



# Πολυτεχνείο Κρήτης

## Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

**ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΣΤΥΡΕΝΙΟΥ (PS) ΚΑΙ  
ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ (LDPE) ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΣΕ ΜΕΣΟΚΟΣΜΟΥΣ.**

Διπλωματική εργασία  
της  
Κατερίνας Σάββα



«Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσα εργασίας, εξ ολοκλήρου η τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή της προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης»



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΣΤΥΡΕΝΙΟΥ (PS) ΚΑΙ  
ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ (LDPE) ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΣΕ ΜΕΣΟΚΟΣΜΟΥΣ.**

Διπλωματική εργασία

της

Κατερίνας Σάββα

**Τριμελής Επιτροπή :**

Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δανάη Βενιέρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Δρ. Ευδοκία Συρανίδου

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αναμφίβολα πλεονεκτήματα των πλαστικών, που κυρίως οφείλονται στην ανθεκτικότητά τους, το χαμηλό κόστος και την αντοχή τους, σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος παραγωγής, συνετέλεσαν ώστε παγκοσμίως να αναπτυχθεί μια μεγάλη βιομηχανία παραγωγή τους. Επακόλουθο όμως ήταν και η αυξημένη παραγωγή πλαστικών αποβλήτων. Τα πλεονεκτήματά τους, αλλά και ο αργός ρυθμός αποσύνθεσής τους, συνετέλεσαν ώστε να αποτελέσουν ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα της σύγχρονης εποχής, που απαιτεί αυξημένες προσπάθειες αντιμετώπισής του. Η βιοαποδόμηση των πλαστικών από μικροοργανισμούς είναι ένας τομέας που τα τελευταία χρόνια είναι πολλά υποσχόμενος στο πρόβλημα της αντιμετώπισης των πλαστικών απορριμμάτων.

Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται αυτή η διπλωματική εργασία, της οποίας σκοπός είναι η παρατήρηση της δραστηριότητας μικροβιακών κοινοτήτων, που συλλέχθηκαν από την πελαγική ζώνη της Σούδας στα Χανιά, καθώς και η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας σε φιλμ πολυστυρενίου και χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Το πείραμα προσομοίωσε το θαλάσσιο περιβάλλον, χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά ενυδρεία, όπου το πλαστικό ήταν η μοναδική πηγή άνθρακα. Τα παρθένα πλαστικά και από τα δύο είδη που αναφέρθηκαν κόπηκαν σε κομμάτια διαστάσεων 2 cm x 2 cm, περάστηκαν σε σχοινάκια και με κατάλληλη ανοξείδωτη κατασκευή τοποθετήθηκαν στα ενυδρεία όπου παρέμειναν για τέσσερις μήνες. Σε δύο από τα τέσσερα ενυδρεία, εμβολιάστηκαν οι θαλάσσιες κοινότητες. Στην εκάστοτε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν εκτιμήσεις του βάρους, της μικροβιακής ανάπτυξης, των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών, της ταχύτητας καθίζησης, της κατανομής του μεγέθους των μικροπλαστικών και τέλος η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση των θαλάσσιων μικροοργανισμών και της ηλιακής ακτινοβολίας στην επιφάνεια των πλαστικών. Μετά τη διεκπεραίωση του πείραματος, διαπιστώθηκε ότι οι μικροοργανισμοί κατάφεραν να αναπτυχθούν επιτυχώς στο θαλάσσιο μεσόκοσμο. Τον 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> μήνα, τόσο οι υδαάνθρακες και οι πρωτεΐνες όσο και η μικροβιακή ανάπτυξη και στα τέσσερα ενυδρεία μειώθηκαν συγκριτικά με τον 1<sup>ο</sup> μήνα, παρόλα αυτά παρουσίασαν αύξηση εκ νέου τον 4<sup>ο</sup> μήνα της δειγματοληψίας. Για το πολυστυρένιο υπολογίστηκε ποσοστό μείωσης του βάρους 0,33% για το ενυδρείο Α, 3,02% για το ενυδρείο Β, 1,02% για το ενυδρείο C και τέλος 0,21 % για το ενυδρείο D. Ενώ αντίθετα, για το πολυαιθυλένιο η μείωση του βάρους για τον τέταρτο μήνα παρουσιάζει ποσοστά που εκτιμώνται ως 0,46% για το ενυδρείο Α, 2,85% για το ενυδρείο Β, 1,36% για το ενυδρείο C, ενώ τέλος για το ενυδρείο D 1,78%. Ακόμη παρατηρήθηκε, νανοπλαστικά σε κάποια από τα ενυδρεία που οφείλεται στον συνδυασμό της ακτινοβολίας του ήλιου και της δράσης των μικροοργανισμών. Τέλος το προφίλ της επιφάνειας των φιλμ σύμφωνα με τη φασματοσκοπία Fourier έδειξε ότι υπάρχει επίδραση της ακτινοβολίας τους πρώτους μήνες και τους επόμενους της ανάπτυξης του βιοφιλμ.

