υφάσματα και απελευθερώνονται κατά την πλύση (Zitko and Hanlon 1991). Οι πλαστικοί αυτοί μικρόκοκκοι, λόγω του μικρού τους μεγέθους, διαφεύγουν από τα φίλτρα των πλυντηρίων και των μονάδων βιολογικού καθαρισμού, αντίστοιχα καταλήγοντας στο θαλάσσιο περιβάλλον. Επίσης ένα μεγάλο ποσοστό πρωτογενών μικροπλαστικών που απελευθερώνονται στα θαλάσσια οικοσυστήματα είναι τα μικροσφαιρίδια (pellets) που αποτελούν την πρώτη ύλη στη βιομηχανία πλαστικών. Τα μικροσφαιρίδια διαφεύγουν από το σημείο παραγωγής τους ή κατά την μεταφορά τους και με τη βοήθεια του ανέμου ή του θαλάσσιου κυματισμού, διασκορπίζονται και ρυπαίνουν έδαφος και νερό (Weber 1993). Τα πρωτογενή μικροπλαστικά αξιοποιούνται σε πολλούς τομείς όπως σε φαρμακευτικά προϊόντα, διαδικασίες αμμοβολής με συνθετικά υλικά για χύτευση και σε ποικίλες εφαρμογές ως πλαστικά νάνο-



σωματίδια (Derraik 2002; Gregory 1996). Μπορούν να προέλθουν επίσης από την τριβή μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων κατά την κατασκευή τους π.χ. διάβρωση ελαστικών κατά την οδήγηση καθώς είναι κατασκευασμένα από συνθετικά πολυμερή αναμεμιγμένα με καουτσούκ.



Εικόνα 6: (Δεξιά) Μικρόκοκκοι πλαστικών, (αριστερά) Μικροσφαιρίδια (pellets)

(Πηγή : <https://www.flickr.com>)

#### Δευτερογενή μικροπλαστικά

Τα δευτερογενή μικροπλαστικά (SMs, Secondary Microplastics) αποτελούν μικροσκοπικά πλαστικά υπολείμματα που προέρχονται από τον κατακερματισμό μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων (Ryan et al. 2009; Thompson et al. 2004). Με την πάροδο του χρόνου και ενώ τα πλαστικά παραμένουν στο υδάτινο περιβάλλον, μια σειρά βιολογικών, χημικών και φυσικών διεργασιών λαμβάνουν χώρα με αποτέλεσμα τη μείωση της δομικής τους ακεραιότητας και τον σταδιακό κατακερματισμό τους σε μικρότερα κομμάτια (Barnes et al. 2009). Συγκεκριμένα η έκθεση των πλαστικών στην ηλιακή ακτινοβολία UV έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση της πολυμερικής αλυσίδας και το σπάσιμο των δεσμών της, οδηγώντας στο σχηματισμό ρηγματώσεων και αλλοιώσεων στο χρώμα τους (Andrady 2011; Barnes et al. 2009; Moore 2008). Με την πάροδο του χρόνου γίνονται όλο και πιο ευαίσθητα στη διάβρωση που προκαλείται από την δράση των κυμάτων, του αέρα και των θαλάσσιων ρευμάτων (Barnes et al. 2009; Browne et al. 2007). Υπάρχουν μικροπλαστικά τα οποία αποδομούνται περαιτέρω δημιουργώντας τα νανοπλαστικά, όπου ανιχνεύονται πλέον σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους ωκεανούς (Galgani et al. 2010). Η παρουσία νανοπλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι πιθανό να έχει αυξανόμενη σημασία στα επόμενα χρόνια επηρεάζοντας τους υδρόβιους μικροοργανισμούς καταλήγοντας στην τροφική αλυσίδα .



Εικόνα 7: Δευτερογενή μικροπλαστικά (Πηγή : <https://www.flickr.com>)

### 1.3.ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Αν και τα περισσότερα πλαστικά δεν βιοαποδομούνται, με την επίδραση διαφόρων παραγόντων μπορούν να αποδομηθούν. Η αποδόμηση είναι μια χημική αλλαγή που μειώνει δραστικά το μέσο μοριακό βάρος του πολυμερούς. Δεδομένου ότι η μηχανική ακεραιότητα των πλαστικών εξαρτάται πάντοτε από το υψηλό μέσο μοριακό τους βάρος, κάθε σημαντική αλλαγή του μοριακού βάρους , μπορεί να αλλάξει τη δομική ακεραιότητα του πλαστικού. Τα γηρασμένα πλαστικά γίνονται αρκετά εύθραυστα ώστε να κατακερματίζονται και να μετατραπούν σε θραύσματα. Ακόμη και αυτά τα θραύσματα, που συχνά δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι, μπορεί να υποβληθούν σε περαιτέρω αποδόμηση (γενικά μέσω μικροβιακών κοινοτήτων που αποικίζουν στην επιφάνειά τους) με τον άνθρακα στο πολυμερές να μετατρέπεται σε CO<sub>2</sub> (και έτσι ενσωματώνονται στη θαλάσσια βιομάζα) (Andrady 1994).

Η αποδόμηση των σύνθετων πολυμερών μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, την αβιοτική και την βιοτική αποδόμηση, ακολουθώντας η καθεμία διαφορετικούς φυσικούς, χημικούς ή βιολογικούς μηχανισμούς. Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας, τα πολυμερή μετατρέπονται σε μικρότερες μοριακές μονάδες (ολιγομερή, μονομερή κλπ.). Οι σημαντικότερες διεργασίες για την αποδόμηση των πλαστικών είναι:

- **Φώτο-αποδόμηση (Photodegradation):** Εξαιτίας της UV ακτινοβολίας
- **Χημική Υποβάθμιση (Chemical Degradation):** Θερμο-Οξείδωση και Υδρόλυση
- **Βιοαποδόμηση από μικροοργανισμούς και αυτότροφους οργανισμούς (Biodegradation):** Βακτήρια, Φύκι, Άλγη

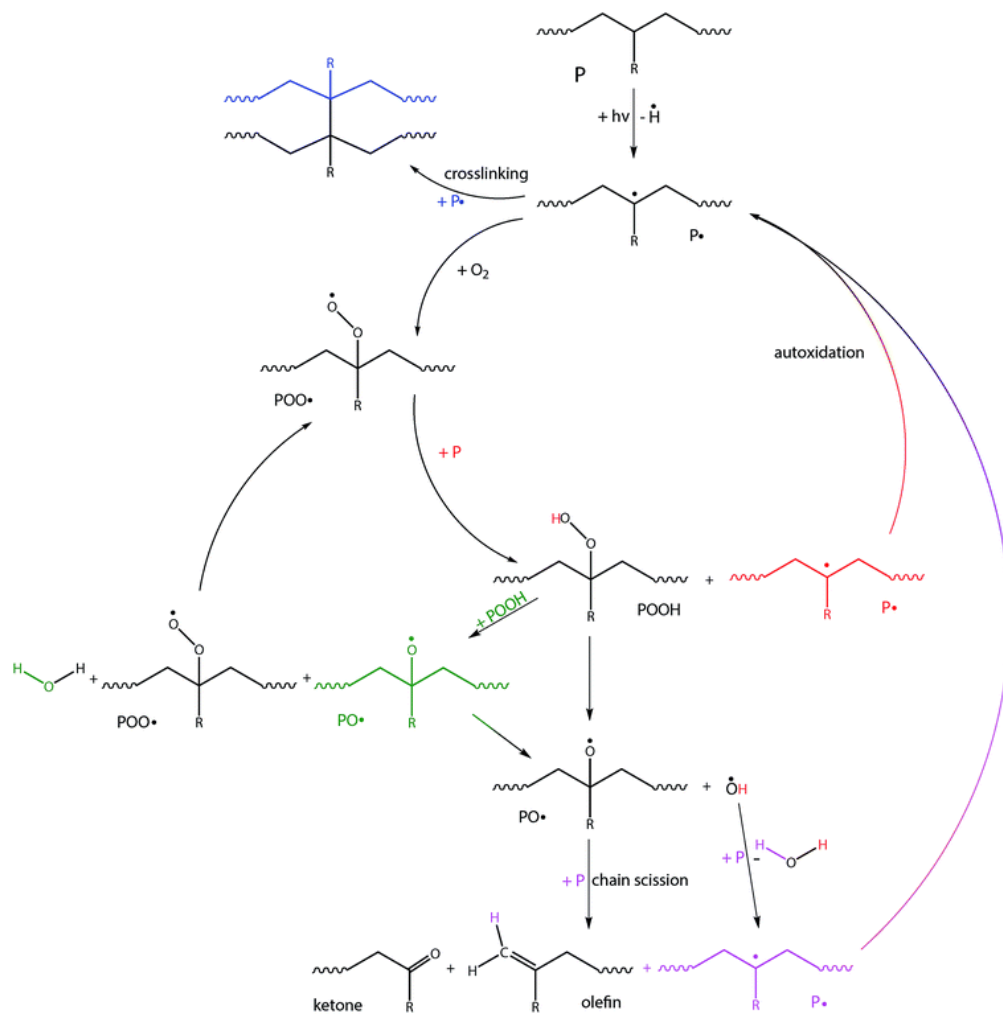
### Φώτο-αποδόμηση (Photodegradation)

Η διαδικασία της φωτο-αποδόμησης ενός πλαστικού στο θαλάσσιο περιβάλλον επιτυγχάνεται από την επίδραση της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας (UV). Με την επίδραση της UV ακτινοβολίας, λαμβάνουν χώρα φυσικές και χημικές μεταβολές στην δομή του πολυμερούς, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ιδιοτήτων του. Η υπεριώδης ακτινοβολία, αν και βρίσκεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά στο ηλιακό φάσμα, μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση στα πλαστικά λόγω του υψηλού περιεχομένου σε κβαντική ενέργεια. Η ενέργεια της υπεριώδους ακτινοβολίας απορροφάται επιλεκτικά από τους ακόρεστους δεσμούς της πολυμερικής αλυσίδας, προκαλώντας διάρρηξη των δεσμών, με ταυτόχρονη δημιουργία δυο ελεύθερων ριζών. Αυτό έχει ως αποτελέσματα, η δομική ακεραιότητα του πλαστικού να υποβαθμίζεται σταδιακά. Αναλυτικά η φώτο-αποδόμηση διακρίνεται στα εξής 3 στάδια:

1. Έναρξη (Initiation): Στο στάδιο αυτό οι χημικοί δεσμοί της πολυμερικής αλυσίδας διασπώνται από το φώς (ή τη θερμότητα). Για την έναρξη της φωτοαποδόμησης τα πολυμερή πρέπει να περιέχουν ακόρεστες χρωμοφόρες ομάδες που απορροφούν την ενέργεια του φωτός (Gijsman et al. 1999). Το PE και το PP δεν περιέχουν ακόρεστους διπλούς δεσμούς στην ραχοκοκαλιά του πολυμερούς. Ωστόσο μικρές ποσότητες εξωτερικών ή δομικών προσμίξεων που ενσωματώνονται στη μακρομοριακή αλυσίδα επιτρέπουν την έναρξη της φωτοεκκίνησης σε κάποιο βαθμό. Η διάσπαση των δεσμών C-H έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Το μήκος κύματος που προκαλεί τη μέγιστη διάρρηξη στους δεσμούς σε ένα συγκεκριμένο πλαστικό εξαρτάται από το είδος των δεσμών και για αυτό η μέγιστη αποδόμηση επιτυγχάνεται σε διαφορετικό μήκος κύματος για διαφορετικούς τύπους πλαστικού. Για το πολυπροπυλένιο το καταστροφικό μήκος κύματος είναι 370nm ενώ για το πολυστυρένιο είναι 318nm (Singh and Sharma 2008).
2. Διάδοση (Propagation): Στο στάδιο της διάδοσης, η ρίζα του πολυμερούς αντιδρά με οξυγόνο και σχηματίζει μια ρίζα υπεροξειδίου. Στο στάδιο αυτό, πέρα από το υπεροξείδιο, λαμβάνουν χώρα και άλλες οξειδωτικές αντιδράσεις (Oxidative reactions). Η διάδοση οδηγεί σε διάσπαση της αλυσίδας (chain scission) ή δημιουργία διασταυρωμένης σύνδεσης (cross linking) (Tolinski 2009). Μία διασταυρούμενη σύνδεση (cross-link) είναι ένας δεσμός που συνδέει μία αλυσίδα πολυμερούς με μία άλλη. Μπορεί να αποτελείται από ομοιοπολικούς δεσμούς ή από ιοντικούς δεσμούς. Όταν οι πολυμερικές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με διασταυρούμενες συνδέσεις (cross-links), χάνουν την ικανότητά τους να κινούνται ως μεμονωμένες πολυμερικές αλυσίδες.
3. Τερματισμός (Termination): Ο τερματισμός της φωτο-αποδόμησης επιτυγχάνεται με τη δημιουργία αδρανών προϊόντων (ολεφίνες, αλδεΐδες και κετόνες). Αυτό μπορεί να συμβεί φυσικά με το συνδυασμό των ελεύθερων ριζών ή μπορεί να ενισχυθεί με τη χρήση σταθεροποιητών στο πλαστικό (Peacock 2000). Καθώς μειώνεται το μοριακό βάρος των πολυμερών, το υλικό γίνεται εύθραυστο και υποβαθμίζονται οι μηχανικές του ιδιότητες.

Οι χημικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την διεργασία της φωτο-αποδόμησης όπως αναφέρθηκαν παραπάνω παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα :





Εικόνα 8: Χημικοί Μηχανισμοί Διάσπασης PP, PS και PE κατά τη διάρκεια της φωτο-αποδόμησης (Πηγή: Gewert et al. 2015)

### Χημική Υποβάθμιση

#### Θερμοκρασία (Θερμο-οξείδωση)

Η γήρανση είναι μία διαδικασία υποβάθμισης η οποία εξαρτάται από την θερμοκρασία. Όσο πιο υψηλή η θερμοκρασία τόσο πιο μεγάλο το ποσοστό γήρανσης. Ο γενικός κανόνας είναι για 10°C αύξηση της θερμοκρασίας ο ρυθμός γήρανσης διπλασιάζεται. Σε τροπικές λοιπόν περιοχές ο ρυθμός γήρανσης των πλαστικών αυξάνεται, καθώς υπάρχει αυξημένη έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία και θερμοκρασία. Οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την διεργασία της θερμικής υποβάθμισης των πλαστικών οδηγούν σε οπτικές αλλαγές και αλλαγές των φυσικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα η θερμική υποβάθμιση του πλαστικού μπορεί να οδηγήσει σε δυσκαμψία, αλλαγές στην πυκνότητα και στις ρεολογικές ιδιότητες, δυσθραυστότητα, ψαθυροποίηση, ρωγμές, αλλαγή χρώματος κλπ .

### Βιοαποδόμηση Μικροπλαστικών

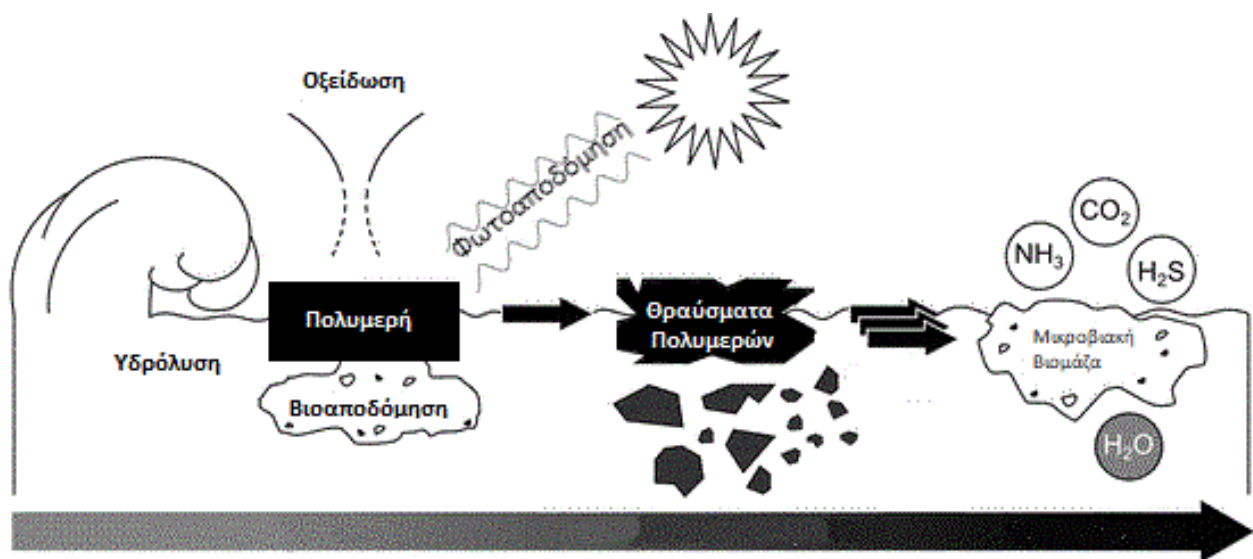
Η βιοαποδόμηση των συνθετικών πολυμερών μπορεί να συμβεί σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, αερόβια και αναερόβια. Η έκταση της αποδόμησης των πολυμερών σε CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, άλατα, ανόργανα άλατα και βιομάζα, μπορεί να είναι πλήρης ή μερική (Grima et al. 2000). Η βιοαποδόμηση συσχετίζεται με τρία βασικά κριτήρια:

1. Πρέπει να υπάρχουν μικροοργανισμοί που μπορούν να αποπολυμερίσουν την στοχευόμενη ουσία και να ανοργανοποιήσουν τις μονομερείς ενώσεις με ένζυμα κατάλληλης μεταβολικής οδού.
2. Οι περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία και η αλατότητα, πρέπει να παρέχουν τις συνθήκες που είναι απαραίτητες για τη βιοαποδόμηση.
3. Η μορφολογία των πολυμερών σωματιδίων πρέπει να ευνοεί την προσκόλληση των μικροοργανισμών και το σχηματισμό ενός βιοφίλμ, ενώ η δομή του πολυμερικού υποστρώματος, π.χ. χημικοί δεσμοί, βαθμός πολυμερισμού, βαθμός διακλάδωσης και παράμετροι όπως υδροφοβικότητα ή κρυσταλλικότητα, δεν πρέπει να παρεμποδίζουν τις μικροβιακές δράσεις.

Το τελικό στάδιο της βιολογικής αποδόμησης είναι η διάσπαση των πλευρικών αλυσίδων ή του σκελετού του πολυμερούς και ο σχηματισμός μικρότερων μονάδων πολυμερούς (μονομερή, ολιγομερή) από εξωκυτταρικά ένζυμα (Gu and Gu 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτό το πρώτο στάδιο αποπολυμερισμού περιλαμβάνει μία ενζυματικά καταλυόμενη υδρόλυση αμιδίων, εστέρων ή δεσμών ουρεθάνης. Αυτά τα μικρότερα μόρια μπορούν στη συνέχεια να απορροφηθούν από μικροοργανισμούς και να μεταβολιστούν. Φυσικά, η αβιοτική υδρόλυση μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ενδιάμεσα προϊόντα που στη συνέχεια περαιτέρω μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς (Müller et al. 2001). Ωστόσο, τα περισσότερα από τα πλαστικά που απαντώνται στο περιβάλλον είναι αδιάλυτα στο νερό και πολλά από τα συνθετικά πολυμερή που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον, όπως το PE, το PP, το PS και το PET, αποδομούνται πολύ αργά ή καθόλου. Η αποδόμηση αυτών των πολυμερών είναι συνήθως ένας συνδυασμός αβιοτικών και βιοτικών οδών αποδόμησης. Οι πολυολεφίνες, όπως το PE και PP, συνήθως δεν είναι βιοαποδομήσιμα, καθώς ο σκελετός αλκυλίου δεν είναι ελεύθερος για μικροοργανισμούς και πρέπει να υποβληθεί σε αβιοτικό μετασχηματισμό. Η αλκυλική ραχοκοκαλιά των πολυολεφινών προσφέρει υψηλή αντίσταση κατά της υδρόλυσης αλλά είναι συνήθως επιδεκτική σε οξειδωτική αποδόμηση. Μετά την αρχική οξείδωση της επιφάνειας των πολυολεφινών, η αποδόμηση μπορεί να συμβεί σε μερικές εβδομάδες, αλλά οδηγεί στον σχηματισμό μικροπλαστικών ως πιθανών ενδιάμεσων. Αυτά τα μικρότερα και οξειδωμένα πλαστικά θραύσματα είναι πιο ευαίσθητα σε μικροβιακή επίθεση, καθώς με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων ο λόγος όγκου/επιφάνεια αυξάνεται δραματικά και τα επίπεδα οξείδωσης είναι υψηλότερα, ενισχύοντας το δυναμικό βιοαποδόμησής τους (Weinstein et al. 2016).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την υποβάθμιση των πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι οι κλιματικές συνθήκες που μπορεί να επικρατούν. Για παράδειγμα όταν το μικροπλαστικό βρίσκεται σε υδάτινο περιβάλλον, ο ρυθμός υποβάθμισης μειώνεται καθώς υπάρχει χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου και χαμηλότερη θερμοκρασία σε σύγκριση με τον αέρα ή την ξηρά (π.χ. ακτή). Από την άλλη ο ρυθμός κατακερματισμού των μικροπλαστικών στις παραλίες αυξάνεται

καθώς υπάρχει εντονότερη επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, του αέρα και κατ'επέκταση του οξυγόνου (Thompson et al. 2004). Οι περισσότερες συνθήκες υποβάθμισης είναι πολύ πιο αργές σε ζεστά ξηρά κλίματα σε σχέση με τα ζεστά υγρά κλίματα (Thompson et al. 2004). Η μηχανική υποβάθμιση των πλαστικών (κύματα, αναταράξεις, αέρα, ρεύματα κλπ.) είναι ένας σημαντικός παράγοντας όσον αφορά την τύχη των πλαστικών στο υδάτινο περιβάλλον. Στις περισσότερες περιπτώσεις η υποβάθμιση του πολυμερούς από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις, όπως η φωτοαποδόμηση ή η χημική αποδόμηση, αλλάζει τις ιδιότητες του πολυμερούς και οδηγεί σε θραύση του. Στη συνέχεια το υλικό τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια λόγω των δυνάμεων τριβής που δέχεται. Συνεπώς η μηχανική υποβάθμιση οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και κατά συνέπεια αύξηση της επιφάνειάς τους.



Εικόνα 9: Μονοπάτια αποδόμησης πλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον (Πηγή: Klein et al. 2018)

#### Μηχανισμοί μεταφοράς μικροπλαστικών

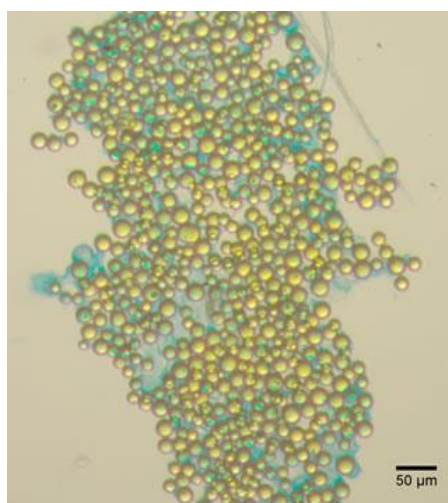
Τα πλαστικά απορρίμματα υπάρχουν σχεδόν σε όλες τις ωκεάνιες και παραθαλάσσιες περιοχές, καθώς εμφανίζονται από τον ισημερινό μέχρι και τους πόλους, από ανθρωπογενή αστικά κέντρα μέχρι και απομακρυσμένες περιοχές. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα μεγάλο κενό γνώσης της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας για τους μηχανισμούς μεταφοράς και εναπόθεσης με τους οποίους τα μικροπλαστικά χαμηλής πυκνότητας φθάνουν στα ιζήματα του πυθμένα. Πολλά από τα πλαστικά που καταλήγουν στις επιφάνειες της θάλασσας, βυθίζονται κατά μήκος της στήλης ύδατος, μετατρέποντας τον βυθό της θάλασσας σε έναν τεράστιο σκουπιδότοπο. Ωστόσο ένα μέρος των πλαστικών που καταλήγει στη θάλασσα, δεν βυθίζεται και παραμένει στην επιφάνεια π.χ. το PE που έχει ειδική πυκνότητα χαμηλότερη του νερού και δεν βυθίζεται. Υπάρχει όμως η περίπτωση πλαστικά χαμηλής πυκνότητας να βυθιστούν, εξαιτίας της βιολογικής ρύπανσης που αυξάνει την ειδική πυκνότητα του πλωτού υλικού που αποικίζει (Barnes et al. 2009). Η βιο-συσσώρευση στο

πλαστικό είναι μια διαδοχική συσσώρευση οργανικής ύλης και μικροοργανισμών. Με τη διέγερση της υδροφοβικότητας των πλαστικών, διεγείρεται και η απορροφητικότητα του πλαστικού σε οργανικές ουσίες, δημιουργώντας ένα στρώμα στο οποίο αποικίζουν αρχικά βακτηριακές κοινότητες και μικροφύκη μέχρι και ασπόνδυλοι μικροοργανισμοί (Andrady 2011). Η ταχύτητα αποικισμού εξαρτάται από τον τύπο του πολυμερούς, την ειδική πυκνότητα, την ενέργεια επιφάνειας και την τραχύτητα. Διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος νερού, τη γεωγραφική περιοχή και την εποχή (Andrady 2011).

Μικροπλαστικά υψηλής πυκνότητας, όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο, ο πολυεστέρας και το πολυαμίδιο, πιθανότατα βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο βενθικό οικοσύστημα του πυθμένα. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μικροπλαστικών στον πυθμένα παρεμποδίζεται από το κόστος και τις δυσκολίες δειγματοληψίας (Barnes et al. 2009).

#### 1.4. ΝΑΝΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Τα νανοπλαστικά ορίζονται ως σωματίδια με μέγεθος που κυμαίνεται από 1 έως 100 nm (Derraik 2002). Η ποσότητα των νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον δεν είναι γνωστή, δεδομένου ότι οι περισσότερες τεχνικές αναλύσεις εξαιρούν τα σωματίδια αυτά λόγω μεγέθους (Mattsson et al. 2015). Τα δεδομένα σχετικά με τις επιπτώσεις των πλαστικών νανοσωματιδίων στη θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα είναι περιορισμένα. Έχει βρεθεί ότι τα νανοπλαστικά μπορούν να καταναλωθούν από μονοκύτταρα θαλάσσια πρωτόζωα (βλεφαριδωτά ή μαστιγοφόρα), που τα περικλείουν και τα ενσωματώνουν στο εσωτερικό τους με μια διαδικασία γνωστή ως φαγοκυττάρωση (Cole et al. 2011). Τα πλαστικά νανοσωματίδια μπορούν να εισέλθουν στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα είτε ως σωματίδια που προέκυψαν από τον κατακερματισμό των μικροσωματιδίων είτε ως πλαστικά σωματίδια κατασκευασμένα σε νάνο μέγεθος για εμπορικούς σκοπούς. Εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω των φυκιών και των βακτηρίων τα οποία στη συνέχεια καταναλώνονται από μεγαλύτερους οργανισμούς (Mattsson et al. 2015).



Εικόνα 10: Απεικόνιση νανοπλαστικών με τη βοήθεια μικροσκοπίου (<http://www.tony-gutierrez.com>)

## 1.5.ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η συσσώρευση πλαστικών απορριμμάτων στις θάλασσες αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα αυτή τη στιγμή στον πλανήτη. Τα πλαστικά απορρίμματα είναι ένας από τους πιο επίμονους μακροσκοπικούς ρυπαντές για το περιβάλλον, αποτελούν το 60-80% κ.β. του συνόλου των απορριμμάτων και για το λόγο αυτό έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών επιστημόνων εδώ και δεκαετίες (Colton et al. 1974). Οι επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν από τα θαλάσσια πλαστικά απορρίμματα διακρίνονται σε 3 βασικές κατηγορίες (Galgani et al. 2010) :

- ο Οικολογικές συνέπειες θέτοντας σε άμεσο ή έμμεσο κίνδυνο τα φυτά και τα ζώα που βιώνουν στο θαλάσσιο περιβάλλον.
- ο Κοινωνικές επιπτώσεις π.χ. μείωση της αισθητικής αξίας και της δημόσιας ασφάλειας.
- ο Οικονομικές επιπτώσεις π.χ. έξοδα καθαρισμού, υποβάθμιση των τουριστικών παραθαλάσσιων περιοχών, απώλειες στις αλιευτικές δραστηριότητες.

### Βιολογικές και οικολογικές επιπτώσεις

Τα πλαστικά απορρίμματα μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο τα θαλάσσια είδη, αλλά και την ανθρώπινη υγεία, είτε άμεσα είτε έμμεσα.

#### *Άμεσα*

Οι βασικοί τρόποι που τα πλαστικά αποτελούν κίνδυνο για τους θαλάσσιους οργανισμούς είναι η παγίδευση και η κατάποση. Οι επιπτώσεις ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο και το μέγεθος των αντικειμένων των θαλάσσιων απορριμμάτων και των οργανισμών (Dias and Lovejoy 2012). Τα πλαστικά απορρίμματα που βρίσκονται είτε στην ακτή είτε μέσα στο βυθό ή στην επιφάνεια της θάλασσας παγιδεύουν τα ζώα ενώ μπορεί να προκαλέσουν και την ακινητοποίηση τους. Με αυτό τον τρόπο τα ζώα δεν έχουν τη δυνατότητα διαφυγής από τους θηρευτές τους ή δεν μπορούν να κολυμπήσουν για να αναζητήσουν τροφή, με αποτέλεσμα να πεθαίνουν από ασιτία (Werner et al. 2016). Επίσης πέρα από τα εγκαταλελειμμένα δίχτυα και τις πετονιές που αποτελούν παγίδα για τους θαλάσσιους οργανισμούς, οι πλαστικές σακούλες και συσκευασίες μπορούν να προκαλέσουν πνιγμό στους οργανισμούς που παγιδεύονται μέσα σε αυτό. Παγκοσμίως 344 είδη έχουν βρεθεί παγιδευμένα σε πλαστικά. Στη Μεσόγειο, τα βασικά θύματα είναι πουλιά (35%), ψάρια (27%), ασπόνδυλα (20%), θαλάσσια θηλαστικά (13%) και θαλάσσιες χελώνες (UNEP 2015). Γενικότερα, όλα τα αλιευτικά εργαλεία τα οποία είτε έχουν εγκαταλειφθεί, είτε έχουν χαθεί είτε έχουν απορριφθεί στη θάλασσα (πετονιές, παγίδες, δίχτυα) προκαλούν καταστροφές στην άγρια ζωή, εγκλωβίζοντας και σκοτώνοντας ψάρια και άλλα θαλάσσια θηλαστικά (Koelmans et al. 2014).



Εικόνα 11: Φώκια παγιδευμένη σε κομμάτι πλαστικού Horsey Beach, Norfolk. (Πηγή : <https://www.rspca.org.uk>)



Εικόνα 12: Πελαργός παγιδευμένος σε πλαστική σακούλα, Ισπανία (Πηγή : <https://www.nationalgeographic.com>)

Η κατάποση πλαστικών αντικειμένων μπορεί να προκαλέσει μια πληθώρα προβλημάτων, με αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές τον θάνατο του οργανισμού. Συγκεκριμένα η κατάποση πλαστικών μπορεί να μειώσει την χωρητικότητα του στομαχιού και κατά συνέπεια να μειωθεί η αίσθηση της πείνας. Έτσι το ζώο να έχει μειωμένη την αίσθηση της πείνας και να οδηγείται σε θάνατο λόγω ασιτίας. Επίσης η παραμονή πλαστικών στο στομάχι μπλοκάρει τη διαδικασία της πέψης, προκαλεί έλκος, διάτρηση και πληγές (Werner et al. 2016). Η επιφάνεια των πλαστικών καθόλα τη διάρκεια παραμονής τους στη θάλασσα προσελκύει ποσότητες βακτηρίων και φυκιών.



Οι οργανισμοί αυτοί εκπέμπουν θείο, με αποτέλεσμα οργανισμοί όπως τα θαλασσοπούλια να θεωρούν ότι αυτή η μυρωδιά είναι τροφή. Έτσι καταλήγουν να τρέφονται με πλαστικά απορρίμματα θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία τους. Οι σακούλες πολυαιθυλενίου που παρασύρονται στη θάλασσα λόγω ρευμάτων, μοιάζουν με θαλάσσιες μέδουσες που προορίζονται για τροφή για τις χελώνες (Bugoni et al. 1988). Υπάρχουν στοιχεία ότι η επιβίωσή τους επηρεάζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τα πλαστικά απορρίμματα (Duguy et al. 1998), με τις νεαρές θαλάσσιες χελώνες να είναι ιδιαίτερα ευάλωτες (Carr 1987). Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα, διαπιστώθηκε ότι το 75,9% των 54 θαλάσσιων χελωνών (*Carreta-carreta*) που συλλήφθηκαν από τις θάλασσες είχαν πλαστικά θραύσματα στο πεπτικό τους σύστημα (Tomas et.al 2002). Επίσης, το 18% των τόνων και των ξιφιών έχουν πλαστικά σκουπίδια στο στομάχι τους (Romeo et al. 2015) κυρίως σελοφάν και PET, όπως και το 17% του είδους γαλέου *Galeus melastomus* στα νησιά των Βαλεαρίδων (Alomar and Deudero 2017).

Στη Μεσόγειο, 134 είδη πέφτουν θύματα της κατάποσης πλαστικών συμπεριλαμβανομένων 60 ειδών ψαριών, και των 3 ειδών χελωνών, 9 ειδών θαλασσοπουλιών και 5 ειδών θαλάσσιων θηλαστικών (φουσητήρες, πτεροφάλαινες, ρινοδέλφια, σταχτοδέλφια και ζωνοδέλφια). Σήμερα το 90% των θαλασσοπουλιών έχουν κάποιο μικρό κομμάτι πλαστικού στο στομάχι τους (το 1960 το ποσοστό αυτό ήταν 5%) (Deudero and Alomar 2015).



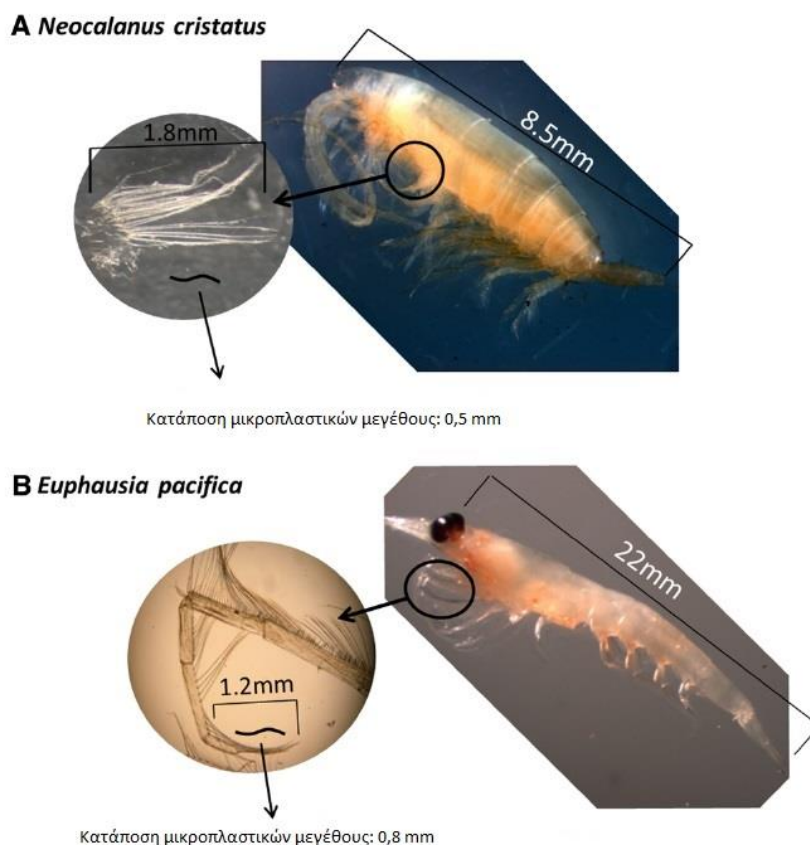
Εικόνα 13: Χελώνα μπερδεύει την πλαστική σακούλα για τσούχτρα, Ερυθρά Θάλασσα (Πηγή : <https://www.catersnews.com>)

Αν και τα μικροπλαστικά αποτελούν μια εξαιρετικά διαδεδομένη, σχεδόν πανταχού παρούσα μορφή θαλάσσιας ρύπανσης, μόλις πρόσφατα άρχισαν να έρχονται στο φως τα πρώτα επιστημονικά στοιχεία για τις βιολογικές επιπτώσεις των μικροπλαστικών στους οργανισμούς. Λόγω του μικρού μεγέθους και τη παρουσίας τους τόσο στη στήλη νερού όσο και στα ιζήματα των ακτών και του πυθμένα, τα μικροπλαστικά αποτελούν θεωρητικά κίνδυνο για όλα τα είδη των θαλάσσιων οργανισμών, από τα μικρότερα μέχρι και τα μεγαλύτερα. Η έκταση του προβλήματος είναι προς το παρόν δύσκολο να εκτιμηθεί, έχουν όμως σχεδόν ξεκαθαριστεί οι διαφορετικοί

μηχανισμοί μέσω των οποίων τα μικροπλαστικά μπορούν να βλάψουν τη θαλάσσια ζωή (Thompson et al. 2009).

Τα μικροπλαστικά αποτελούν πλέον έναν επικίνδυνο τύπο τροφής που εισβάλλει ανεξέλεγκτα στο θαλάσσιο τροφικό πλέγμα. Από δειγματοληψίες πεδίου αλλά και πειραματικές μελέτες στο εργαστήριο έχει αποδειχθεί ότι μια εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων οργανισμών διαφόρων μεγεθών προσλαμβάνουν μικροπλαστικά κατά τη διατροφή τους, είτε άμεσα είτε έμμεσα καταναλώνοντας άλλους οργανισμούς (Browne 2010; Fendall and Sewell 2009). Μια σειρά θαλάσσιων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων θαλάσσιων πτηνών, καρκινοειδών και ψαριών, εμφανίζουν σχεδόν στο σύνολο τους μικροπλαστικά στο στομάχι ή στο υπόλοιπο γαστρεντερικό σύστημα (Blight and Burger 1997; Tourinho et al. 2010). Πέρα από τα ανώτερα ζώα, οι έρευνες δείχνουν ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί των κατώτερων τροφικών επιπέδων καταναλώνουν αυτή την <<τροφή>>, χωρίς να μπορούν να τη διακρίνουν από τη φυσιολογική. 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). Ακόμη οι οργανισμοί που κατοικούν σε ιζήματα, όπως η *Arenicola marina*, είναι ικανοί για αναμόχλευση (ανακυκλώνουν τα ανώτερα στρώματα των ιζημάτων) με αποτέλεσμα κομμάτια μικροπλαστικών που έχουν καθιζάνει στον βυθό μπορεί να αναμοχλευτούν με ιζήματα, και έτσι να είναι διαθέσιμα για τους μικροοργανισμούς που τρέφονται από αυτά. Οργανισμοί κατώτερων τροφικών επιπέδων που έχουν βρεθεί ότι έχουν καταναλώσει μικροπλαστικά είναι πολλά είδη αχινών και ολοθούριων, μύδια και λοιπά δίθυρα, σκώληκες και γενικότερα πολυάριθμα ασπόνδυλα ζώα που τρέφονται με ηθμοφαγία, φιλτράροντας δηλαδή διαρκώς το νερό και κατακρατώντας οργανισμούς και αιωρούμενα στερεά (Eriksen et al. 2014).





Εικόνα 14: Είδη ζωοπλαγκτόν που τράφηκαν με μικροπλαστικά (Πηγή : <https://whalesandmarinefauna.wordpress.com>)

### Έμμεσα

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο τα πλαστικά απειλούν τους θαλάσσιους οργανισμούς είναι η ικανότητα τους να προσροφούν διάφορους οργανικούς ρύπους. Οι χημικές αυτές ουσίες είναι υδρόφοβες, με αποτέλεσμα να έχουν την τάση να προσκολλούνται στα οργανικά πολυμερή, αποφεύγοντας το νερό. Τα μικροπλαστικά έχουν μεγάλη αναλογία επιφάνεια/όγκο με αποτέλεσμα να λειτουργούν ως συσσωρευτές των χημικών αυτών ουσιών. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι επιβλαβή και ανθεκτικά χημικά που καταλήγουν στη θάλασσα λόγω ρύπανσης π.χ. υδρόφοβοι ρύποι όπως φυτοφάρμακα, PCBs κ.α. καθώς και πετρελαϊκά συστατικά (Teuten et al. 2007). Από τους ρυπαντές που προσκολλώνται στα πλαστικά που βρίσκονται στη θάλασσα, το 78% είναι τοξικοί δημιουργώντας δυσμενείς συνθήκες για τους οργανισμούς που έρχονται σε επαφή. Άλλη μια ιδιότητα που καθιστά τους ρύπους αυτούς ιδιαίτερα επικίνδυνους είναι η ικανότητα τους να βιοσυσσωρεύονται, αυξάνοντας επικίνδυνα την συγκέντρωσή τους μέσα σε οργανισμούς καθώς επίσης είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί παραμένοντας για μεγάλο χρονικό διάστημα στο φυσικό περιβάλλον. Το πολυαιθυλένιο (PE) που χρησιμοποιείται για τα πλαστικά καπάκια και τις τσάντες, συσσωρεύει περισσότερους οργανικούς ρύπους από ότι άλλοι τύποι πλαστικού (Teuten et al. 2007). Όταν οι πλαστικοί ρύποι εισέλθουν σε έναν οργανισμό, παρεμβαίνουν σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, προκαλώντας βλάβες στο ήπαρ ή επηρεάζοντας την έκκριση ορμονών. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα, την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη αλλά και να προκαλέσει διάφορες μορφές καρκίνου (Bakir et al. 2014). Συστατικά του ίδιου του πλαστικού (πρόσθετα ή αλλιώς πλαστικοποιητές) που ενσωματώνονται στο πλαστικό κατά την διάρκεια της παραγωγής του και σκοπό έχουν να βελτιώσουν την ποιότητα του (μεγαλύτερη

ανθεκτικότητα, μαλακότερη υφή, αντίσταση στη θερμότητα κ.α.), παρουσιάζουν ιδιαίτερη ανησυχία για το περιβάλλον, αφενός γιατί παρατείνουν τους χρόνους αποδόμησης των πλαστικών, και αφετέρου γιατί μπορεί να εισάγουν πιθανά επιβλαβή χημικά στους οργανισμούς όπως είναι οι πολυβρωμωμένοι διφαινυλαιθέρες, φθαλικοί εστέρες και η μονομερής δισφαινόλη Α.

Τα μικροπλαστικά έχουν επίσης την ικανότητα να τροποποιούν τη δομή του πληθυσμού. Είδη που κάποτε ήταν περιορισμένα λόγω έλλειψης σκληρού υποστρώματος, όπως το θαλάσσιο έντομο *Halobates 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). Τα μικροπλαστικά προσφέρουν καταφύγιο σε ένα πλήθος θαλάσσιων μικροοργανισμών διαμορφώνοντας χαρακτηριστικά μικρο-οικοσυστήματα με άγνωστες προ το παρόν περιβαλλοντικές συνέπειες (Cole et al. 2011). Διαφορετικοί τύποι πλαστικών έχουν βρεθεί με διαφορετικές αποικίες μικροοργανισμών μερικοί εκ των οποίων είναι υπεύθυνοι για πολλές ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα όπως χολέρα και γαστρεντερίτιδα (Amaral-Zettler 2013). Ένας άλλος έμμεσος τρόπος με τον οποία οι μικροοργανισμοί κινδυνεύουν από τα πλαστικά είναι ο εξής: Μετά την κατάποση πλαστικών, κυρίως μικροπλαστικών, αυτά αποβάλλονται μέσω των κοπράνων. Οργανισμοί που τρέφονται με περιττώματα και νεκρή ύλη μπορούν να καταναλώσουν με αυτόν τον τρόπο τα μικροπλαστικά.

#### Οικονομικές και Κοινωνικές επιπτώσεις

Τα πλαστικά απορρίμματα αποτελούν πίεση όχι μόνο για τις θαλάσσιες περιοχές και τα διάφορα απειλούμενα είδη, αλλά προκαλούν επιπτώσεις στην ανθρώπινη ευημερία, επηρεάζοντας αρνητικά διάφορους οικονομικούς τομείς όπως ο τουρισμός, η αλιεία, η υδατοκαλλιέργεια, η ναυσιπλοΐα, καθώς και βραχυπρόθεσμα σε ιδιώτες, επιχειρήσεις και κοινότητες (Werner et al. 2016). Η τουριστική αξία μια περιοχής συνδέεται άρρηκτα με την αισθητική της αξία. Συνεπώς η αισθητική υποβάθμιση των τουριστικών παράκτιων περιοχών εξαιτίας της ρύπανσης από πλαστικά απορρίμματα έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αντίστοιχη μείωση της τουριστικής δραστηριότητας και τη συνεπακόλουθη απώλεια σημαντικών οικονομικών κεφαλαίων. Άλλο ένα παράδειγμα οικονομικών επιπτώσεων που επιφέρουν τα θαλάσσια απορρίμματα είναι ο καθαρισμός των ακτών.

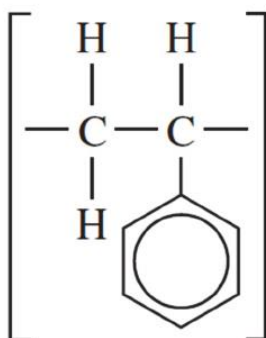


Εικόνα 15: Συσσώρευση πλαστικών σκουπιδιών, Καραϊβική Θάλασσα (Πηγή : <https://www.telegraph.co.uk>)

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πληγείσας περιοχής αυτή τη στιγμή αποτελεί η Μεσόγειος Θάλασσα. Η Μεσόγειος θεωρείται η έκτη μεγαλύτερη ζώνη συσσώρευσης για θαλάσσια απορρίμματα (Suaria et al. 2016). Αυτή η ημι-κλειστή θάλασσα λειτουργεί ως παγίδα μεγάλων ποσοτήτων για τα πλαστικά καθώς περιβάλλεται από τρεις ηπείρους με έντονη ανθρωπινή δραστηριότητα και τα νερά της ανανεώνονται σχεδόν κάθε εκατό χρόνια. Η λεκάνη της Μεσογείου φιλοξενεί 150 εκατομμύρια ανθρώπους, οι οποίοι παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα αστικών απορριμμάτων κατά κεφαλή, στα 208-760kg ετησίως. Η ποσότητα αυτή αυξάνεται κατά 40 % το καλοκαίρι, καθώς η Μεσόγειος δέχεται 200 εκατομμύρια τουρίστες τον χρόνο (Uner 2014).

## 1.6.ΠΟΛΥΣΤΥΡΕΝΙΟ

Το πολυστυρένιο είναι ένα από τα παλαιότερα θερμοπλαστικά πολυμερή, το οποίο χρονολογείται από τη δεκαετία του 1930. Είναι ένα συνθετικό αρωματικό πολυμερές κατασκευασμένο από το μονομερές στυρένιο. Είναι μια φθηνή ρητίνη ανά μονάδα βάρους με σχετικά χαμηλό σημείο τήξης (Wikipedia).



Εικόνα 16: Χημικός μοριακός τύπος πολυστυρενίου (Πηγή: <https://en.wikipedia.org>)

Είναι στερεό (υαλώδες) σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά λιώνει όταν ζεσταθεί (θερμοκρασία μεγαλύτερη από 100 ° C) και ξαναγίνεται στερεό όταν κρυώσει. Αυτή η συμπεριφορά θερμοκρασίας χρησιμοποιείται για εξώθηση αλλά και για χύτευση και δημιουργία κενού, καθώς μπορεί να χυτευθεί σε καλούπια με μεγάλη λεπτομέρεια.

Τα προϊόντα πολυστυρενίου διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες (Wikipedia):

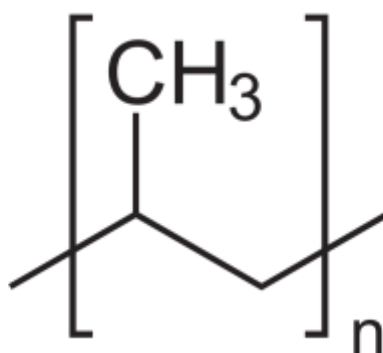
- Το GPPS, πολυστυρένιο γενικής χρήσης ή κρυσταλλική πολυστερίνη, είναι πλήρως διαφανής αν και εύθραυστη, και χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές συσκευασίας τροφίμων ή κοσμηματοθήκες.
- Το HIPS, (πολυστυρένιο με υψηλή αντοχή σε κρούση), είναι πολυστυρένιο το οποίο περιέχει καουτσούκ βουταδιενίου ως αντιθραυσματικό μέσο, το οποίο προσφέρει στο υλικό καλή αντοχή σε κρούση, αλλά του στερεί τη διαφάνειά του.

Το πολυστυρένιο αποτελεί το πλέον προτιμώμενο υλικό θερμοδιαμόρφωσης . Οι τυπικές εφαρμογές του είναι οι εξής:

- Παιχνίδια
- Τρυβλία Πέτρι (Petri dishes)
- Κρεμάστρες ρούχων
- Εξοπλισμός γραφείων
- Μαχαιροπήρουνα μιας χρήσης
- Φλιτζάνια καφέ

## 1.7.ΠΟΛΥΠΡΟΠΥΛΕΝΙΟ

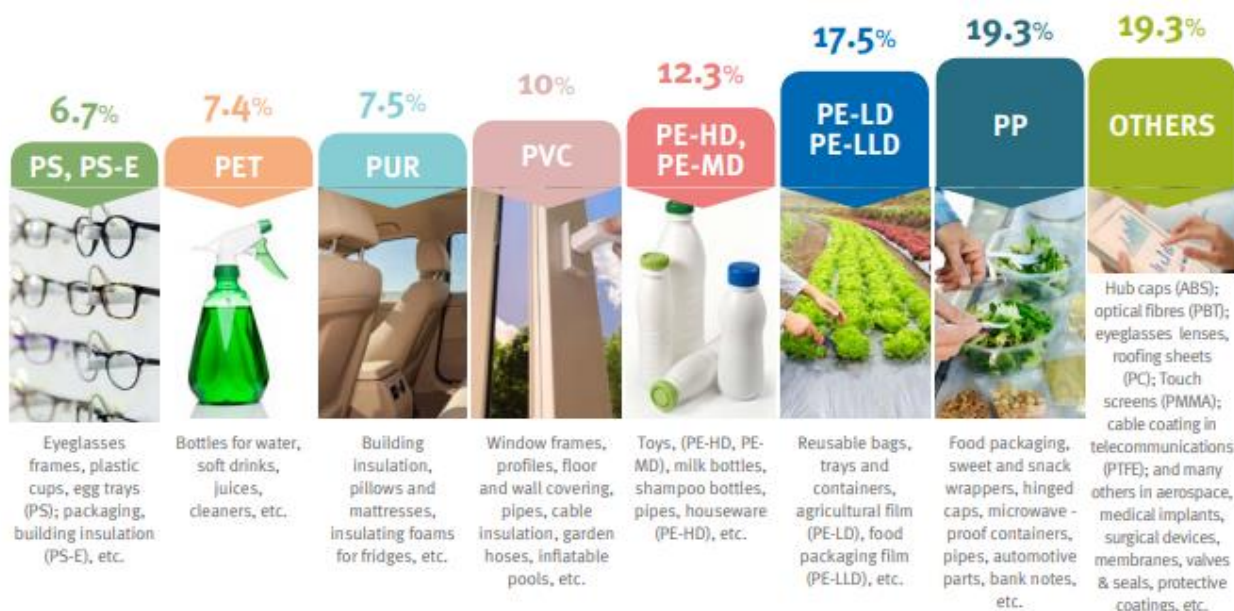
Το πολυπροπυλένιο είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές και επινοήθηκε το 1954 από τον καθηγητή Giulio Natta (Wikipedia). Είναι ένα πολυμερές το οποίο γίνεται από το μονομερές προπυλενίου, με ευρεία χρήση. Αυτό που το διαφοροποιεί σε σχέση με το κοινά πλαστικά είναι: ιδιαίτερα ανθεκτικό σε πολλά χημικά διαλυτικά, οξέα και βάσεις, είναι συνήθως σκληρό και ευέλικτο, είναι οικονομικό, και μπορεί να γίνει διαφανές όταν είναι αχρωμάτιστο. Είναι ιδανικό για απαιτητικές χρήσεις καθώς έχει χαμηλή πυκνότητα, ελάχιστη απορρόφηση υγρασίας, εξαιρετικές συγκολλητικές ιδιότητες, μέτριες ιδιότητες ολίσθησης, μέτριο φορτίο πρόσκρουσης, καλή ελαστική επαναφορά, καλή σταθερότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες, πολύ καλή χημική αντίσταση, εξαιρετική αντίσταση σε διάβρωση και ρηγματώσεις, αντίσταση σε καιρικές συνθήκες και στην ακτινοβολία UV. Όλα τα παραπάνω το καθιστούν ιδιαίτερα δημοφιλή και ευρέως χρησιμοποιούμενο σε πολλούς τομείς.



Εικόνα 17: Χημικός μοριακός τύπος πολυπροπυλενίου (Πηγή: <https://en.wikipedia.org>)

Κάποιες από τις χρήσεις του είναι :

- Συσκευασία τροφίμων: ποτήρια, δίσκοι, δοχεία
- Εκβολή ινών
- Έπιπλα: καρέκλες κήπου, τραπέζια
- Οικιακά είδη: δοχεία αποθήκευσης, κουτιά
- Βιομηχανικά είδη συσκευασίας: μπουκάλια για απορρυπαντικά, δοχεία και κουβάδες
- Πώματα και καπάκια
- Θήκες CD/DVD



Εικόνα 18: Η ευρωπαϊκή ζήτηση πλαστικών πολυμερών το 2016 (Πηγή: [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))

## **2.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας θαλάσσιων μικροοργανισμών που έχουν συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του κόλπου του Άγιου Ονούφριου στα Χανιά, να βιοαποδομήσουν pellets πολυστυρενίου (PS) και πολυπροπυλενίου (PP), σε προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο. Τα μικροσφαιρίδια (pellets), έχουν ακτινοβοληθεί για διάστημα 4 μηνών σε ακτινοβολία UV-A, ώστε να επιτευχθεί η γήρανση τους λόγω φωτο-αποδόμησης. Εφόσον η γήρανση έχει βρεθεί πως βοηθάει στη βιοαποδόμηση των πλαστικών, επιπλέον στόχος, είναι η διερεύνηση αν ο χρόνος ακτινοβολήσης ήταν επαρκής για την έναρξη της βιοαποδόμησης, καθώς και τις αλλαγές που μπορεί να προκαλέσει στην ταχύτητα καθίζησης των μικροσφαιριδίων.



### 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

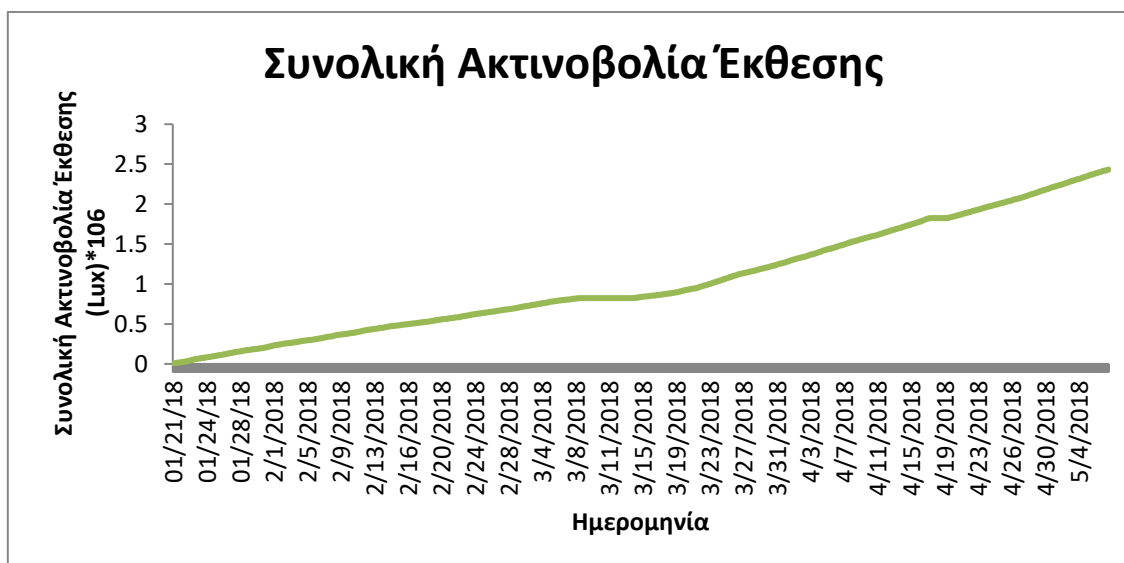
#### 3.1.ΥΛΙΚΑ

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δυο είδη πλαστικών, πολυστυρένιο και πολυπροπυλένιο. Και τα δυο είδη προμηθευτήκαν σε μορφή σφαιριδίων (pellets). Το σχήμα τους είναι σφαιρικό με διάμετρο κατά μέσο όρο 0,3cm. Τα πλαστικά αρχικά τοποθετήθηκαν σε γυάλινο πυρίμαχο σκεύος και ακτινοβολήθηκαν σε UV-A ακτινοβολία. Η περίοδος ακτινοβολήσης διήρκεσε 4 μήνες.



Εικόνα 19: Pellets PS και PP σε γυάλινο πυρίμαχο σκεύος έτοιμα για ακτινοβολήση

Κατά την διάρκεια αυτή, η θερμοκρασία και η ακτινοβολία μετρήθηκαν με τη βοήθεια HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Η θερμοκρασία που καταγράφει το Hobo κυμαίνεται μεταξύ - 20°C έως 70°C, ενώ η ακτινοβολία κυμαίνεται μεταξύ 0 έως 320,000 lux (ή 0 έως 30,000 lumens/ft<sup>2</sup>) (<https://envcoglobal.com>). Η ένταση ακτινοβολίας εντός του θαλάμου που καταγράφηκε καθόλα τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 1: Συνολική ακτινοβολία έκθεσης σε περίοδο 4 μηνών

## 3.2.ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1.ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

#### Προετοιμασία Δειγμάτων

Αρχικά αποστειρώθηκαν 12 κωνικές φιάσκες των 250 ml για το πολυστυρένιο και 12 κωνικές φιάσκες των 250 ml για το πολυπροπυλένιο. Επιπλέον αποστειρώθηκαν 2 φιάσκες για κάθε είδος πλαστικού, που χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο. Σε κάθε φιάσκα τοποθετήθηκε 100 mL θαλασσινό νερό και 0,500 gr πλαστικά του αντίστοιχου είδους. Το θαλασσινό νερό προμηθεύτηκε από τη θαλάσσια περιοχή της Σούδας και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο. Τα πλαστικά αντίστοιχα, πριν τοποθετηθούν σε κάθε φιάσκα, αποστειρώθηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης για να απομακρυνθούν οι μικροοργανισμοί που είχαν τυχόν προσκολληθεί και τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 37°C για 3 ημέρες.

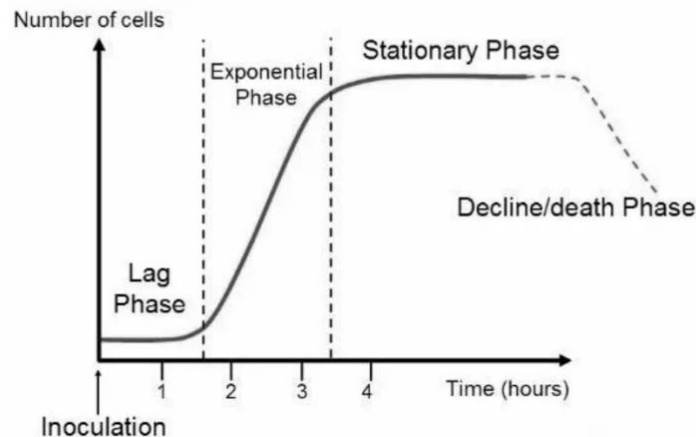
#### Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Οι δυο θαλάσσιες κοινότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση του πειράματος, απομονώθηκαν 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 μικροβιακές κοινότητες που αρχικά είχαν συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του κόλπου του Άγιου Ονούφριου στα Χανιά και εγκλιματίστηκαν για 6 μήνες σε περιβάλλον με μοναδική πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου



και πολυστυρενίου. Οι θαλάσσιες κοινότητες ονομάστηκαν AGIOS PS και AGIOS PE και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Η παρακολούθηση της αύξησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας.



Εικόνα 20: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών (Πηγή: <https://orbitbiotech.com>)

Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει έχει τέσσερις διακριτές περιοχές:

Α) Φάση προσαρμογής (Lag phase): Τα κύτταρα στη φάση αυτή δε διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, αλλά συνθέτουν νέα συστατικά (π.χ. ένζυμα για τον μεταβολισμό των στοιχείων που τους παρέχονται κλπ. )

Β) Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase): Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης τα κύτταρα αναπτύσσονται με μέγιστο και σταθερό ρυθμό ανάπτυξης

Γ) Φάση στασιμότητας (Stationary phase): Στη φάση αυτή η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σταματά και παρατηρείται εξισορρόπηση του ρυθμού ανάπτυξης και θανάτου. Οι λόγοι που οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στη φάση αυτή μπορεί να είναι διάφοροι όπως έλλειψη θρεπτικών στοιχείων από το μέσο καλλιέργειας, έλλειψη οξυγόνου (αερόβια καλλιέργεια), συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων κλπ.

Δ) Στη φάση αυτή η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των τοξικών προϊόντων μεταβολισμού των μικροοργανισμών οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου (Maier 2009).

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπολογίστηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS στα 600nm. Συγκεκριμένα, κάθε 30 min πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας και των δυο διαφορετικών κοινοτήτων έως ότου να ληφθεί η επιθυμητή τιμή απορρόφησης. Η προαναφερθείσα τιμή αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Κατά την διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας οι καλλιέργειες των δειγμάτων παρέμεναν σε τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργούσε στις 120 rpm και σε θερμοκρασία  $25^{\circ}\text{C}$ . Η κάθε καλλιέργεια αποτελούνταν από 150 ml υγρό θρεπτικό υλικό DSMZ 453 και 0,5 ml από τις κοινότητες AGIOS PS και AGIOS PE αντίστοιχα. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού είναι η εξής:

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



Εικόνα 21 : UV-VIS Φασματοφωτόμετρο

Κατάλληλες τιμές απορρόφησης για την εκθετική φάση είναι οι εξής:

- Agios PS  $\approx 0.8$
- Agios PP  $\approx 0.7$

Για κάθε συγκεκριμένη τιμή απορρόφησης, υπολογίσθηκε ο αριθμός αποικιών (CFU) σε τρυβλία Petri. Παρασκευάστηκαν αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  και με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης, εμβολιάστηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό. Επώαστηκαν για περίπου 7 ημέρες ,και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν οι αποικίες. Επομένως, για τις παραπάνω τιμές απορρόφησης που αντιστοιχούν στην εκθετική φάση των μικροοργανισμών, ο αριθμός των αποικιών μετρήθηκε σε :

- $10^8 \frac{CFU}{ml}$

Κατά την διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης των κοινοτήτων, από κάθε υγρή καλλιέργεια λήφθηκε ποσότητα 40 ml η οποία διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε, ανά 20 ml σε falkon. Τα 2 falkons από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 rpm για 20 min. Έπειτα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο νερό με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αποκολληθεί η πελέτα που δημιουργήθηκε και προστέθηκαν 20 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο νερό και προστέθηκαν 10 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Η

πελέτα διαλύθηκε, η διαδικασία επαναλήφθηκε και στο τέλος τα 2 falcons από κάθε καλλιέργεια αναμίχθηκαν. Η ποσότητα εμβολιασμού υπολογίστηκε με βάση τον νόμο της αραιώσης :

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1 * V_1}{V_2} = \frac{10^8 \frac{CFU}{ml} * 40 ml}{4 ml} = 10^9 \frac{CFU}{ml} \quad (1)$$

Όπου

$C_1$ : αριθμός αποικιών που μετρήθηκε στην εκθετική φάση ανάπτυξης

$V_1$ : αρχική ποσότητα που λήφθηκε από κάθε καλλιέργεια πριν την φυγοκέντρηση

$C_2$ : τελικός αριθμός αποικιών που αντιστοιχεί σε όγκο  $V_2 = 4 ml$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \rightarrow V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{10^6 \frac{CFU}{ml} * 100 ml}{10^9 \frac{CFU}{ml}} = 100 \mu l \quad (2)$$

Όπου

$C_1$  : αριθμός αποικιών που βρήκαμε από την παραπάνω σχέση

$V_1$ : ζητούμενος όγκος εμβολιασμού

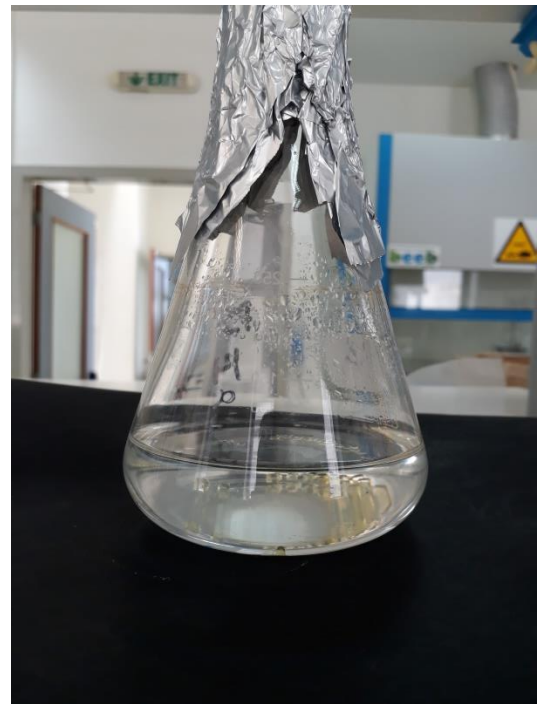
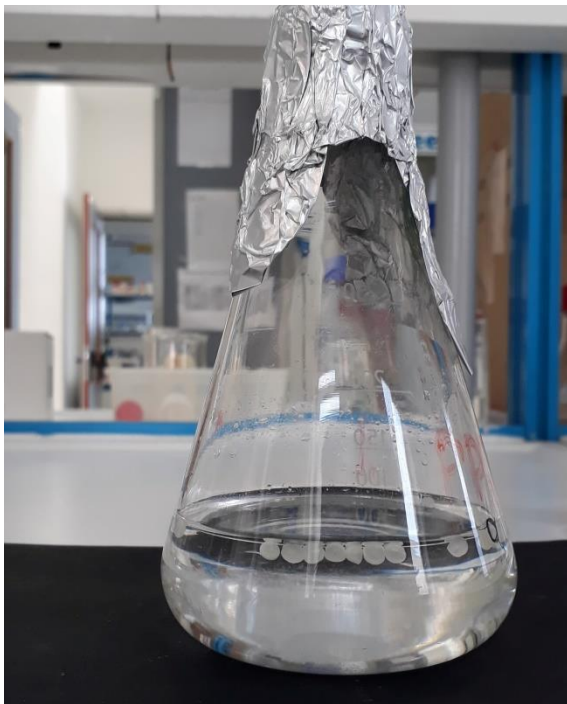
$C_2$ : επιθυμητός αριθμός αποικιών κάθε φλάσκας

$V_2$  : όγκος κάθε φλάσκας

Συνεπώς, οι 24 κωνικές φλάσκες που αντιστοιχούν στο PS και στο PP, εμβολιάστηκαν με 100 μl από την κοινότητα AGIOSPS από την κοινότητα AGIOSPE αντίστοιχα. Οι κωνικές φλάσκες τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 4 κωνικές φλάσκες που περιείχαν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και pellets PP και PS αντίστοιχα, χωρίς να εμβολιαστούν με μικροοργανισμούς, ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Οι δύο από αυτές τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης στις 120 στροφές, ώστε να επωαστούν στους 25 °C υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ οι υπόλοιπες δύο παρέμειναν σε ηρεμία.



Εικόνα 22: Πειραματική Διάταξη



Εικόνα 23: Κωνικές φιάσκες με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, μικροοργανισμούς και pellets (Αριστερά PP- Δεξιά PS)

### 3.2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία κάθε μήνα διαμορφώθηκε ως εξής:

- Απομακρύνονταν κάθε φορά από την τράπεζα ανάδευσης οι 3 κωνικές φιάσκες του PP και PS αντίστοιχα.

- Με χρήση φίλτρου με άνοιγμα πόρων 250  $\mu\text{m}$ , το νερό διαχωρίζονταν από τα πλαστικά και αποθηκεύονταν σε falkon των 50 ml στην κατάψυξη (σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Ονομάζονταν 'Νερό' και χρησιμοποιούνταν για περαιτέρω αναλύσεις.
- Τα πλαστικά σφαιρίδια που συγκρατούνταν στο φίλτρο, τοποθετήθηκαν σε falkon των 10ml όπου και πλύθηκαν με διάλυμα που περιείχε 10 ml απιονισμένο νερό και 2 σταγόνες Tween 80. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δυο φορές, ώστε να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια των πλαστικών και να μετρηθεί η καθαρή διαφορά βάρους των pellets. Το νερό της πλύσης αποθηκεύονταν για περαιτέρω αναλύσεις και ονομάζονταν 'Βιοφίλμ'.

Μετάπειτα ακολούθησε μια σειρά μετρήσεων που αναλύονται παρακάτω.

### 3.2.3.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ

Τα pellets αφού πλύθηκαν, ψεκάστηκαν με αιθανόλη και πλύθηκαν με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί τυχόν βιοφίλμ. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου μια εβδομάδα. Μετέπειτα μετρήθηκε το ξηρό βάρος των πλαστικών σφαιριδίων που περιείχε κάθε κωνική φλάσκα. Αρχικά τοποθετήθηκε στη ζυγαριά το βοηθητικό σκεύος, μηδενίστηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν τα pellets. Το μετρούμενο βάρος κάθε κωνικής φλάσκας, συγκρίθηκε με το αρχικό βάρος των πλαστικών σφαιριδίων που ζυγίστηκε και εισήχθη μέσα σε αυτές. Η διαφορά αυτή του βάρους θεωρήθηκε ως δείγμα βιοαποδόμησης των μικροπλαστικών .



Εικόνα 24: Ζυγαριά ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων

Για τον υπολογισμό της μείωσης του βάρους των pellets PP και PS αντίστοιχα, εξαιτίας της αποδόμησης τους από την μικροβιακή δραστηριότητα, χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

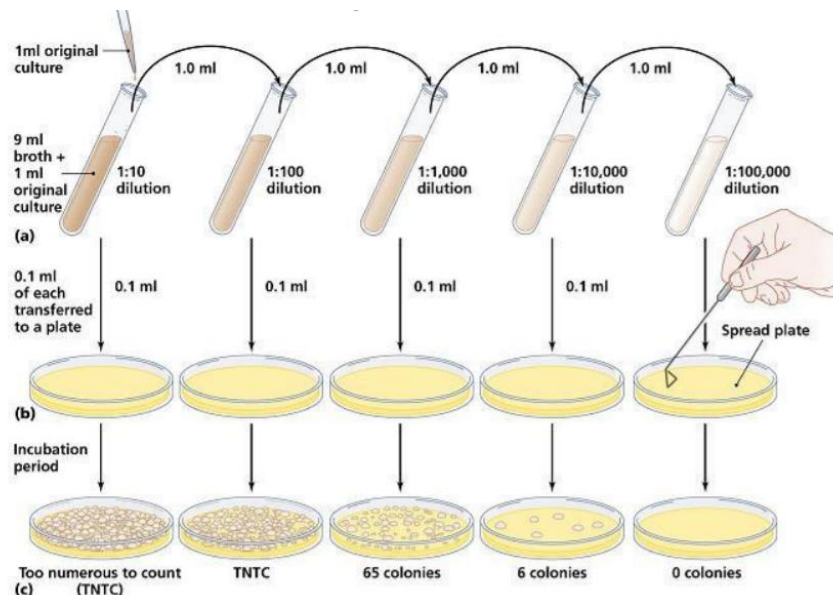
$$\text{Ποσοστό Μείωσης Βάρους} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος} - \text{Τελικό Βάρος}}{\text{Αρχικό Βάρος}} * 100 \quad (3)$$

Όπου

- Αρχικό Βάρος : η αρχική ποσότητα pellets που εισήχθη στις κωνικές φλάντσες
- Τελικό Βάρος: το καθαρό βάρος που υπολογίστηκε σε κάθε δειγματοληψία

### 3.2.4.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού βασίστηκε στη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, επειδή κάθε ζωντανό κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μια αποικία θυγατρικών κυττάρων, που είναι ορατή με γυμνό μάτι, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητα αυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων που βρίσκονται σ' ένα δείγμα. Το αρχικό δείγμα υπόκειται σε διαδοχικές αραιώσεις πριν την επίστρωση του σε τρυβλία με άγαρ, ώστε ο αριθμός των αποικιών που θα αναπτυχθούν να είναι προσιτά σε αρίθμηση. Οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή επιμόλυνσης, παρά τις ασηπτικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Έγινε εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού και από τα δυο είδη δειγμάτων 'Νερού' και 'Βιοφίλμ' που συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Το στερεό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν DSMZ 453 (η σύσταση του θρεπτικού αναφέρεται στο Κεφάλαιο 3.2.1.).



Εικόνα 25: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (Πηγή : <https://microbeonline.com>)

### 3.2.5.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

#### 3.2.5.1.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Για τον υπολογισμό των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος Bradford είναι η πλέον διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα και στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G 250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα (Bradford, 1976). Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm και δεν επηρεάζεται από ουσίες που συνήθως απαντώνται σε πρωτεϊνικά διαλύματα όπως ιόντα  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , υδατάνθρακες, β-μερκαπτοαιθανόλη κ.α .

Ο προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών έγινε στα δείγματα 'Νερό' και 'Βιοφίλμ' που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας για τον κάθε τύπο σφαιριδίου. Από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε ποσότητα 1,8 ml στις 12,000rpm για 20 min και στη συνέχεια αραιώθηκε σε 0,9 ml απιονισμένο νερό.

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το Coomassie Protein Assay Reagent Kit της εταιρείας BioRad που αποτελείται από την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, μεθανόλη, φωσφορικό οξύ και διαλυτικούς παράγοντες. Μετρώντας την απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης. Από την πρότυπη καμπύλη προσδιορίζεται η συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ορός αλβουμίνης βοδιού (BSA) και για την πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα Β (500  $\mu\text{g/ml}$ ): 10 ml  $H_2O$  + 5 mg albumin

Διάλυμα C (250  $\mu\text{g/ml}$ ): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml Β

Διάλυμα D (200  $\mu\text{g/ml}$ ): 3 ml  $H_2O$  + 2ml Β

Διάλυμα Ε (150  $\mu\text{g/ml}$ ): 3,5 ml  $H_2O$  + 1,5 ml Β

Διάλυμα F (125  $\mu\text{g/ml}$ ): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml C

Διάλυμα G(100  $\mu\text{g/ml}$ ): 4ml  $H_2O$  + 1ml Β

Διάλυμα Η (75  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml Ε

Διάλυμα Ι (50  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml G

Διάλυμα J (25  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml Ι

Σε καθαρή κυψελίδα προστέθηκε 1 ml αντιδραστηρίου Bradford, 20  $\mu\text{l}$  δείγμα και 20  $\mu\text{l}$  από τα πρότυπα διαλύματα. Το διάλυμα αναδεύθηκε και αφέθηκε σε θερμοκρασία 30  $^{\circ}\text{C}$  σε σκοτεινό μέρος για 10 min ώστε να σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο. Στη συνέχεια φωτομετρήθηκε το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας στα 595nm.



Εικόνα 26: Κυψελίδες με εμφανή τον σχηματισμό του έγχρωμου συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης

### 3.2.5.2.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Ο προσδιορισμός των υδατανθράκων έγινε και στα δυο δείγματα 'Νερό' και 'Βιοφίλμ' που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας για τον κάθε τύπο πλαστικού σφαιριδίου. Από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε ποσότητα 1,8 ml στις 12,000 rpm για 20 min και στη συνέχεια αραιώθηκε σε 0,9 ml απιονισμένο νερό.

Για την εκτίμηση της ολικής ποσότητας υδατανθράκων στο δείγμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανθρόνης. Η μέθοδος αυτή είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος με σχετική έλλειψη ευαισθησίας στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Αρχικά λαμβάνει χώρα η υδρόλυση των πολυσακχαριτών και η αφυδάτωση των μονομερών (προσθήκη θεικού οξέος και θερμική επεξεργασία). Τα σάκχαρα 5-άνθρακα (πεντόζης) και 6-άνθρακα (εξόζης) μετατρέπονται σε φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστίθενται η ανθρόνη (αρωματική ένωση) ή οποία αντιδρά με τα παραπάνω προϊόντα πέψης και δίνει έγχρωμη ένωση (Gerhardt et al. 1994). Ως πρότυπο διάλυμα για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Διάλυμα Α (20 mg/ml): 8 ml  $H_2O$  + 2 ml stock

Διάλυμα Β (15mg/ml): 8,5ml  $H_2O$  + 1,5 ml stock

Διάλυμα Γ (10 mg/ml): 9ml  $H_2O$  + 1 ml stock

Διάλυμα Δ (8mg/ml): 9,2ml  $H_2O$  + 0,8 ml stock

Διάλυμα Ε (5mg/ml): 5ml  $H_2O$  + 5 ml C

Διάλυμα F (1mg/ml): 9ml  $H_2O$  + 1 ml C

Διάλυμα Γ (0,5mg/ml): 5ml  $H_2O$  + 5 ml F

Διάλυμα Η (0,1mg/ml) : 8ml  $H_2O$  + 2 ml G

Για την μέτρηση παρασκευάστηκε διάλυμα ανθρακενόνης καθώς και το διάλυμα θεικού οξέος (75%) από την προηγούμενη ημέρα. Για την κατασκευή του διαλύματος ανθρακενόνης ζυγίστηκαν



0,5 gr ανθρακενόνης και διαλύθηκαν σε 10 ml διαλύματος καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με 250 ml διαλύματος θειικού οξέος (75%).

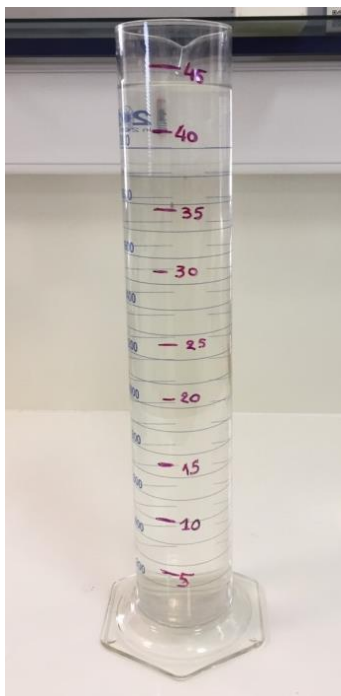
Σε καθαρά φιαλίδια προστέθηκε 1 ml δείγματος ή αραιώσεων, 2 ml θειικό οξύ και 4 ml διάλυμα ανθρακενόνης. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων αναδεύτηκε προσεκτικά και τοποθετήθηκε στους 100°C για 15 min. Έπειτα φωτομετρήθηκε το περιεχόμενο σε καθαρές κυψελίδες στα 578 nm.



*Εικόνα 27: Φιαλίδια με εμφανή τον σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης με τα προϊόντα πέψης των υδατανθράκων.*

### **3.2.6.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ**

Με την μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης εκτιμάται ο χρόνος που χρειάζεται το μικροπλαστικό για να διαπεράσει μια στήλη ύδατος και να κατακαθίσει στον πυθμένα. Στα πλαίσια του πειράματος για να προσομοιάσουμε το θαλάσσιο περιβάλλον, χρησιμοποιήθηκε ως στήλη ύδατος ένας ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 2 L. Ο κύλινδρος γεμίστηκε με θαλασσινό νερό, φιλτραρισμένο σε μέσο με πόρο 200μm, ώστε να απομακρυνθούν ουσίες που θα επηρεάσουν την μέτρηση. Στον ογκομετρικό κύλινδρο σχεδιάστηκαν συνολικά 9 σημεία ανά 5 cm, με τη βοήθεια χάρακα για την διευκόλυνση της διαδικασίας μέτρησης ταχύτητας καθίζησης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ένα χρονόμετρο, για να μετρηθεί ο χρόνος διέλευσης των μικροπλαστικών από το κάθε αριθμημένο σημείο.



Εικόνα 28: Ογκομετρικός κύλινδρος για τη μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης

### 3.2.7.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Τα μικροπλαστικά κατά την 4μηνη παραμονή τους διασπάστηκαν σε μικρότερα σωματίδια, λόγω ανάδευσης και βιοαποδόμησης. Η διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών υπολογίζονταν κάθε μήνα με τη βοήθεια του μηχανήματος SALD-7500 nano. Το μηχάνημα αυτό παρέχει ακριβή και υψηλής ευαισθησίας μέτρηση των νανο και μικρο σωματιδίων χαμηλής συγκέντρωσης. Επιπλέον, μπορούν να μετρηθούν δείγματα με χαμηλότερη συγκέντρωση από 1 ppm (Particle and Analyzer n.d.).

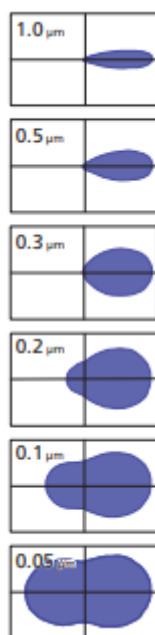


Εικόνα 29: Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους πλαστικών (Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))

Εισάγονταν 5 ml δείγματος κάθε φορά, αφού πρώτα μηδενίζονταν το όργανο με 5 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών κατά ποσότητα και όγκο.

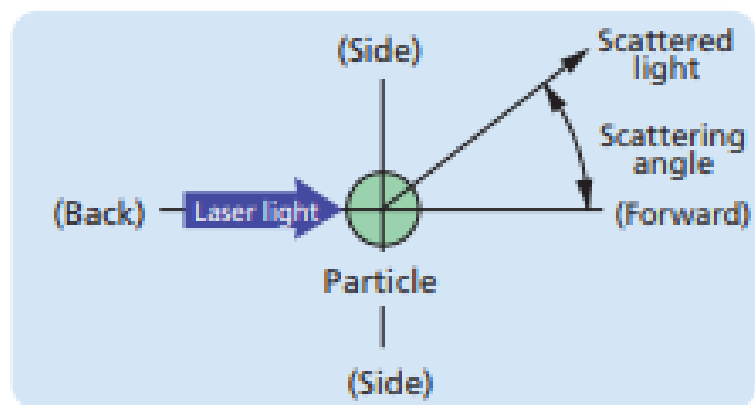
#### Αρχή Λειτουργίας Μηχανήματος

Όταν ένα σωματίδιο ακτινοβολείται με τη δέσμη λέιζερ του μηχανήματος, φώς εκπέμπεται από το σωματίδιο προς κάθε κατεύθυνση. Αυτό ονομάζεται σκεδαζόμενο φως (scattered light). Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός ποικίλει με τη γωνία σκέδασης και περιγράφει ένα χωρικό μοτίβο κατανομής της έντασης, γνωστό ως μοτίβο κατανομής έντασης φωτός (light intensity distribution pattern). Αν η διάμετρος του σωματιδίου είναι μεγάλη, τότε το σκεδαζόμενο φως που εκπέμπεται από το σωματίδιο συγκεντρώνεται στην μπροστινή κατεύθυνση (π.χ. στην κατεύθυνση της ακτίνας του λέιζερ) και παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις σε μια περιοχή γωνιών που είναι πολύ μικρή για να αναπαρασταθεί σε διάγραμμα. Συγκρινόμενη με το φως που εκπέμπεται με τη μπροστινή κατεύθυνση, η ένταση όλου του υπόλοιπου φωτός είναι αρκετά χαμηλή. Όσο η διάμετρος του σωματιδίου γίνεται μικρότερη, το μοτίβο του σκεδαζόμενου φωτός εκτείνεται προς τα έξω. Όσο το σωματίδιο γίνεται ακόμα μικρότερο, η ένταση του φωτός που εκπέμπεται πλάγια και πίσω γίνεται εντονότερη. Το μοτίβο κατανομής της φωτεινής έντασης αποκτά ένα σχεδόν στρόγγυλο σχήμα (όπως υποδεικνύεται και στην εικόνα 29), και εκτείνεται προς κάθε κατεύθυνση. Αυτό σημαίνει ότι η διάμετρος του σωματιδίου μπορεί να επαληθευτεί με την ανίχνευση του μοτίβου κατανομής έντασης του φωτός.



Εικόνα 30: Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός (Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε ομάδες σωματιδίων και όχι σε μεμονωμένα σωματίδια. Οι ομάδες αυτές περιέχουν σωματίδια διαφορετικών μεγεθών, και το μοτίβο κατανομής έντασης του φωτός που εκπέμπεται από την ομάδα δημιουργείται από το σκεδαζόμενο φως που εκπέμπεται από κάθε μεμονωμένο σωματίδιο. Αυτή είναι και η βασική αρχή λειτουργίας του λέιζερ.

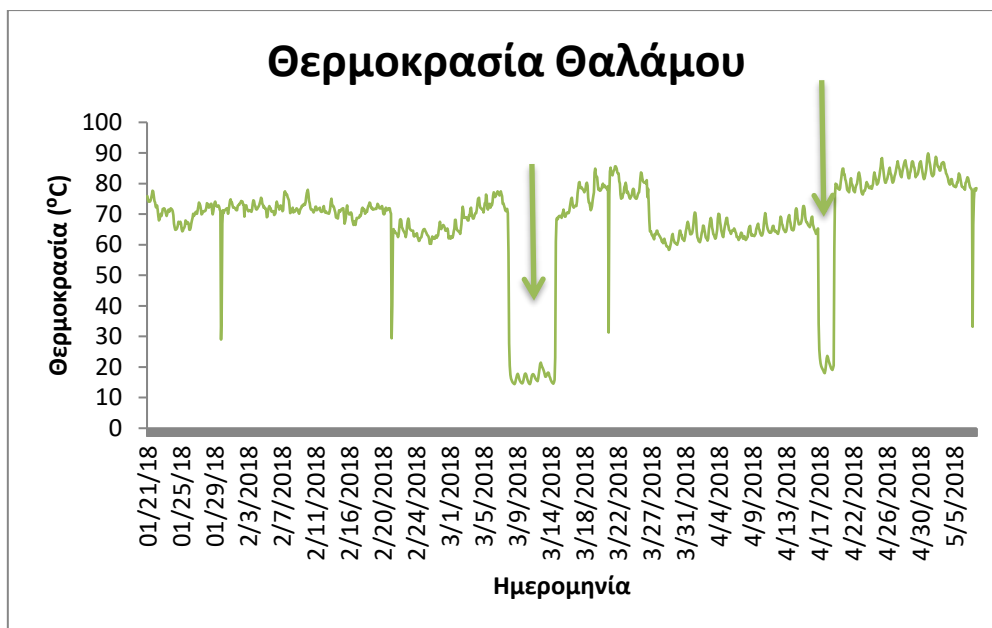


Εικόνα 31: Σκέδαση/Περίθλαση φωτός από το σωματίδιο (Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))

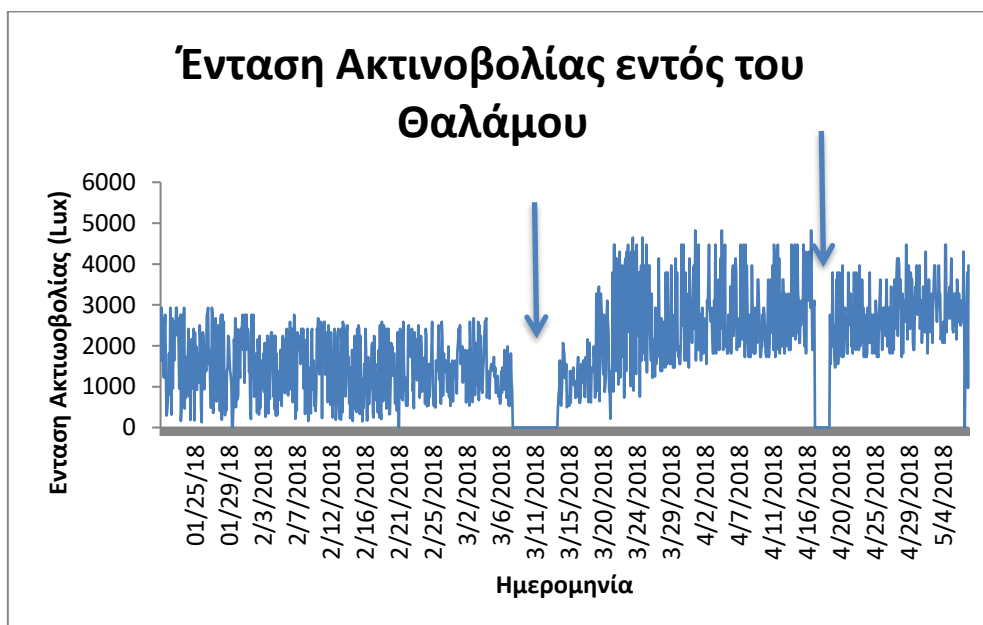
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ PELLETS

Τα pellets πολυπροπυλενίου και πολυστυρενίου τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ακτινοβολήσης του Εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, για διάστημα 4 μηνών. Όπως προαναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 3.1., η θερμοκρασία και η ακτινοβολία μετρήθηκαν με τη βοήθεια του HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Η θερμοκρασία και η ένταση της ακτινοβολίας που μετρήθηκαν καθόλα τη 4μηνη περίοδο, παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 2: Θερμοκρασία θαλάμου ακτινοβολήσης σε περίοδο 4 μηνών



Διάγραμμα 3: Ένταση ακτινοβολίας θαλάμου σε περίοδο 4 μηνών

Κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσης παρατηρήθηκε διακοπή λειτουργίας της λάμπας. Η διακοπή αυτή πραγματοποιήθηκε τις ημερομηνίες 8/3/2018-14/3/2018 και 17/4/2018-19/4/2018 (όπως απεικονίζεται και στα Διαγράμματα 2 και 3). Η αιτία της διακοπής αυτής πιθανώς να οφείλεται σε κάποιο ηλεκτρολογικό πρόβλημα του εργαστηρίου. Ωστόσο η χρονική περίοδος διακοπής είναι αρκετά μικρή για να επηρεάσει τα αποτελέσματα μας. Το θερμοκρασιακό εύρος του θαλάμου ήταν  $14,4^{\circ}\text{C}$  -  $89,9^{\circ}\text{C}$ . Η μέγιστη θερμοκρασία που μετρήθηκε ήταν  $89,9^{\circ}\text{C}$ , ενώ η μέγιστη ένταση ακτινοβολίας ήταν 3961,1 lux.

Η αλλαγή του χρώματος στα pellets PP και PS εξαιτίας της φωτογήρανσης παρουσιάζεται στις εικόνες 32 και 33.



Εικόνα 32: Αλλαγή χρώματος στα pellets PP εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας

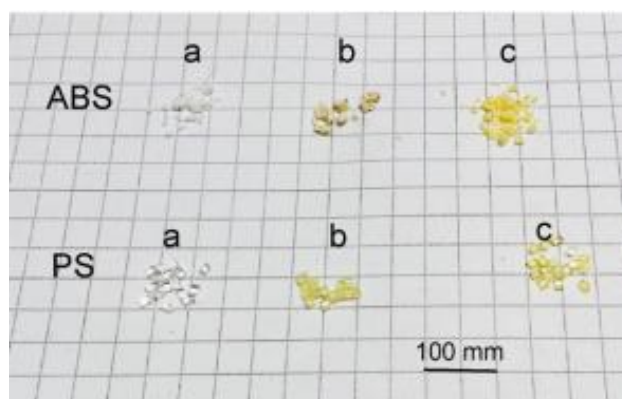


Εικόνα 33: Αλλαγή χρώματος στα pellets PS εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες, η αλλαγή του χρώματος σε διάστημα 4 μηνών είναι εμφανής, και ιδιαίτερα κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα όπου τα μικροσφαιρίδια έχουν <<κιτρινίσει>>. Έντονη διαφορά

παρατηρείται τον 4<sup>ο</sup> μήνα στα μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου. Η φωτογήρανση προκαλεί αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των πλαστικών και κυρίως αλλαγές στο χρώμα (ξεθώριασμα, κιτρίνισμα), απώλεια μηχανικής ιδιότητας, ευθραυστότητα και αλλαγές στο μοριακό βάρος (Singh and Sharma 2008). Το κιτρίνισμα πιστεύεται ότι οφείλεται στη δημιουργία διπλών διασταυρόμενων δεσμών και στην απουσία οξυγόνου, καθώς ο κύριος μηχανισμός είναι οι διασταυρόμενες συνδέσεις (cross linking) (Gewert et al., 2015). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το κίτρινο χρώμα στα πλαστικά υποδηλώνει οξείδωση των φαινολικών αντιοξειδωτικών παραγόντων δημιουργώντας παραπροϊόντα (Endo et al., 2005).

Έχουν γίνει πολλές πειραματικές δοκιμές για τη διερεύνηση των αποτελεσμάτων της φωτο-οξείδωσης των πολυμερών, είτε με εξωτερική δοκιμή των καιρικών συνθηκών είτε με εργαστηριακή δοκιμή που προσομοιάζει το φυσικό περιβάλλον. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνες 34) παρουσιάζονται pellets PS τα οποία έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία σε προσομοιωμένο περιβάλλον και παρουσιάζουν την ίδια χρωματική διαφορά με τα μικροσφαιρίδια της παρούσας εργασίας:



Εικόνα 34: Μικροσφαιρίδια (pellets) PS, (Kowalski et al. 2016)

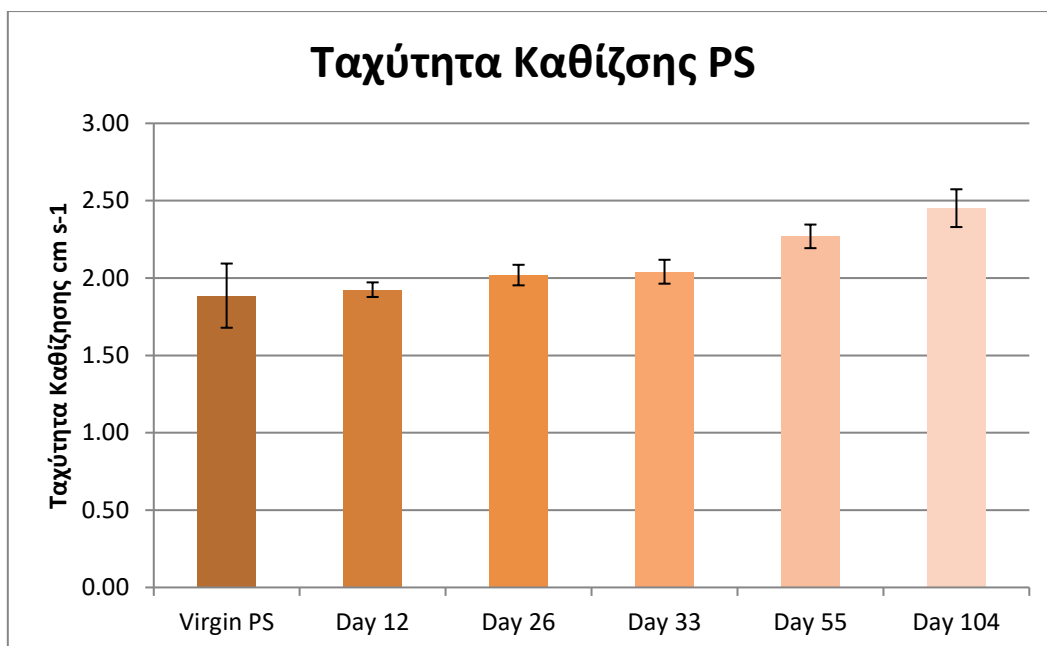
Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα εξής :

- a) pellets τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο σκοτάδι
- b) pellets που αποθηκεύτηκαν σε θαλασσινό νερό στο εργαστήριο και ήταν εκτεθειμένα 12 ώρες ημερησίως στην υπεριώδη ακτινοβολία
- c) pellets που αποθηκεύτηκαν σε ξηρό περιβάλλον και ήταν εκτεθειμένα 12 ώρες ημερησίως στην υπεριώδη ακτινοβολία

Η ακτινοβολήση έγινε στο εργαστήριο με λάμπα UV-A και η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν ένας χρόνος (Kowalski et al. 2016).

Πέρα από τη χρωματική διαφορά, παρατηρήθηκε αλλαγή στην ταχύτητα καθίζησης, και συγκεκριμένα στα pellets PS. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4) παρουσιάζεται η ταχύτητα καθίζησης στη διάρκεια των 4 μηνών, όπου πραγματοποιήθηκε η ακτινοβολήση.



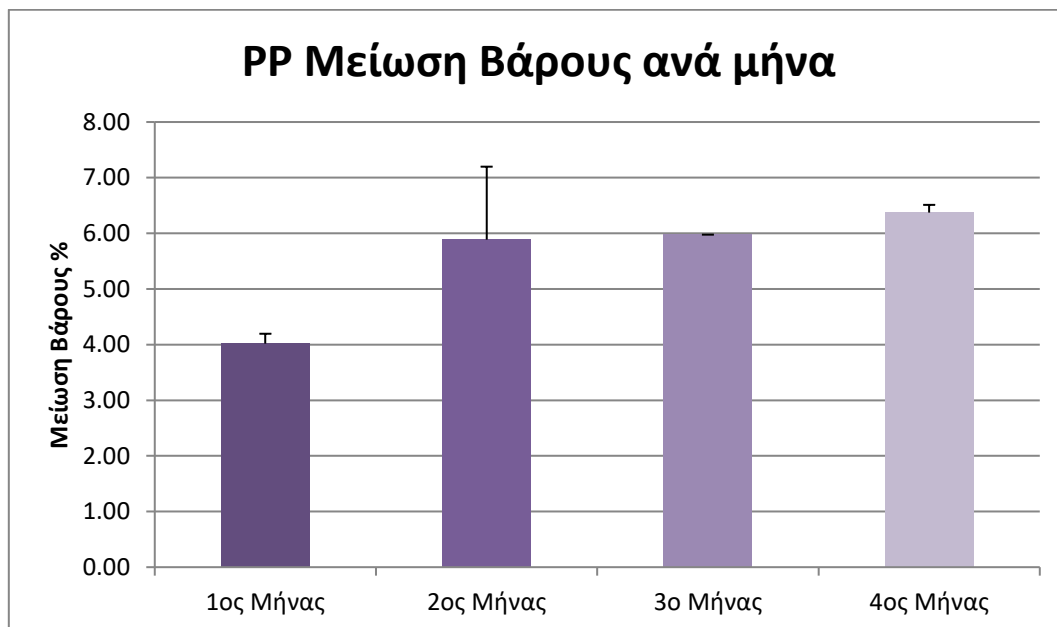


Διάγραμμα 4: Ταχύτητα καθίζησης pellets PS, κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσης με UV-A

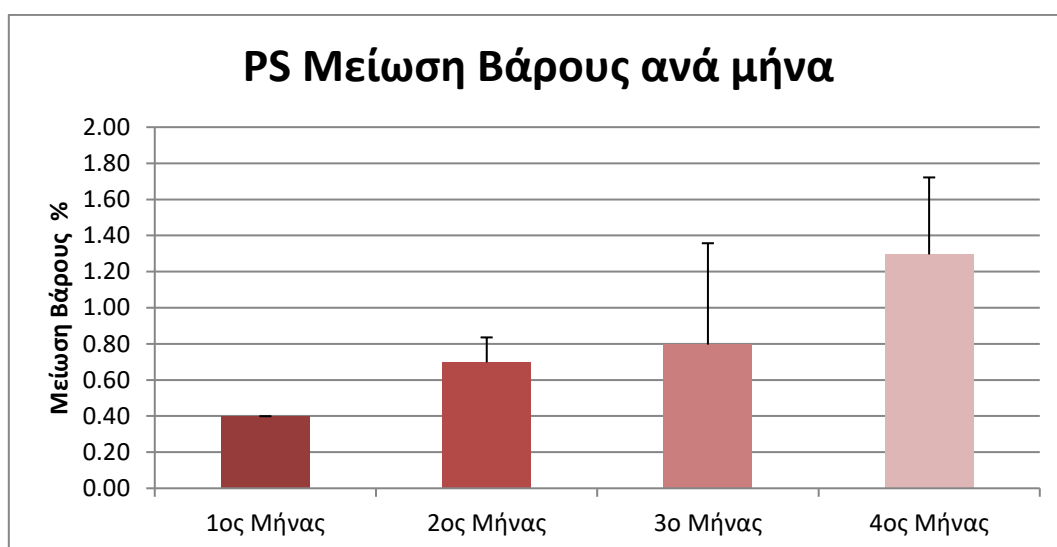
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι η ταχύτητα καθίζησης παρουσιάζει μια αυξητική τάση, κατά τη διάρκεια των 4 μηνών όπου τα pellets PS παρέμειναν στον θάλαμο ακτινοβολήσης με UV-A, ακτινοβολία. Στη παρούσα εργασία, για να προσομοιάσουμε το θαλάσσιο περιβάλλον εξετάσαμε μόνο την επίδραση του ηλιακού φωτός στα πλαστικά, και κατ'επέκταση στη ταχύτητα καθίζησης. Αν και το PS θεωρείται σταθερό πολυμερές και ιδιαίτερα ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με άλλα πλαστικά, έρευνες έχουν δείξει ότι είναι λιγότερο ανθεκτικό στη Φωτο-αποδόμηση. Η γήρανση με υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να επηρεάζει τη βύθιση λόγω αλλαγής της πυκνότητας. Συγκεκριμένα εξαιτίας της επιλεκτικής οξειδωσης της πολυμερικής αλυσίδας και της διάβρωσης της επιφάνειας των πλαστικών, αυξάνεται η πυκνότητα του πολυμερούς και μπορεί να οδηγήσει στη βύθιση (Kowalski et al. 2016). Σε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε μικροσφαιρίδια (pellets) πολυστυρενίου, τα οποία είχαν υποστεί φυσική γήρανση από την ηλιακή ακτινοβολία, καθώς ήταν εκτεθειμένα σε φυσικές καιρικές συνθήκες για περίοδο 10 μηνών, βρέθηκε ότι η ταχύτητα καθίζησης τους αυξήθηκε (Merethe et al. n.d.).

## 4.2.ΒΑΡΟΣ

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι μεταβολές στο βάρος στο διάστημα των 4 μηνών για τα δυο διαφορετικά είδη πλαστικών.



Διάγραμμα 5: Μείωση Βάρους pellets PP ανά μήνα



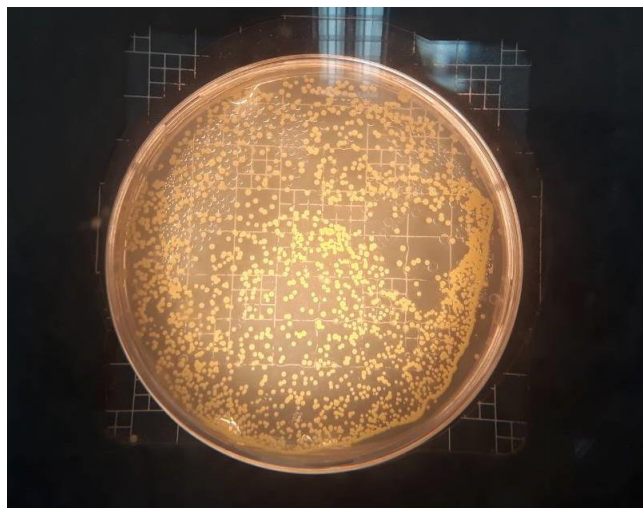
Διάγραμμα 6: Μείωση Βάρους pellets PS ανά μήνα

Και στα δύο είδη πλαστικών, σε διάστημα 4 μηνών, παρατηρείται μια συνεχής μείωση του βάρους. Παρόλα αυτά, το PP σε σχέση με το PS παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης βάρους. Συγκεκριμένα κατά τη δειγματοληψία του 1<sup>ου</sup> μήνα, υπολογίστηκε 4,02% μείωση του βάρους ενώ

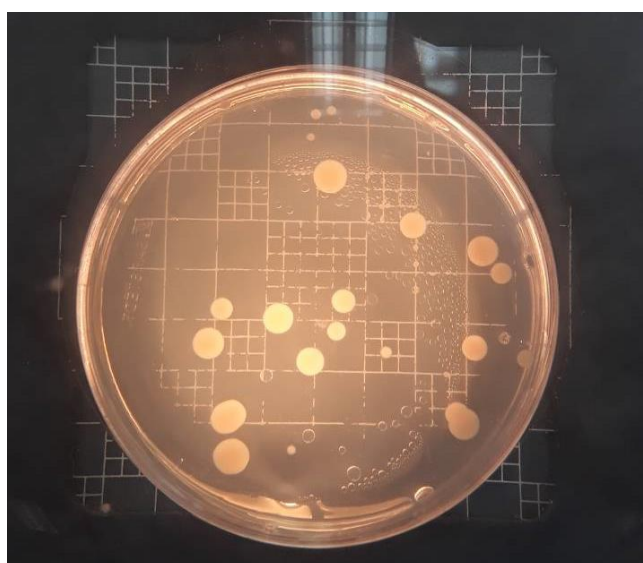
τον 4<sup>ο</sup> μήνα η μείωση έφτασε σε ποσοστό 6,37%. Σε αντίθεση, στο PS τον 1<sup>ο</sup> μήνα το βάρος μειώθηκε σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό 0,40%, ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα το ποσοστό αυτό υπολογίστηκε σε 1,30 %. Υπάρχουν διάφορες μελέτες που παρουσιάζουν αποτελέσματα μείωσης του βάρους των πλαστικών εξαιτίας της βιοαποδόμησης τους τόσο από θαλάσσιους μικροοργανισμούς όσο και από χερσαίους μικροοργανισμούς. Πειραματική μελέτη που διεξήχθη με μικροπλαστικά πολυπροπυλενίου και πολυστυρενίου, τα οποία πρώτα είχαν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, έδειξε μείωση βάρους εξαιτίας βιοαποδόμησης από το *Bacillus gottheilii* 3,6% και 5,8% αντίστοιχα, έπειτα από περίοδο επώασης 40 ημερών (Auta et al. 2017). Για το πολυπροπυλένιο έχει βρεθεί μείωση βάρους 6,4% και 4,0% από τους μικροοργανισμούς *Rhodococcus sp.* και *Bacillus sp.* αντίστοιχα, μετά από 40 ημέρες επώασης (Auta et al. 2018). Πειραματική μελέτη όπου διερεύνησε την ικανότητα δυο στελεχών (*Bacillus cereus* και *Sporosarcina globispora*), να βιοαποδομήσουν κόκκους πολυπροπυλενίου σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον, διαπίστωσε μείωση βάρους 12 και 11% αντίστοιχα, σε διάστημα επώασης 40 ημερών (Auta et al. 2017). Οι μικροοργανισμοί και στα τρία παραπάνω πειράματα απομονώθηκαν από θαλάσσια ιζήματα στη χερσόνησο της Μαλαισίας. Διαφορετική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στον κόλπο της Βεγγάλης, στην Κίνα, έδειξε 0,6% μείωση βάρους του πολυπροπυλενίου (Sudhakar et al. 2007). Τα πλαστικά φύλλα (15x10cm) προπυλενίου βυθίστηκαν σε βάθος 3 μέτρων, σε πλωτή εξέδρα, για να διερευνηθεί η ικανότητα αποδόμησης από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Το βακτήριο *Pseudomonas sp.*, καθώς και αναερόβια και ετερότροφα βακτήρια βρέθηκαν στην επιφάνεια των πλαστικών, και χαρακτηρίστηκαν ικανά για τη βιοαποδόμηση του πολυπροπυλενίου σε διάστημα 6 μηνών. Η μείωση του βάρους μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη βιοαποδόμησης των pellets, ωστόσο δεν μπορεί να δώσει σαφή εικόνα της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών, και για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις.

### 4.3.ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΥΘΗΣΜΟΙ

Όπως προαναφέρθηκε στην Παράγραφο 3.2.4., η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού βασίστηκε στη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Μετά από περίοδο επώασης 1 εβδομάδας, παρατηρήθηκαν μικρές κυκλικές αποικίες στα τρυβλία, όπως παρουσιάζονται στις εικόνες 36 και 37:

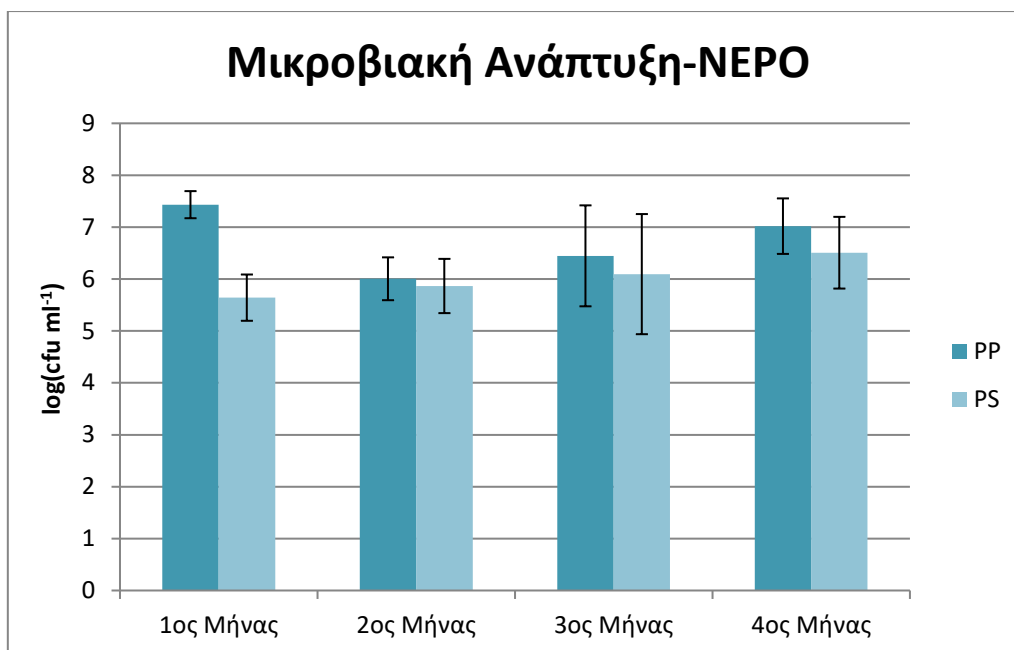


Εικόνα 35: Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση  $10^{-2}$



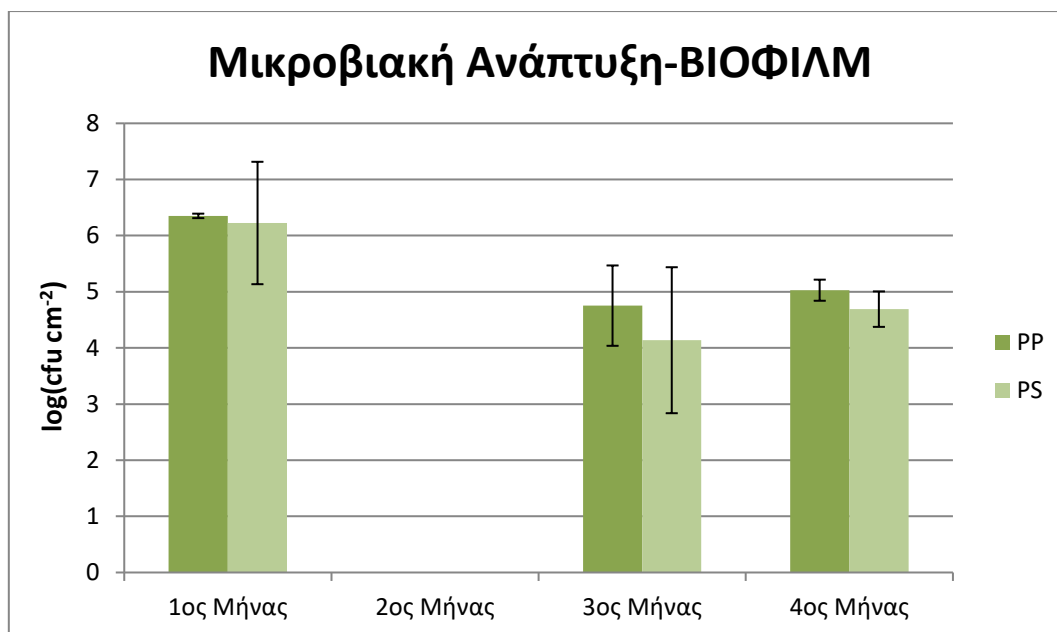
Εικόνα 36: Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση  $10^{-4}$

Ο αριθμός των αποικιών μετρήθηκε κατά την διάρκεια δειγματοληψίας κάθε μήνα και εκφράστηκε σε μονάδες CFU ml<sup>-1</sup> για το δείγμα 'ΝΕΡΟ' και CFU cm<sup>-2</sup> για το δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ'. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



*Διάγραμμα 7: Αριθμός αποικιών στο δείγμα 'ΝΕΡΟ'*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7, κατά τη δειγματοληψία του 1<sup>ου</sup> μήνα, η συγκέντρωση των κυττάρων για την κοινότητα 'AGIOS PE' με την οποία εμβολιάστηκαν οι φλάσκες που αντιστοιχούσαν στο πολυπροπυλένιο, έλαβε την τιμή  $3 \cdot 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>. Συγκρίνοντας την με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>), παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων της βακτηριακής κοινότητας. Ωστόσο τον 2<sup>ο</sup> μήνα, διαπιστώθηκε μια μείωση της συγκέντρωσης των κυττάρων, η οποία από τον 3<sup>ο</sup> μήνα και μετά παρουσίασε αυξητική τάση λαμβάνοντας τον 4<sup>ο</sup> μήνα την τιμή  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των κυττάρων της κοινότητας 'AGIOS PS' με την οποία εμβολιάστηκαν οι φλάσκες που αντιστοιχούσαν στο πολυστυρένιο, τον 1<sup>ο</sup> μήνα έλαβε την τιμή  $4 \cdot 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>. Σε αντίθεση με το PP, παρατηρήθηκε μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού. Κατά τη διάρκεια των υπολοίπων μηνών, διαπιστώθηκε μια οριακή αύξηση, με τη συγκέντρωση των κυττάρων τον 4<sup>ο</sup> μήνα να υπολογίζεται  $3 \cdot 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>.



Διάγραμμα 8: Αριθμός αποικιών στο δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ'

Ο πληθυσμός των δύο κοινοτήτων στην αντίστοιχη επιφάνεια των πλαστικών, μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου, παρουσιάζοντας μια μικρή αύξηση τον 4<sup>ο</sup> μήνα. Και στις δύο κοινότητες η συγκέντρωση των κυττάρων στη δειγματοληψία του 1<sup>ου</sup> μήνα ( $2 \cdot 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup> και  $2 \cdot 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup> για το PP και το PS αντίστοιχα) αυξήθηκε σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού. Η μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα, πιθανώς να οφείλεται στις ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούσαν. Επίσης τον 4<sup>ο</sup> μήνα, η μικρή αύξηση της ανάπτυξης και των δύο κοινοτήτων, οφείλεται στη προσθήκη θρεπτικών φωσφόρου και αζώτου που πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια του 3<sup>ου</sup> μήνα. Τόσο στην επιφάνεια των πλαστικών, όσο και στο νερό, η μικροβιακή ανάπτυξη όπου αυξήθηκε κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα, συμπίπτει και με τη μείωση του βάρους των πλαστικών, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης που παρατηρήθηκε και για τα δύο είδη πλαστικών ήταν τον 4<sup>ο</sup> μήνα.

Ο σχηματισμός των βιοφίλμ εξαρτάται κατά ένα μεγάλο βαθμό από την επιφάνεια στην οποία προσκολλούνται οι μικροοργανισμοί (τραχύτητα (Verran and Boyd 2001), ελεύθερη επιφάνεια, επιφανειακή φόρτιση, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και υδροφοβικότητα (Pompilio et al. 2008)), καθώς επίσης και από της συνθήκες που επικρατούν (θερμοκρασία, pH) (Liao et al. 2015). Ωστόσο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβιακού πληθυσμού και της επιφάνειας στην οποία αποικίζει, δεν έχει μελετηθεί πλήρως ακόμη (Harrison et al. 2011).

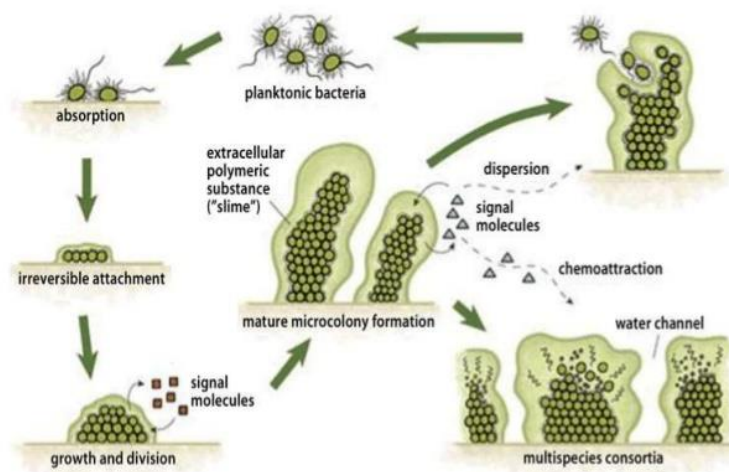
#### 4.4.ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ

Οι μικροοργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον, αναπτύσσονται και ζουν σαν ελεύθερα κύτταρα. Ωστόσο μπορεί να αναπτύσσονται και να συμβιώνουν σε κάποια έμβια ή μη επιφάνεια, με την προϋπόθεση ότι είναι αρκετά υγρή. Με αυτό τον τρόπο αναπτύσσονται κοινότητες βακτηρίων που περιβάλλονται από μια εξωκυτταρική μήτρα. Περιβάλλονται επομένως από ένα εξωκυτταρικό

πολυμερές υλικό που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια, δημιουργώντας σύνθετες δομές, τις βιομεμβράνες (Biofilms)(Z. MELABIANAKI et al. 2007).

Τα βιοφίλμ αποτελούνται από μικροοργανισμούς, EPS, πολυσθενή κατιόντα, βιογενή και ανόργανα σωματίδια. Από όλα αυτά τα συστατικά, τα EPS είναι κυρίως υπεύθυνα για τη δομική και λειτουργική ενότητα των βιοφίλμ και για τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες. Το ποσοστό των EPS στα βιοφίλμ κυμαίνεται στα 50-90% της συνολικής οργανικής ύλης (Nielsen et al. 1997). Τα μικροβιακά EPS αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια (Adav et al. 2008). Τα EPS μπορούν να ταξινομηθούν στα διαλυτά EPS (solubleEPS-sEPS) και τα δεσμευμένα EPS (boundEPS-bEPS) (Laspidou and Rittmann 2002).

Τα μικροβιακά βιοφίλμ, μπορεί να συντελέσουν αποτελεσματικό ρόλο στη βιοαποδόμηση σύνθετων συνθετικών πολυμερών όπως είναι τα πλαστικά. Ο σχηματισμός βιοφίλμ στις επιφάνειες των πλαστικών, επιτρέπει τη δημιουργία προστατευόμενων κοινοτήτων που αυξάνουν την επιβίωση της μικροβιακής κοινότητας σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να ενισχύεται και η διαδικασία της βιοαποδόμησης τους (Kulonen and Hallman 1956).



Εικόνα 37: Σχηματισμός biofilm (Πηγή : KirkE. Anderson Genetics, Genomics and Microbial Ecology)

#### 4.4.1.ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

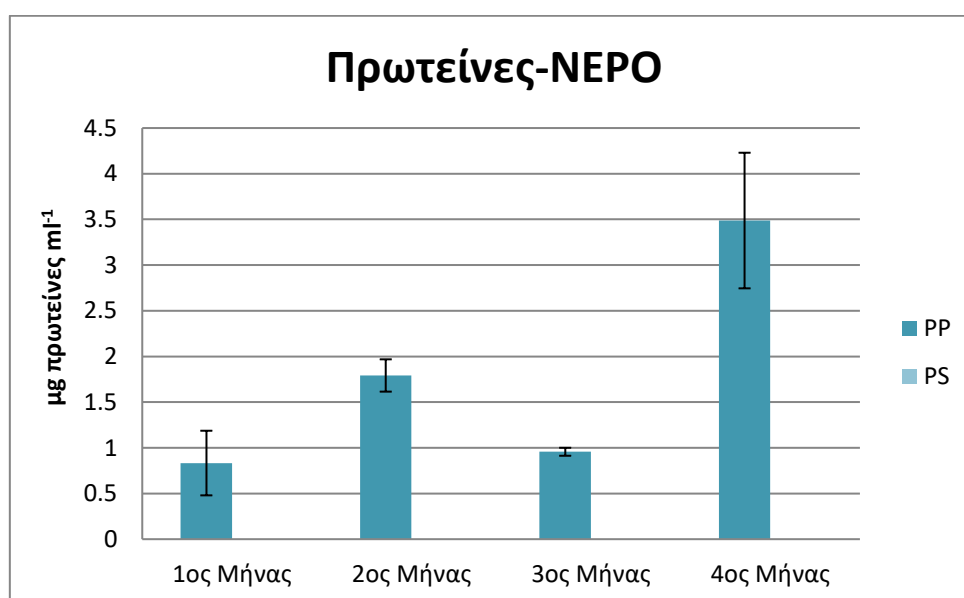
Η πρωτεΐνη είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη ουσία, που υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελεί από τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων συμμετέχοντας σε βασικές διαδικασίες των οργανισμών (αναπαραγωγή, κίνηση, θρέψη, αναπνοή). Οι πρωτεΐνες είναι οργανικά μακρομόρια που αποτελούνται από αμινοξέα ενωμένα μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό. Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται από την ένωση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Υπάρχουν περίπου 20 διαφορετικά αμινοξέα που απαντώνται φυσιολογικά στις πρωτεΐνες. Πρωτεΐνες παρόμοιας λειτουργίας έχουν παρόμοια σύνθεση αμινοξέων και αλληλουχία (Encyclopedia Britannica).

Τα EPS περιέχουν μια σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών ως ένζυμα, δομικές πρωτεΐνες καθώς και ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση των EPS. Ορισμένες επιστημονικές αναφορές έδειξαν ότι



οι πολυσακχαρίτες είναι η σημαντικότερη συνιστώσα της μήτρας του βιοφίλμ (Molin and Tolker-Nielsen 2003; Rodney M. et al. 2001). Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και το DNA είναι εξίσου σημαντικοί παράγοντες για τον σχηματισμό του βιοφίλμ, τη σταθερότητα και τη λειτουργία του (Whitchurch et al. 2002).

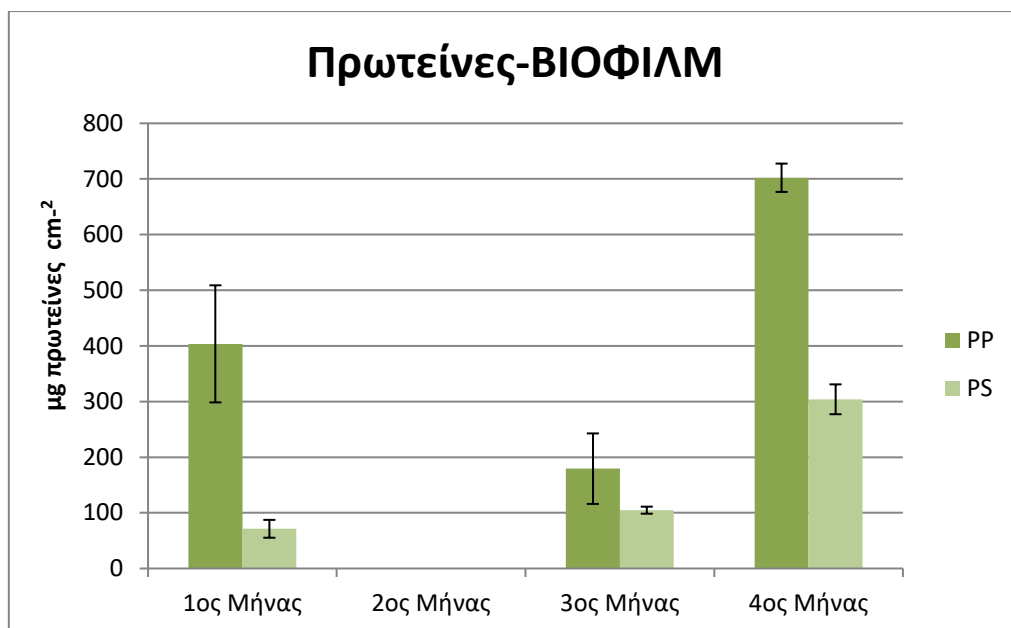
Όπως προαναφέρθηκε (Κεφάλαιο 3.2.5.1.), για τον υπολογισμό των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ανά μονάδα ml καθώς και ανά μονάδα  $\text{cm}^2$ , και για τα δυο είδη πλαστικών παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 9: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο δείγμα 'NEPO'

Από το διάγραμμα 9 παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο νερό του PP κατά την δειγματοληψία του 1<sup>ου</sup> μήνα είχε την χαμηλότερη τιμή, καθώς μετρήθηκε στα 0,833  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Τον 2<sup>ο</sup> μήνα παρατηρήθηκε μια αύξηση, που ωστόσο μειώθηκε κατά τον 3<sup>ο</sup> μήνα. Τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση πρωτεϊνών, με τιμή 3,489  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Αντίστοιχα η συγκέντρωση πρωτεϊνών για το PS τον 1<sup>ο</sup> μήνα είναι αρκετά χαμηλή ώστε να μην μπορεί να ανιχνευθεί από το μηχάνημα. Παρόμοιο μοτίβο χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται και τους υπόλοιπους μήνες του πειράματος.



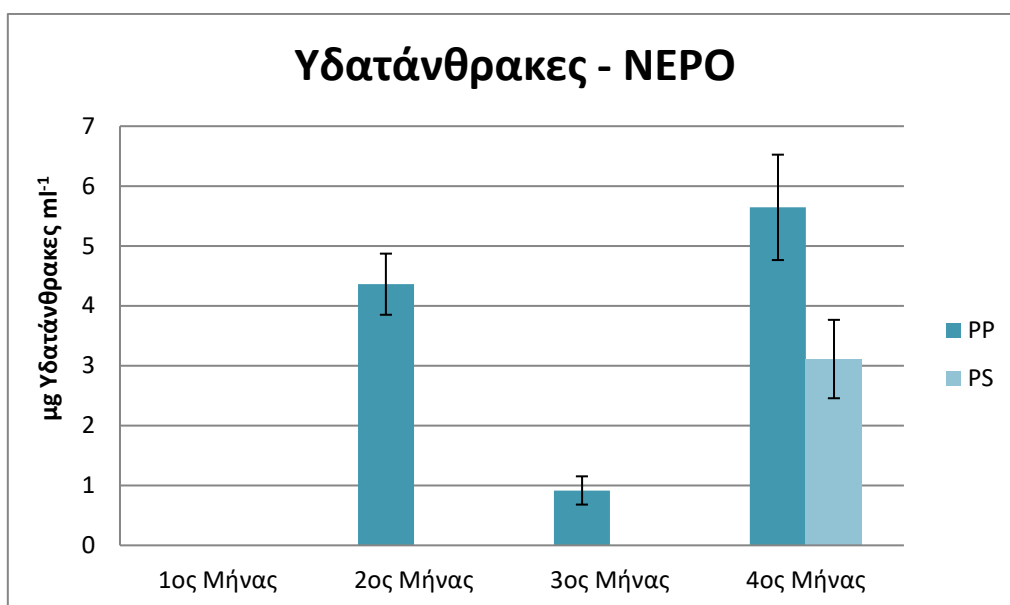
Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο δείγμα 'BIOΦΙΛΜ'

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο 'Βιοφίλμ' και για τα δυο είδη πλαστικών, υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας. Για το PP παρατηρήθηκε μια μείωση της συγκέντρωσης μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα. Αυτή η αλλαγή πιθανώς να οφείλεται στις oligotrophic συνθήκες που μπορεί να επικράτησαν στο διάστημα αυτό. Ωστόσο τον 4<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση έλαβε την μέγιστη τιμή 702,18  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Παρόμοιο μοτίβο ακολούθησε και το PS, όπου τον 4<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση υπολογίστηκε σε 304,05  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

#### 4.4.2.ΟΛΙΚΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

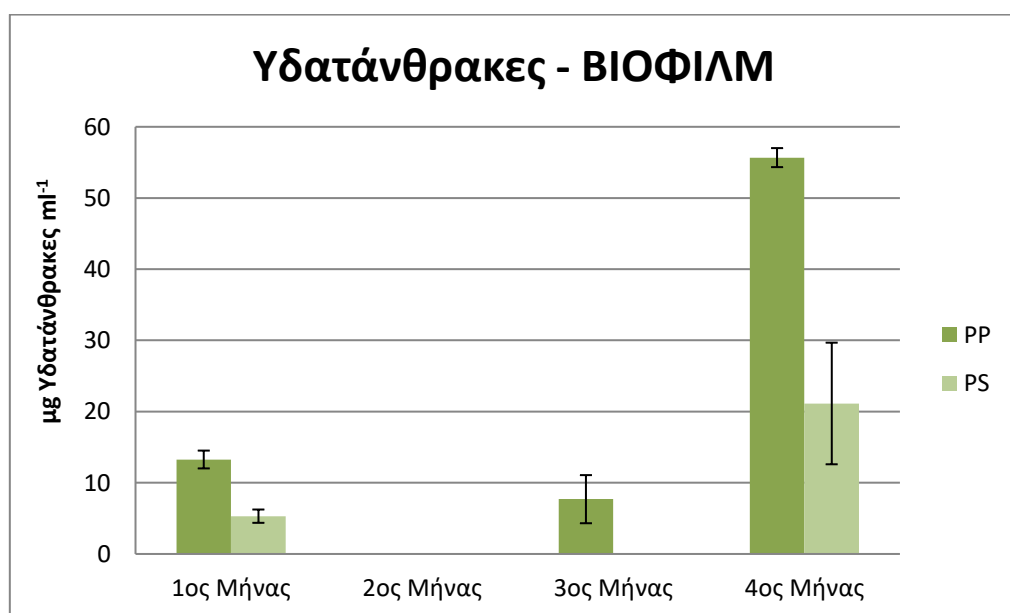
Οι υδατάνθρακες, αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών, που ως προς το χημικό τύπο τους, είναι ενυδατωμένος άνθρακας, με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Εκτός από άνθρακα αποτελούνται από υδρογόνο και οξυγόνο σε αναλογία 2:1. Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμα και γλυκίδια, αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη (Wikipedia). Οι υδατάνθρακες χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας και ως ουσιαστικές δομικές συνιστώσες στους οργανισμούς. Επιπλέον, μέρος της δομής των νουκλεϊκών οξέων, που περιέχουν γενετικές πληροφορίες, αποτελείται από υδατάνθρακες (Encyclopedia Britannica). Γενικά οι υδατάνθρακες είναι πηγή άνθρακα για μικρο και μακρο-οργανισμούς για αυτό και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες.

Όπως προαναφέρθηκε (Κεφάλαιο 3.2.5.2.), για τον υπολογισμό των ολικών υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανθρόνης. Η περιεκτικότητα του νερού σε υδατάνθρακες υπολογίστηκε σε μονάδες  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ενώ η περιεκτικότητα της επιφάνειας των πλαστικών υπολογίστηκε σε  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Τα αποτελέσματα και για τα δύο είδη πλαστικών παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση υδατανθράκων στο δείγμα 'ΝΕΡΟ'

Η συγκέντρωση των υδατανθράκων στο νερό και στα δυο πλαστικά τον πρώτο μήνα ήταν αρκετά χαμηλή, ώστε να μην μπορεί να ανιχνευθεί από το μηχάνημα. Ωστόσο τον 2<sup>ο</sup> μήνα, η συγκέντρωση των υδατανθράκων στο PP παρουσιάζει μια σημαντική αύξηση (4,36 μg ml<sup>-1</sup>), στη συνέχεια μειώνεται αρκετά (0,92 μg ml<sup>-1</sup>) ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα λαμβάνει την μέγιστη τιμή της (5,64 μg ml<sup>-1</sup>). Αντιθέτως, στο PS η συγκέντρωση παραμένει αρκετά χαμηλή, εκτός από τον 4<sup>ο</sup> μήνα όπου υπολογίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση ίση με 3,11 μg ml<sup>-1</sup>.

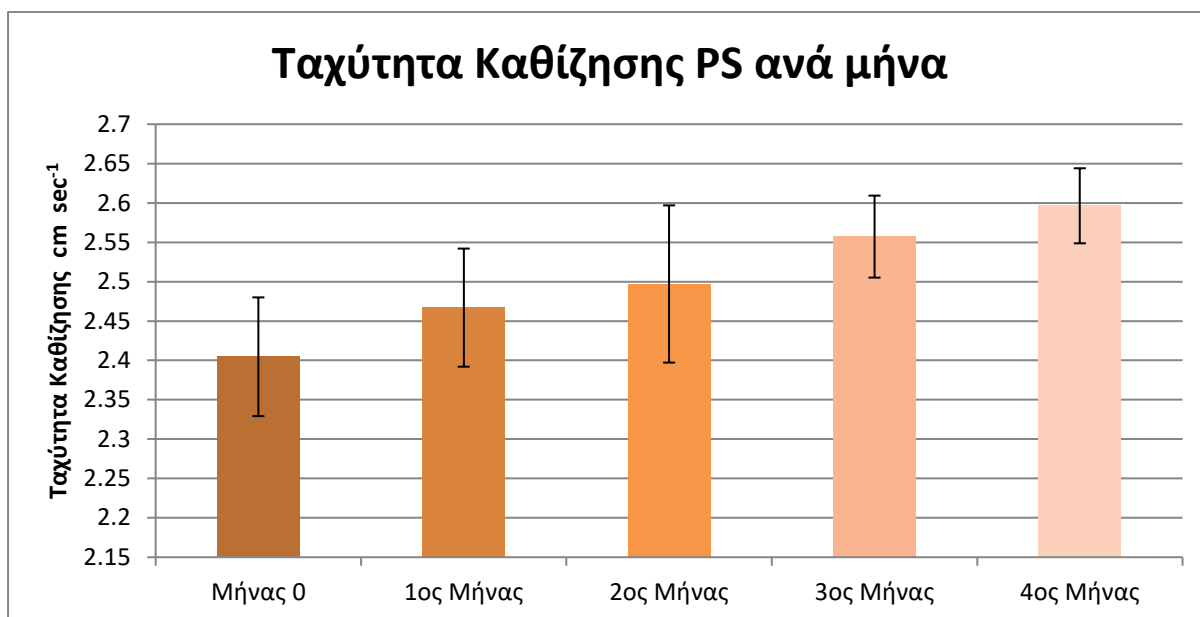


Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση υδατανθράκων στο δείγμα 'ΒΙΟΦΙΛΜ'

Οι συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στην επιφάνεια των πλαστικών παρουσιάζουν διαφορετικό μοτίβο σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στο νερό. Συγκεκριμένα οι υδατάνθρακες για το PP τον 1<sup>ο</sup> μήνα δειγματοληψίας υπολογίστηκαν 13,27  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , τον 2<sup>ο</sup> μήνα μειώθηκαν κατά ένα μικρό ποσοστό, ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα αυξήθηκαν αρκετά καθώς υπολογίστηκαν 55,67  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Την ίδια τάση ακολούθησε και το PS καθώς τον 1<sup>ο</sup> μήνα υπολογίστηκε η συγκέντρωση των υδατανθράκων ίση με 5,30  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , στη συνέχεια μειώθηκε ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα αυξήθηκε αρκετά και υπολογίστηκε σε 21,14  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Τα EPS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή προσαρμογή, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που επιτρέπει τη διατήρησή τους. Οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες διακατέχουν σημαντικό ρόλο στη δομή και στην διατήρηση του βιοφίλμ, το οποίο με τη σειρά του έχει την ικανότητα να σχηματίζει σταθερές κοινότητες, επιτρέπει την ανταλλαγή γονιδίων, αποθηκεύει θρεπτικά συστατικά από την υδάτινη φάση και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικές ουσίες και αποξήρανση (Mohan 2010). Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί πως τα EPS διαδραματίζουν έναν ακόμη σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια των πλαστικών και μετέπειτα στον σχηματισμό του βιοφίλμ. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένοι πολυσακχαρίτες των EPS (πολύ-β-1,6 ακετυλο-γλυκοζαμίνη (PGA), κυτταρίνη και κολανικό οξύ), είναι απαραίτητοι για τη βέλτιστη σύνδεση του βακτηρίου *Escherichia coli* με πλαστικές επιφάνειες (Matthysse et al. 2008). Σύμφωνα με το Διάγραμμα 9 και το Διάγραμμα 11, η παραγωγή τόσο των πρωτεϊνών όσο και των υδατανθράκων στην επιφάνεια των pellets από τον πρώτο μήνα ήταν αξιοσημείωτη, γεγονός που δείχνει τον επιτυχή εγκλιματισμό των μικροοργανισμών από τον 1<sup>ο</sup> μήνα. Επιπροσθέτως, είναι γνωστό ότι η παραγωγή των EPS επηρεάζεται από την κατάσταση των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης. Συγκεκριμένα η περίσσεια του διαθέσιμου άνθρακα και ο περιορισμός του αζώτου, του καλίου ή του φωσφορικού άλατος προάγουν τη σύνθεση των EPS (I. W. Sutherland 2001). Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρήθηκε μια μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων μεταξύ 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα που πιθανώς να οφειλόταν στις ολιγοτροφικές συνθήκες που επικράτησαν στο διάστημα αυτό. Αντιθέτως η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που παρατηρήθηκε και στα δυο είδη πλαστικών τον τελευταίο μήνα, οφείλεται στη προσθήκη φωσφόρου και αζώτου που πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια του 3<sup>ου</sup> μήνα. Αντικρουόμενα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο Διάγραμμα 8 και στο Διάγραμμα 10. Συγκεκριμένα όσον αφορά το PS η συγκέντρωση των πρωτεϊνών όσο και των υδατανθράκων τόσο κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα όσο και κατά τη διάρκεια του πειράματος, (πέρα από τον 4<sup>ο</sup> όπου όλες οι μετρήσεις παρουσιάζουν αύξηση) είναι αρκετά χαμηλές (στα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος). Σε σχέση με τα διαγράμματα μείωσης βάρους και μικροβιακής ανάπτυξης, παρατηρούμε ότι υπάρχει μια λογική συσχέτιση, καθώς τον 4<sup>ο</sup> μήνα όπου έχουμε αύξηση της μικροβιακής ανάπτυξης, αντίστοιχα έχουμε τη μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών και υδατανθράκων, ενώ παρατηρείται και μέγιστη απώλεια βάρους των μικροσφαιριδίων.

#### 4.5.ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ

Η μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας τον χρόνο που χρειάζεται το μικροπλαστικό να διαπεράσει τον αριθμημένο ογκομετρικό κύλινδρο και να κατακαθίσει στον πυθμένα. Κατά την διάρκεια των 4 μηνών, τα pellets πολυστυρενίου παρουσίασαν μια εμφανή διαφορά στην ταχύτητα καθίζησης. Αντιθέτως, τα pellets πολυπροπυλενίου, δεν βυθίστηκαν σε καμία δειγματοληψία και παρέμεναν στην επιφάνεια. Η μεταβολή της ταχύτητας καθίζησης του PS από τον μήνα 0 μέχρι και τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα :

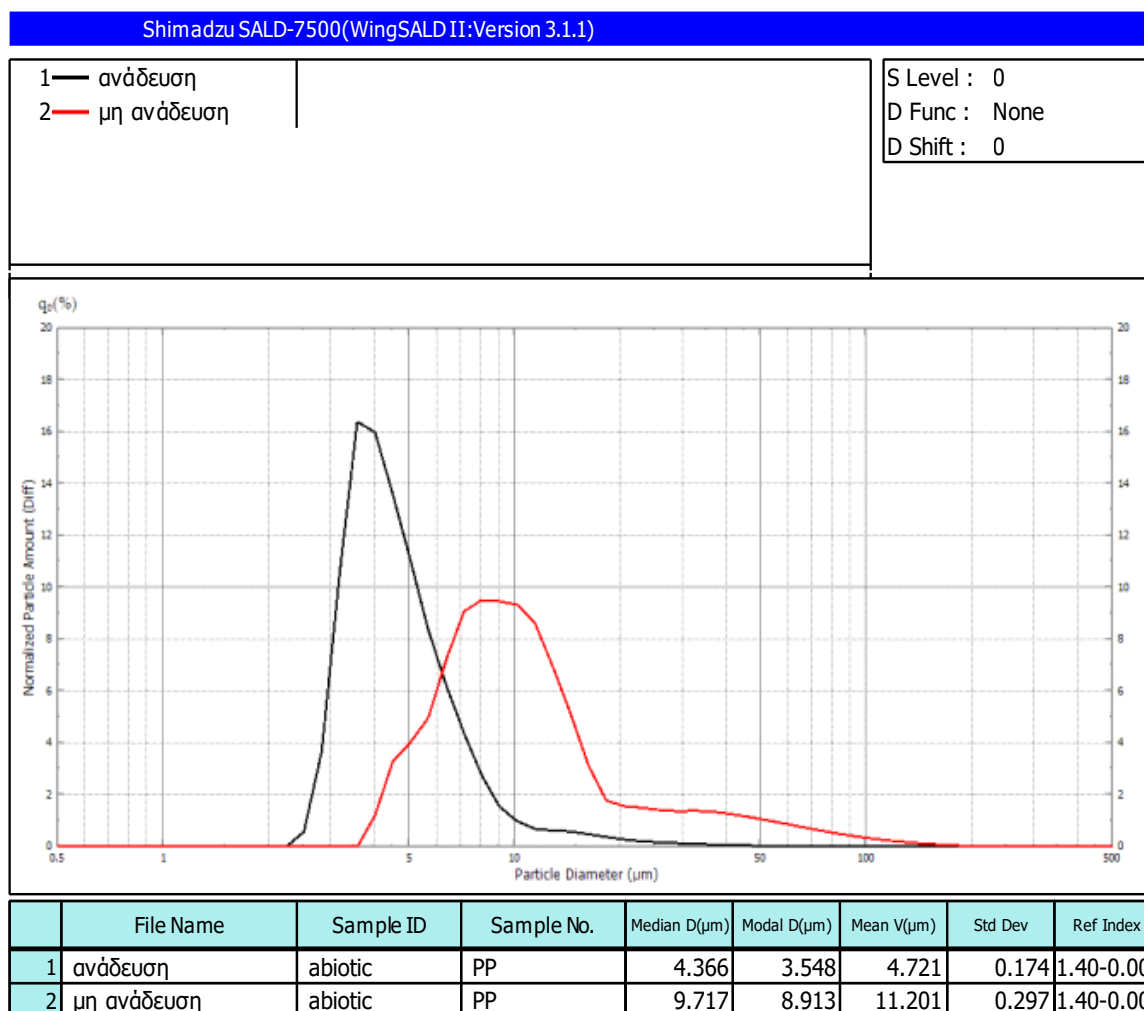


*Διάγραμμα 13: Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS)*

Από το διάγραμμα 13, είναι εμφανές ότι η ταχύτητα καθίζησης αυξάνεται συνεχώς κατά την περίοδο των 4 μηνών. Γενικά η κίνηση ενός μικροπλαστικού σωματιδίου στο θαλάσσιο περιβάλλον εξαρτάται από τις εξής δυνάμεις: τη δύναμη της βαρύτητας, τη δύναμη της πλευστότητας και την οπισθέλκουσα δύναμη. Οι δυνάμεις αυτές εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά του σωματιδίου και συγκεκριμένα το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα (Chubarenko et al. 2016). Επίσης η συμπεριφορά βύθισης των μικροπλαστικών μπορεί να μεταβληθεί από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ένας παράγοντας που επηρεάζει την ταχύτητα καθίζησης των μικροπλαστικών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι η αλατότητα. Στα φυσικά θαλάσσια ύδατα η πυκνότητα της θάλασσας αυξάνεται με το βάθος. Επομένως ορισμένα σωματίδια επιβραδύνονται κατά τη βύθιση τους σε μεγαλύτερα βάθη, και παραμένουν στάσιμα στο σημείο όπου η πυκνότητα του θαλασσινού νερού είναι περίπου ίση με την δική τους (Wang et al. 2016). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη βύθιση των μικροπλαστικών στο φυσικό θαλάσσιο περιβάλλον είναι η θερμοκρασία. Στο παρών πείραμα που περιγράφεται, η θερμοκρασία στην οποία διεξήχθη ήταν σταθερή περίπου 20° C. Ωστόσο σε εύκρατα παράκτια ύδατα όπως η επιφάνεια της Βαλτικής Θάλασσας, η θερμοκρασία μεταβάλλεται ετησίως κατά περίπου 15-16 ° C. Συνεπώς υπάρχει μια εποχική διακύμανση της ταχύτητας καθίζησης των μικροπλαστικών στο φυσικό περιβάλλον. Η ταχύτητα βύθισης είναι σαφώς βραδύτερη τον χειμώνα εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας που παρουσιάζεται. Αντίθετα κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, δημιουργείται μια διαστρωμάτωση της στήλης ύδατος όσο αφορά την θερμοκρασία (Lass and Matthäus 2008). Αποτελέσματα έρευνας, έδειξαν ότι η ταχύτητα καθίζησης των μικροπλαστικών στο θαλασσινό νερό, εξαρτάται από την αλατότητα, το σχήμα του σωματιδίου, την πυκνότητα του και το μέγεθος του. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι σε μικροσφαιρίδια (pellets) PS η ταχύτητα βύθισης μειώθηκε με την αύξηση της αλατότητας του υγρού (Kowalski et al. 2016).

#### 4.6.ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η διασπορά του μεγέθους των δευτερογενών μικροπλαστικών που δημιουργήθηκαν έπειτα από 4 μήνες επώαση με μικροοργανισμούς, υπολογίζονταν σε κάθε δειγματοληψία με το μηχάνημα SALD-7500 Nano. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η διακύμανση της διαμέτρου των μικροπλαστικών σε πραγματικό χρόνο.

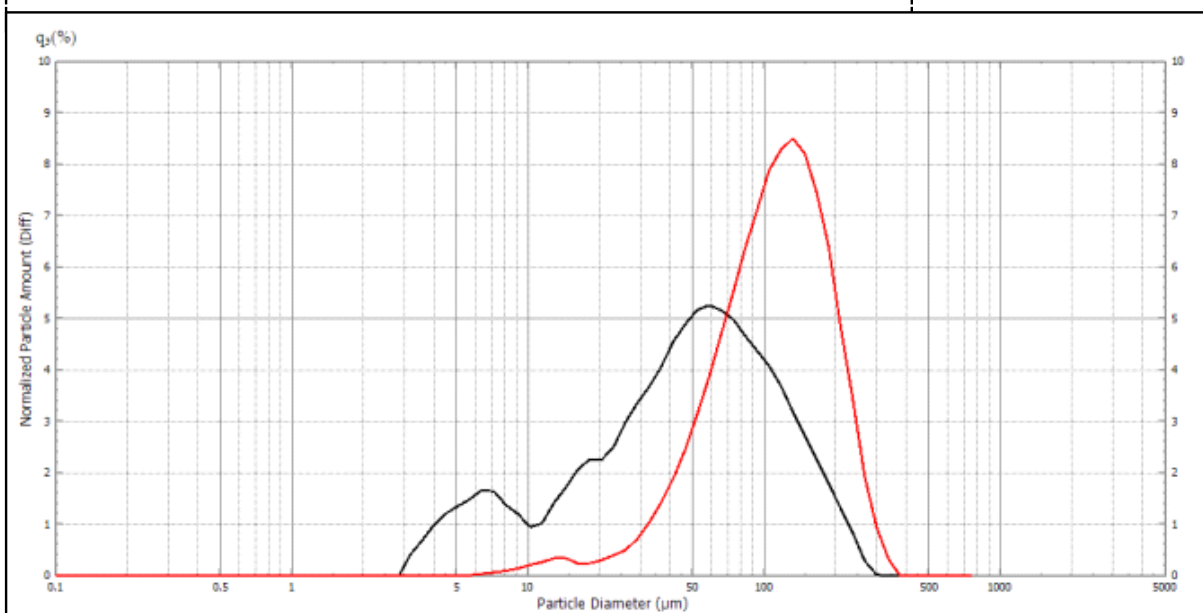


Διάγραμμα 14: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number)

Για τη διεκπεραίωση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 4 κωνικές φλάσκες που περιείχαν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και pellets PP και PS αντίστοιχα, χωρίς να εμβολιαστούν με μικροοργανισμούς, ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Οι δύο από αυτές τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης στις 120 στροφές, ώστε να επωαστούν στους 25 °C υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ οι υπόλοιπες δύο παρέμειναν σε ηρεμία, χωρίς ανάδευση σε σημείο του εργαστηρίου όπου ήταν εκτεθειμένο στις ακτίνες του ηλιακού φωτός. Στο διάγραμμα 14, παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών PP των αβιοτικών δειγμάτων ελέγχου με ανάδευση και χωρίς ανάδευση. Παρατηρείται λοιπόν ότι, το μέγεθος των σωματιδίων στα αβιοτικά δείγματα χωρίς ανάδευση έχει μέση διάμετρο 11,201 μm, σε αντίθεση με το μέγεθος των σωματιδίων στα αβιοτικά δείγματα με ανάδευση όπου η μέση διάμετρος ήταν 4,721 μm. Συνεπώς, κανένα δευτερογενές μικροπλαστικό δεν έχει διάμετρο <0,1 μm ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.

1 — ανάδευση  
2 — μη ανάδευση

S Level : 0  
D Func : None  
D Shift : 0



	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	ανάδευση	abiotic	PP	48.859	54.923	41.130	0.441	1.40-0.00i
2	μη ανάδευση	abiotic	PP	110.835	139.441	101.888	0.270	1.40-0.00i

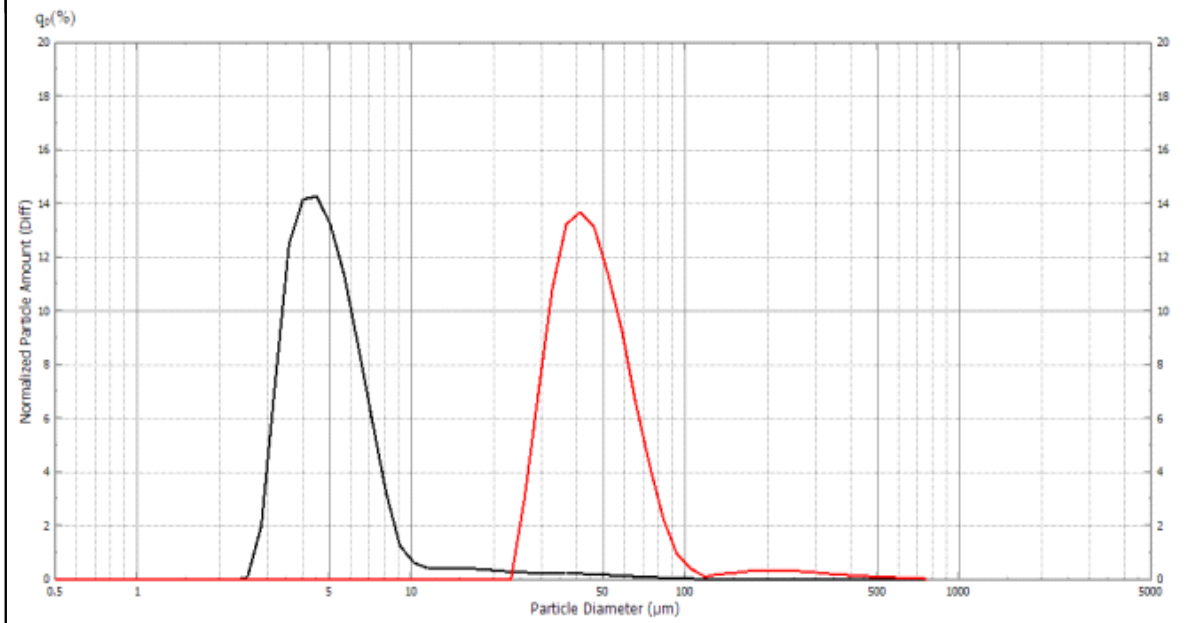
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση του όγκου τους (Volume)

Στο διάγραμμα 15, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατανομής της διαμέτρου των σωματιδίων PP στα αβιοτικά δείγματα ελέγχου με ανάδευση και χωρίς ανάδευση. Διαπιστώνεται και εδώ πως κανένα σωματίδιο δεν έχει διάμετρο  $<0,1 \mu\text{m}$  ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.



1 — ανάδευση  
2 — μη ανάδευση

S Level : 0  
D Func : None  
D Shift : 0

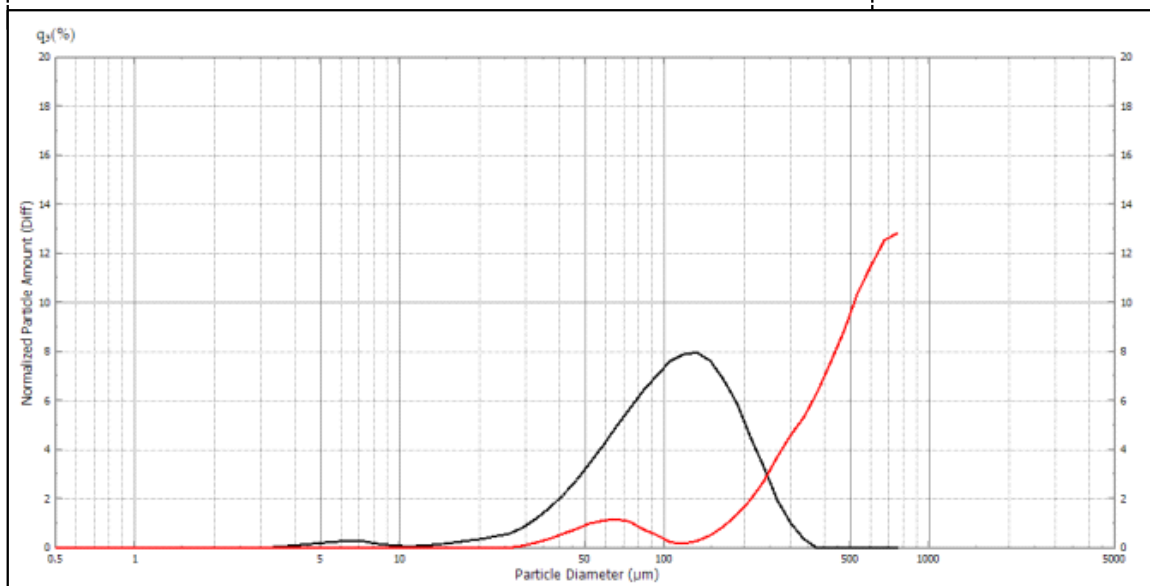


	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	ανάδευση	abiotic	PS	4.748	4.467	5.181	0.211	1.40-0.00i
2	μη ανάδευση	abiotic	PS	44.428	44.668	47.426	0.193	1.40-0.00i

Διάγραμμα 16: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number)

1 — ανάδευση  
2 — μη ανάδευση

S Level : 0  
D Func : None  
D Shift : 0



	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	ανάδευση	abiotic	PS	106.287	139.441	96.037	0.304	1.40-0.00i
2	μη ανάδευση	abiotic	PS	483.575	800.000	394.005	0.299	1.40-0.00i

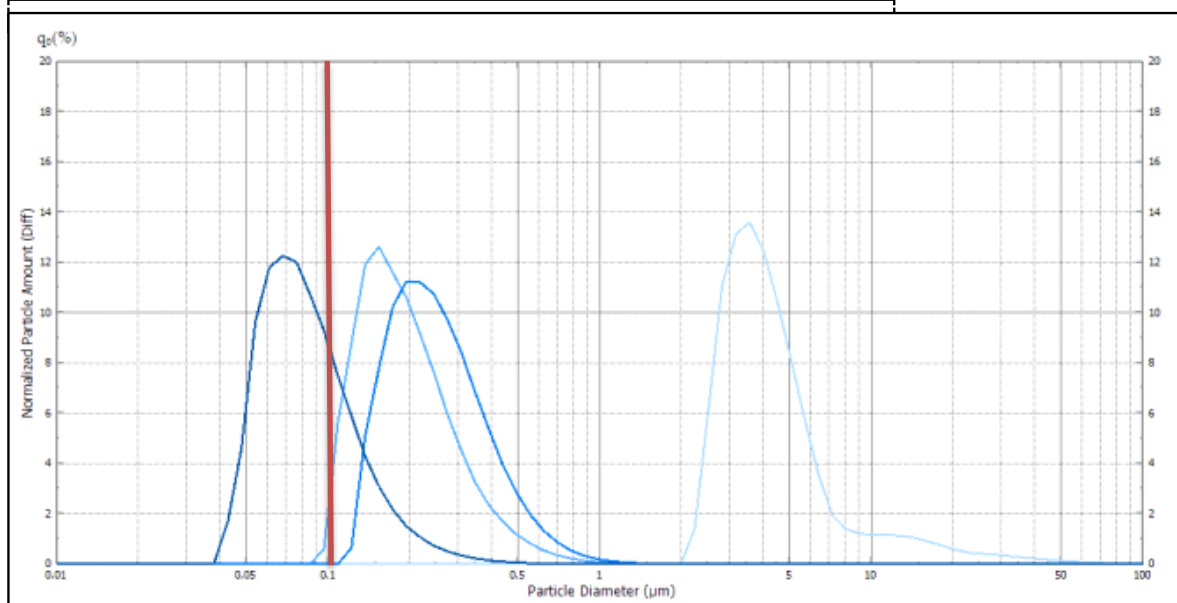
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση του όγκου τους (Volume)

Σύμφωνα με τα διαγράμματα 16 και 17, όπως διαπιστώθηκε και στα αβιοτικά δείγματα ελέγχου του πολυπροπυλενίου, κανένα σωματίδιο πολυστυρενίου δεν έχει διάμετρο  $<0,1 \mu\text{m}$  ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό. Συγκεντρωτικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα και των 4 διαγραμμάτων των αβιοτικών δειγμάτων ελέγχου τόσο του PP όσο και του PS (Διάγραμμα 14,15,16 και 17), στις φλάσκες με ανάδευση υπήρχε ένα μικρό ποσοστό κατακερματισμού των σωματιδίων, αλλά η διάμετρος τους ήταν σχετικά μεγάλη. Συνεπώς δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός νανοσωματιδίων από pellets PP και PS λόγω μηχανικής ανάδευσης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των μικροπλαστικών PP και PS αντίστοιχα βάση της ποσότητας τους (Number) και του όγκου τους (Volume) ανά μήνα μετά από την έκθεσή τους σε μικροοργανισμούς.

1 — 1st PP #1-00054S  
 2 — 2nd PP #7-00065S  
 3 — 3rd PP 11-00071S  
 4 — 4th PP 9-00125S

S Level : 0  
 D Func : None  
 D Shift : 0



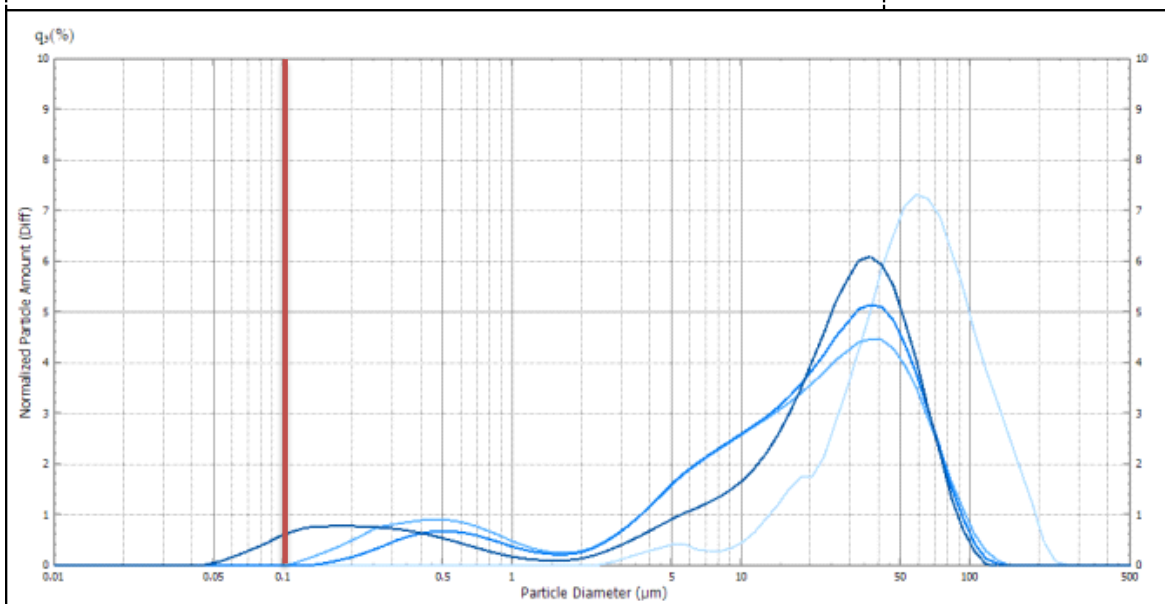
	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	1st PP #1-00054S			3.923	3.548	4.491	0.238	1.40-0.00i
2	2nd PP #7-00065S			0.181	0.141	0.193	0.180	1.40-0.00i
3	3rd PP 11-00071S			0.240	0.224	0.253	0.184	1.40-0.00i
4	4th PP 9-00125S			0.079	0.071	0.084	0.179	1.40-0.00i

Διάγραμμα 18: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PP βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών PP με βάση τον αριθμό τους. Παρατηρείται ότι με την πάροδο του χρόνου η μέση διάμετρος μειώνεται αρκετά, πέρα από τον 3<sup>ο</sup> μήνα όπου διαπιστώνεται μια μικρή αύξηση. Συγκεκριμένα τον 1<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος υπολογίστηκε 4,491 μm ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα υπολογίστηκε 0,084μm.

1 — 1st PP #1-00054S  
 2 — 2nd PP #7-00065S  
 3 — 3rd PP 11-00071S  
 4 — 4th PP 9-00125S

S Level : 0  
 D Func : None  
 D Shift : 0

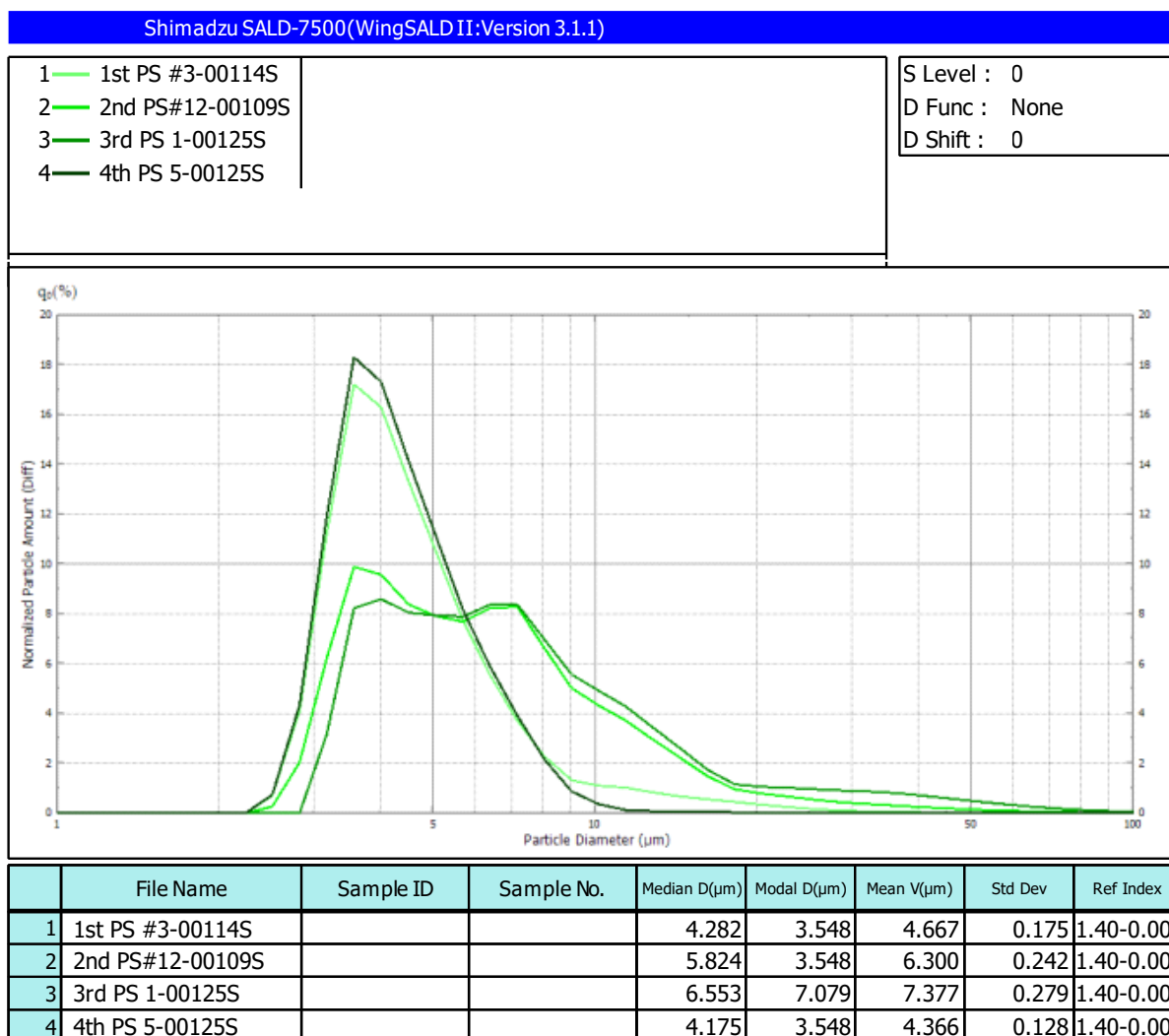


	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	1st PP #1-00054S			55.758	54.923	51.084	0.326	1.40-0.00i
2	2nd PP #7-00065S			19.131	34.469	12.391	0.685	1.40-0.00i
3	3rd PP 11-00071S			21.724	34.469	15.367	0.587	1.40-0.00i
4	4th PP 9-00125S			24.833	34.469	12.768	0.789	1.40-0.00i

Διάγραμμα 19: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του όγκου τους ανά μήνα (Volume)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται και πάλι η διασπορά των μικροπλαστικών PP στο εξεταζόμενο υγρό, με κριτήριο αυτή τη φορά τον όγκο τους. Παρατηρείται λοιπόν ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων μειώνεται αρκετά, καθώς τον 1<sup>ο</sup> μήνα υπολογίστηκε 51,084 μm ενώ τον 2<sup>ο</sup> μήνα υπολογίστηκε 12,391 μm. Το μοτίβο μείωσης της μέσης διαμέτρου είναι παρόμοιο με το διάγραμμα κατανομής με βάση τον αριθμό τους. Ωστόσο η μέγιστη διάμετρος που ανιχνεύθηκε σύμφωνα με το Διάγραμμα 19, κυμαίνεται στα 54,923 μm, σε αντίθεση με το Διάγραμμα 18, όπου η μέγιστη διάμετρος υπολογίστηκε 3,548 μm. Στο σημείο αυτό πρέπει να γίνει κατανοητή η βασική διαφορά ανάμεσα στην κατανομή της διαμέτρου των σωματιδίων με βάση τον αριθμό και με βάση τον όγκο. Μπορεί ο αριθμός των σωματιδίων με μεγάλη διάμετρο να συμπίπτει με τον αριθμό των σωματιδίων μικρότερης διαμέτρου, ωστόσο ο όγκος τους διαφέρει. Συγκεκριμένα ο όγκος των σωματιδίων μεγαλύτερης διαμέτρου θα είναι μεγαλύτερος από τον όγκο των σωματιδίων μικρότερης διαμέτρου, εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους που καταλαμβάνουν. Στο παραπάνω Διάγραμμα, σε σχέση με τον όγκο των μεγαλύτερων σωματιδίων, η συχνότητα εμφάνισης μικρού σχετικά όγκου σωματιδίων διαμέτρου <0,1 μm είναι αξιοσημείωτη και συμπεραίνεται η μεγάλη συγκέντρωση τους στο δείγμα. Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 18 και 19, διαπιστώνεται η ύπαρξη νανοσωματιδίων (διαμέτρου <0,1μm) στο δείγμα που αντιστοιχεί στα

pellets PP, εξαιτίας της βιοαποδόμησης τους από τους μικροοργανισμούς της πελαγικής κοινότητας AGIOS PE. Με βάση τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των αβιοτικών δειγμάτων συμπεραίνουμε ότι ο σχηματισμός νανοσωματιδίων οφείλεται καθαρά και μόνο στη βιοαποδόμηση, και όχι σε συνδυασμό με τη μηχανική ανάδευση.

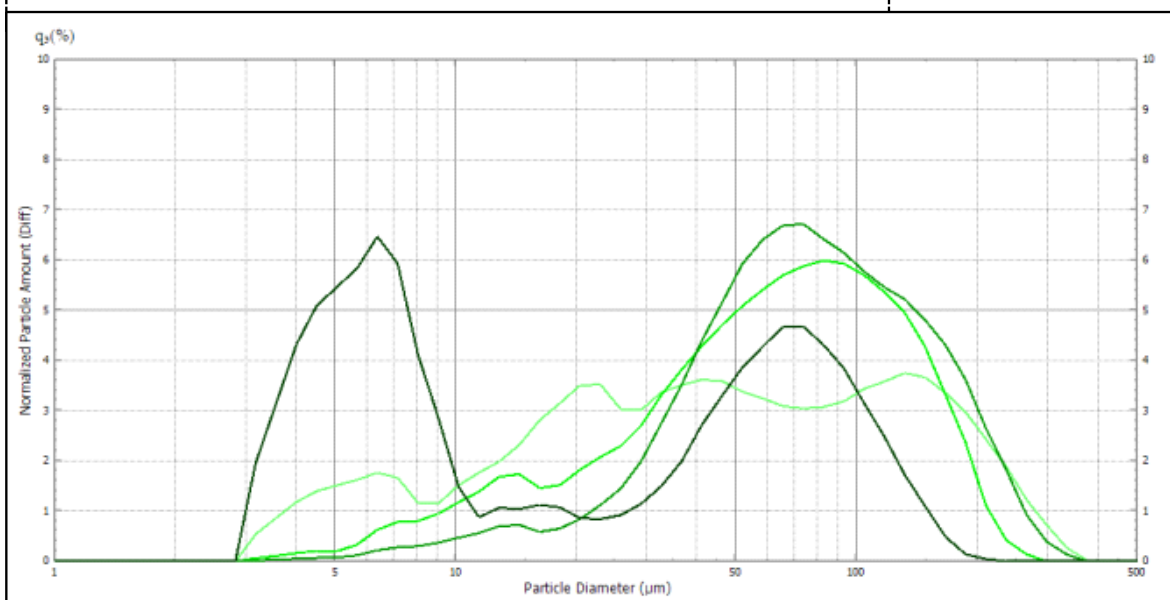


Διάγραμμα 20: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών PS με τον μεγαλύτερο αριθμό. Η κατανομή μεγέθους της διαμέτρου των σωματιδίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς από τον 1<sup>ο</sup> μήνα όπου η μέση διάμετρος ήταν 4,667 μm, στη συνέχεια αυξάνεται φτάνοντας τον 3<sup>ο</sup> μήνα ίση με 7,377 μm, ενώ τον 4<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος καταλήγει περίπου στην ίδια τιμή με του 1<sup>ου</sup> μήνα και συγκεκριμένα ίση με 4,336μm. Τα ελεύθερα κύτταρα μπορεί να επηρέασαν τις τιμές του 1<sup>ου</sup> μήνα όπου η μικροβιακή ανάπτυξη έλαβε και τη μέγιστη τιμή ίση με  $4 \cdot 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>. Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, στα διαγράμματα κατανομής Number, παρουσιάζεται η κατανομή της διαμέτρου των σωματιδίων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Συνεπώς στο εξεταζόμενο υγρό του 1<sup>ου</sup> μήνα, υπήρχαν μεγαλύτερα κομμάτια τα οποία δεν παρουσιάζονται σε αυτό το διάγραμμα, αλλά στο Διάγραμμα 21.

1 1st PS #3-00114S  
 2 2nd PS#12-00109S  
 3 3rd PS 1-00125S  
 4 4th PS 5-00125S

S Level : 0  
 D Func : None  
 D Shift : 0



	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	1st PS #3-00114S			43.517	139.441	40.681	0.495	1.40-0.00i
2	2nd PS#12-00109S			63.254	87.513	54.787	0.369	1.40-0.00i
3	3rd PS 1-00125S			74.910	69.328	71.528	0.318	1.40-0.00i
4	4th PS 5-00125S			15.742	6.750	19.052	0.541	1.40-0.00i

Διάγραμμα 21: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του όγκου τους ανά μήνα (Volume)

Σύμφωνα με τα δεδομένα του διαγράμματος 21, παρατηρείται διακύμανση του όγκου των σωματιδίων με διαφορετικές διαμέτρους και τους 4 μήνες του πειράματος. Συγκεκριμένα τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται στο διάγραμμα μια σημαντική κορυφή περίπου στα 4μm. Η ύπαρξη αυτής της κορυφής στα 4 μm συμφωνεί με το προηγούμενο διάγραμμα, όπου η συγκέντρωση των σωματιδίων με διάμετρο μεταξύ 2-5 μm ήταν μεγάλη.

## 5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βυθισμένα πλαστικά καθώς και τα πλαστικά που επιπλέουν στην επιφάνεια της θάλασσας, αποικίζονται από διάφορα μικροβιακά είδη. Η ικανότητα των θαλάσσιων μικροοργανισμών να βιοαποδομήσουν πολυμερή χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα τα ίδια τα πλαστικά, είναι ένα σχετικά καινούριο ερευνητικό πεδίο. Στη παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση των βιοτικών παραγόντων σε μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου και πολυπροπυλενίου, τα οποία είχαν προ-επεξεργαστεί με την έκθεση τους σε UV-A ακτινοβολία για διάστημα 4 μηνών. Αναλύοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η γήρανση των pellets PS έπειτα από 4μηνή έκθεση σε ακτινοβολία UV-A, προκάλεσε όχι μόνο αλλαγή στο χρώμα τους, αλλά αύξησε και την ταχύτητα καθίζησης τους. Αντίθετα η 4μηνή έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, δεν ήταν αρκετή για τα μικροσφαιρίδια πολυπροπυλενίου, ώστε να αλλάξει η πυκνότητά τους και να βυθιστούν.
- Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί από τις πελαγικές κοινότητες του Άγιου Ονούφριου στα Χανιά, μπορούν να ευδοκιμήσουν και να αναπτυχθούν επιτυχώς σε περιβάλλον όπου η μοναδική πηγή άνθρακα είναι μικροσφαιρίδια PS και PP.
- Η μείωση των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών EPS (συγκεκριμένα πρωτεΐνες και υδατάνθρακες) στο διάστημα 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> μήνα, σε σχέση με τη σχετική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια των πλαστικών, υποδηλώνει την άμεση αλληλεπίδραση του βιοφίλμ με τα EPS. Το γεγονός επιβεβαιώνεται επίσης από την αύξηση τόσο της μικροβιακής ανάπτυξης όσο και των EPS, τον 4<sup>ο</sup> μήνα.
- Τον 4<sup>ο</sup> μήνα η αύξηση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, σε συνδυασμό με την μέγιστη μικροβιακή ανάπτυξη και την μέγιστη απώλεια βάρους, υποδηλώνει την επιτυχής βιοαποδόμηση των μικροσφαιριδίων από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς.
- Λαμβάνοντας υπόψη τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων στα αβιοτικά δείγματα ελέγχου, προτείνεται ότι η μηχανική ανάδευση δεν προκαλεί τον κατακερματισμό των μικροσφαιριδίων σε σωματίδια διαμέτρου <0,1 μm. Ωστόσο σύμφωνα με τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων PP, στα οποία παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό νανοσωματιδίων, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ο σχηματισμός νανοσωματιδίων είναι αποτέλεσμα βιοαποδόμησης τους από τους μικροοργανισμούς της πελαγικής κοινότητας.
- Αναφορικά με τα pellets πολυστυρενίου, και σύμφωνα με τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους, διαπιστώθηκε ένα μικρό ποσοστό βιοαποδόμησης τους και σχηματισμός μικρότερων σωματιδίων. Ωστόσο το πολύ μικρό ποσοστό μείωσης βάρους σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου πολυμερούς, υποδηλώνει την δυσκολία βιοαποδόμησης του και την ανάγκη βέλτιστων συνθηκών ή διερεύνησης άλλων παραγόντων.

Τα παραπάνω στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί μπορούν να βιοαποδομήσουν τα pellets πολυστυρενίου και πολυπροπυλενίου, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον όπου η μοναδική πηγή άνθρακα είναι τα πλαστικά μικροσφαιρίδια. Ωστόσο η βιοαποδόμηση των πλαστικών στο φυσικό περιβάλλον είναι μια πολύ αργή διαδικασία και σε συνδυασμό με την ύπαρξη νανοσωματιδίων καθώς και αύξησης των πολυμερών ουσιών και της



μικροβιακής ανάπτυξης από τον 4 μήνα και μετά, διαπιστώνεται ότι οι 4 μήνες είναι λίγος χρόνος για την πλήρη αποδόμηση των πλαστικών.

#### Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Αν και υπάρχουν αρκετές έρευνες που αποδεικνύουν την βιοαποδόμηση τόσο του πολυστυρενίου όσο και του πολυπροπυλενίου από μικροοργανισμούς τόσο της θάλασσας όσο και του εδάφους, εξακολουθούν να υπάρχουν ελλειπείς γνώσεις σχετικά με τον πλήρη μηχανισμό βιοαποδόμησης. Ιδιαίτερα στο φυσικό θαλάσσιο περιβάλλον, όπου η αποδόμηση των πλαστικών είναι αποτέλεσμα διαφόρων φυσικών, χημικών και βιολογικών μηχανισμών, ο συνδυασμός όλων αυτών μπορεί να καταφέρει την κατανόηση και την διαλεύκανση του προβλήματος συσσώρευσης των πλαστικών στις θάλασσες. Ο τρόπος με τον οποίο μικροπλαστικά χαμηλής πυκνότητας όπως PE, PP, LDPE κλπ, έχουν βρεθεί σε βενθικά ιζήματα και στο βυθό πολλών ωκεανών, αποτελεί ένα ιδιαίτερο και πολλά υποσχόμενο αντικείμενο έρευνας. Επίσης ένας άλλος σημαντικός τομέας έρευνας αποτελεί η ικανότητα των μικροπλαστικών να τροποποιούν τη δομή του πληθυσμού (Wright et al. 2013), γεγονός που μπορεί να επιφέρει δυνητικές επιπτώσεις στη δυναμική των οικοσυστημάτων.

Παρόλο που τα θαλάσσια απορρίμματα είναι μία μόνο από τις πιέσεις που ασκούνται στην ευημερία του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αποτελεί ωστόσο αυξανόμενη ανησυχία στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, με πλήθος ερευνών να αποδεικνύει τους κινδύνους και τις δυσμενείς επιπτώσεις στα οικοσυστήματα και στη ζωή των ανθρώπων καθημερινά. Τα πλαστικά απορρίμματα στη θάλασσα αποτελούν διασυννοριακό πρόβλημα και πλέον είναι ευθύνη όλων μας για τον περιορισμό του προβλήματος, που αναγνωρίζεται ως το σημαντικότερο περιβαλλοντικό πρόβλημα του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Ο σύγχρονος άνθρωπος θα πρέπει να εντάξει την ανακύκλωση στη καθημερινότητα του, να μην επιλέγει πλαστικά μιας χρήσης και να αποφεύγει πλαστικές συσκευασίες. Τέλος, η έκταση του προβλήματος ενισχύει την ανάγκη για δράσεις από κυβερνήσεις και επιχειρήσεις, ώστε να περιοριστεί η ρύπανση των θαλάσσιων και παράκτιων οικοσυστημάτων από πλαστικά απορρίμματα.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adav, Sunil S., Duu Jong Lee, and Joo Hwa Tay. 2008. "Extracellular Polymeric Substances and Structural Stability of Aerobic Granule." *Water Research* 42(6–7): 1644–50.
- Alomar, Carme, and Salud Deudero. 2017. "Evidence of Microplastic Ingestion in the Shark *Galeus Melastomus Rafinesque*, 1810 in the Continental Shelf off the Western Mediterranean Sea." *Environmental Pollution*.
- Amaral-Zettler. 2013. "Life in the 'Plastisphere': Microbial Communities on Plastic Marine Debris." *Environ. Sci. Technol.* 47: 7137.
- Andrady. 2011. "Microplastics in the Marine Environment." *Marine Pollution Bulletin* 62(8): 1596–1605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.
- Andrady, Anthony L. 1994. "Assessment of Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers." *Journal of Macromolecular Science, Part C*.
- Auta, H. S., C. U. Emenike, and S. H. Fauziah. 2017. "Screening of *Bacillus* Strains Isolated from Mangrove Ecosystems in Peninsular Malaysia for Microplastic Degradation." *Environmental Pollution*.
- Auta, H. S., C. U. Emenike, B. Jayanthi, and S. H. Fauziah. 2018. "Growth Kinetics and Biodeterioration of Polypropylene Microplastics by *Bacillus* Sp. and *Rhodococcus* Sp. Isolated from Mangrove Sediment." *Marine Pollution Bulletin*.
- Bakir et al. 2014. "Enhanced Desorption of Persistent Organic Pollutants from Microplastics under Simulated Physiological Conditions." *Environmental Pollution*.
- Barnes, David K.A., Francois Galgani, Richard C. Thompson, and Morton Barlaz. 2009. "Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1985–98.
- Berit Gewert, Merle Plassmann M., and Matthew MacLeod. 2015. "Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in the Marine Environment." *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 17(9): 1513–21. <http://dx.doi.org/10.1039/C5EM00207A>.
- Blight, Louise K., and Alan E. Burger. 1997. "Occurrence of Plastic Particles in Sea- Birds from the Eastern North Pacific." *Marine Pollution Bulletin*.
- Browne. 2010. "Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines." *Environmental Science and Technology*.
- Browne et al. 2007. "What Is the Extent of Microplastic Contamination in Habitats?" 3(4): 2004–6.
- Bugoni L, Krause L, Petry MV. 2001. "Marine Debris and Human Impacts on Sea Turtles in Southern Brazil." *Marine Pollution Bulletin*.
- Carr, Archie. 1987. "Impact of Nondegradable Marine Debris on the Ecology and Survival Outlook of Sea Turtles." *Marine Pollution Bulletin*.
- Chubarenko, I., A. Bagaev, M. Zobkov, and E. Esiukova. 2016. "On Some Physical and Dynamical Properties of Microplastic Particles in Marine Environment." *Marine Pollution Bulletin* 108(1–2): 105–12.
- Cole, Matthew, Pennie Lindeque, Claudia Halsband, and Tamara S. Galloway. 2011. "Microplastics as

- Contaminants in the Marine Environment: A Review." *Marine Pollution Bulletin* 62(12): 2588–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>.
- Colton et al. 1974. "Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic." *Science (New York, N.Y.)*.
- Derraik, J. G B. 2002. "The Pollution of the Marine Environment by Plastic Debris: A Review." *Marine Pollution Bulletin* 44(9): 842–52.
- Deudero, Salud, and Carme Alomar. 2015. "Mediterranean Marine Biodiversity under Threat: Reviewing Influence of Marine Litter on Species." *Marine Pollution Bulletin*.
- Dias, Braulio Ferreira De Souza, and Thomas E. Lovejoy. 2012. CBD Technical Series *Impacts of Marine Debris on Biodiversity: Current Status and Potential Solutions*.
- Duguy et al. 1998. "Factors of Mortality of Marine Turtles in the Bay of Biscay." *Oceanologia Acta* 21: 383– 388.
- Eriksen, Marcus 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(12): 1–15.
- Fendall, Lisa S., and Mary A. Sewell. 2009. "Contributing to Marine Pollution by Washing Your Face: Microplastics in Facial Cleansers." *Marine Pollution Bulletin*.
- Galgani et al. 2010. Group *Marine Strategy Framework Directive: Task Group 10 Report Marine Litter*.
- Gijsman, Pieter, Guido Meijers, and Giacomo Vitarelli. 1999. "Comparison of the UV-Degradation Chemistry of Polypropylene, Polyethylene, Polyamide 6 and Polybutylene Terephthalate." *Polymer Degradation and Stability*.
- Gramentz, Dieter. 1988. "Involvement of Loggerhead Turtle with the Plastic, Metal, and Hydrocarbon Pollution in the Central Mediterranean." *Marine Pollution Bulletin*.
- Gregory, Murray R. 1996. "Plastic Scrubbers' in Hand Cleansers: A Further (and Minor) Source for Marine Pollution Identified." *Marine Pollution Bulletin*.
- Grima, S., V. Bellon-Maurel, P. Feuilloley, and F. Silvestre. 2000. "Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulations." *Journal of Polymers and the Environment*.
- Gu, Ji Guang, and Ji Dong Gu. 2005. "Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review." *Journal of Polymers and the Environment*.
- Harrison, Jesse P., Melanie Sapp, Michaela Schratzberger, and A. Mark Osborn. 2011. "Interactions Between Microorganisms and Marine Microplastics: A Call for Research." *Marine Technology Society Journal* 45(2): 12–20.  
<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0025-3324&volume=45&issue=2&page=12>.
- Klein, Sascha, Ian K Dimzon, Jan Eubeler, and Thomas P Knepper. 2018. "Freshwater Microplastics." 58: 51–67. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61615-5>.
- Koelmans, Albert A. et al. 2014. "Plastics in the Marine Environment." *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(1): 5–10.

- Kowalski, Nicole, Aurelia M. Reichardt, and Joanna J. Waniek. 2016. "Sinking Rates of Microplastics and Potential Implications of Their Alteration by Physical, Biological, and Chemical Factors." *Marine Pollution Bulletin*.
- Kulonen, E., and N. Hallman. 1956. "On the Iodide-Oxidising Substance in Urine II. Chemical Studies." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 8(3): 234–36.
- Lapidou, Chrysi S., and Bruce E. Rittmann. 2002. "A Unified Theory for Extracellular Polymeric Substances, Soluble Microbial Products, and Active and Inert Biomass." *Water Research*.
- Lass, Hans Ulrich, and Wolfgang Matthäus. 2008. "General Oceanography of the Baltic Sea." In *State and Evolution of the Baltic Sea, 1952-2005: A Detailed 50-Year Survey of Meteorology and Climate, Physics, Chemistry, Biology, and Marine Environment*,.
- Liao, C., X. Liang, Michelle L. Soupir, and L. R. Jarboe. 2015. "Cellular, Particle and Environmental Parameters Influencing Attachment in Surface Waters: A Review." *Journal of Applied Microbiology* 119(2): 315–30.
- Maier, Raina M. 2009. "Bacterial Growth." *Environmental Microbiology*: 37–54.
- Matthysse, Ann G., Rajendar Deora, Meenu Mishra, and Alfredo G. Torres. 2008. "Polysaccharides Cellulose, Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine, and Colanic Acid Are Required for Optimal Binding of Escherichia Coli O157:H7 Strains to Alfalfa Sprouts and K-12 Strains to Plastic but Not for Binding to Epithelial Cells." *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2384–90.
- Mattsson et al. 2015. "Nano-Plastics in the Aquatic Environment." *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 17(10): 1712–21. <http://dx.doi.org/10.1039/C5EM00227C>.
- Mohan, Krishna. 2010. "Microbial Deterioration and Degradation of Polymeric Materials." *Journal of Biochemical Technology* 2(4): 210–15.
- Molin, Søren, and Tim Tolker-Nielsen. 2003. "Gene Transfer Occurs with Enhanced Efficiency in Biofilms and Induces Enhanced Stabilisation of the Biofilm Structure." *Current Opinion in Biotechnology*.
- Moore, Charles James. 2008. "Synthetic Polymers in the Marine Environment: A Rapidly Increasing, Long-Term Threat." *Environmental Research*.
- Müller, Rolf Joachim, Ilona Kleeberg, and Wolf Dieter Deckwer. 2001. "Biodegradation of Polyesters Containing Aromatic Constituents." *Journal of Biotechnology*.
- Nielsen, P, A Jahn, and R Palmgren. 1997. "Conceptual Model for Production and Composition of Exopolymers in Biofilms." *Water Science and Technology*.
- Particle, Nano, and Size Analyzer. "SALD-7500nano SALD-7500nano."
- Peacock, Andrew J. 2000. Handbook of Polyethylene: Structure, Properties and Applications *Handbook of Polyethylene: Structures, Properties and Applications*.
- PlasticsEurope. 2015. "Plastics - the Facts 2014/2015: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data." *PlasticsEurope*: 1–34. [http://issuu.com/plasticseuropeebook/docs/final\\_plastics\\_the\\_facts\\_2014\\_19122](http://issuu.com/plasticseuropeebook/docs/final_plastics_the_facts_2014_19122).
- Pompilio, Arianna et al. 2008. "Factors Associated with Adherence to and Biofilm Formation on Polystyrene by Stenotrophomonas Maltophilia: The Role of Cell Surface Hydrophobicity and Motility." *FEMS Microbiology Letters*.

- Rodney M. Donlan. 2009. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces." *Journal of Environmental Health* 8(9): 1–88.
- Romeo, Teresa et al. 2015. "First Evidence of Presence of Plastic Debris in Stomach of Large Pelagic Fish in the Mediterranean Sea." *Marine Pollution Bulletin*.
- Ryan, Peter G., Charles J. Moore, Jan A. Van Franeker, and Coleen L. Moloney. 2009. "Monitoring the Abundance of Plastic Debris in the Marine Environment." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Singh, Baljit, and Nisha Sharma. 2008. "Mechanistic Implications of Plastic Degradation." *Polymer Degradation and Stability*.
- Suaria, Giuseppe et al. 2016. "The Mediterranean Plastic Soup: Synthetic Polymers in Mediterranean Surface Waters." *Scientific Reports* 6(November). <http://dx.doi.org/10.1038/srep37551>.
- Sudhakar, M. et al. 2007. "Biofouling and Biodegradation of Polyolefins in Ocean Waters." *Polymer Degradation and Stability* 92(9): 1743–52.
- Sutherland, I. W. 2001. "Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework." *Microbiology* 147(1): 3–9.
- Sutherland, Ian W. 2001. "The Biofilm Matrix - An Immobilized but Dynamic Microbial Environment." *Trends in Microbiology*.
- Teuten, Emma L., Steven J. Rowland, Tamara S. Galloway, and Richard C. Thompson. 2007. "Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants." *Environmental Science and Technology*.
- Thompson, R.C., C.J. Moore, F.S. vom Saal, and S.H. Swan. 2009. "Plastics, the Environment and Human Health: Current Consensus and Future Trends." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*.
- Thompson, R C. et al. 2004. "Lost at Sea: Where Is All the Plastic?" *Science*.
- Tolinski, Michael. 2009. Additives for Polyolefins *Additives for Polyolefins : Getting the Most out of Polypropylene, Polyethylene and TPO*.
- Tourinho et al. 2010. "Is Marine Debris Ingestion Still a Problem for the Coastal Marine Biota of Southern Brazil?" *Marine Pollution Bulletin*.
- Unep. 2014. *Valuing Plastics: The Business Case for Measuring, Managing and Disclosing Plastic Use in the Consumer Goods Industry*. [www.unep.org/pdf/ValuingPlastic/](http://www.unep.org/pdf/ValuingPlastic/).
- UNEP. 2015. *Marine Litter Assessment in the Mediterranean*.
- Verran, J., and R. D. Boyd. 2001. "The Relationship between Substratum Surface Roughness and Microbiological and Organic Soiling: A Review." *Biofouling*.
- Wang, Jundong et al. 2016. "The Behaviors of Microplastics in the Marine Environment." *Marine Environmental Research*.
- Weber, Cornelius I. 1993. "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms." (August).
- Weinstein, John E, Brittany Crocker, and Austin Gray. 2016. "From Macroplastic to Microplastic: Degradation of High-Density Polyethylene, Polypropylene, and Polystyrene in a Salt Marsh Habitat." *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(7): 1632–40.

- Werner, Stefanie et al. 2016. JRC Technical Report *Harm Caused by Marine Litter - European Commission*. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/harm-caused-marine-litter>.
- Whitchurch, Cynthia B., Tim Tolker-Nielsen, Paula C. Ragas, and John S. Mattick. 2002. "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation." *Science*.
- Wright Stephanie L., Thompson Richard C., and Gallowaya Tamara S. 2013. "The Physical Impacts of Microplastics on Marine Organisms: A Review." *Environmental Pollution*.
- Z. MELABIANAKI, 1, 2 E. VELONAKIS, 2, and A.VATOPOULOS2. 2007. "Biofilms, Man, Environment." : 411–31.
- Zitko, V., and M. Hanlon. 1991. "Another Source of Pollution by Plastics: Skin Cleaners with Plastic Scrubbers." *Marine Pollution Bulletin*.

## ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ

[www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)

<http://www.grida.no/resources/6921>

<https://www.statista.com>

<https://www.iucn.org>

<https://www.flickr.com>

<http://www.tony-gutierrez.com>

<https://www.rspca.org.uk>

<https://www.nationalgeographic.com>

<https://www.catersnews.com>

<https://whalesandmarinefauna.wordpress.com>

<https://www.telegraph.co.uk>

<https://en.wikipedia.org>

<https://orbitbiotech.com>

[www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com)