## ABSTRACT

The advantages of plastics, mainly due to their durability, low cost and resistance, coupled with low production costs, have contributed to the worldwide development of a large industry. As a result, an increased production of plastic waste has been noticed. Plastics' characteristics, as well as their resistance to degradation, have created one of the bigger ecological problems of modern era, which requires increased efforts in order to deal with it. Biodegradation of plastics has been offering realistic answers to the problem of dealing with plastic waste in the last few years.

The current thesis aims to monitor the activity of microbial communities collected from the Souda pelagic zone in Chania and the effect of solar radiation on polystyrene and low density polyethylene films. The experiment simulated the marine environment, using four different aquariums, where the plastic was the only source of carbon.

Virgin plastics of the two polymer types, were cut into square pieces (2 cm x 2 cm), were hanged on strings and were placed in the aquariums using appropriate stainless steel construction and remained there for four months. In two of the four aquariums, the maritime communities were inoculated.

Sampling occurred every month in order to estimate the weight reduction, microbial growth, extracellular polymeric substances, sinking velocity and microplastic size distribution. Finally, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to determine the effect of marine micro-organisms and solar radiation on the surface of the films. It was found that microorganisms managed to grow successfully in the marine mesocosm. During the second and third month both carbohydrates and proteins concentration, as well as microbial growth in all aquariums, decreased compared to the first month, but they again increased during the fourth month of sampling.

For polystyrene, a weight reduction of 0,33% for Aquarium A, 3,02% for Aquarium B, 1,02% for Aquarium C, and 0,21% for Aquarium D was calculated. For the polyethylene, the weight reduction during the fourth month estimated as 0,46% for the Aquarium A, 2,85% for the Aquarium B, 1,36% for the Aquarium C, and 1,78% for the Aquarium D.

In addition, nanoplastics were observed in some of the aquariums due to the combination of sunlight and of the microorganisms' action. Finally, the FTIR profiles of the LDPE films revealed the effect of UV radiation on the surface of the films in the first months and the microbial activity after biofilm development.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω ένα θερμό ευχαριστώ στον κ. Καλογεράκη, για την εμπιστοσύνη του, αναθέτοντας μου την παρούσα εργασία. Μέσα από όλο αυτό το ταξίδι, μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω, να ευαισθητοποιηθώ για ένα άκρως σημαντικό πρόβλημα της εποχής και ταυτόχρονα να αποκτήσω εφόδια καθοριστικά για το μέλλον.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Δανάη Βενιέρη για τη βοήθεια και την κατανόηση της καθώς και τη προσεκτική ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια, ένα ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω στην Dr. Ευδοκία Συρανίδου. Οι ιδέες της, η αμεσότητα της και η υπομονή της καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου ήταν καθοριστικοί παράγοντες ώστε να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα. Η συμβολή της, με βοήθησε να πειθαρχώ και να δουλεύω μεθοδικά για να καταφέρω τους στόχους μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την υποψήφια διδάκτωρ, και φύλακα άγγελο μου όπως την χαρακτηρίζα, Καρκανοραχάκη Αικατερίνη. Μου έμαθε, και προπάντων στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις δυσκολίες, ενθαρρύνοντας με εκεί που πίστευα ότι απέτυχα και στο τέλος δικαιονόταν. Χωρίς εκείνη, σήμερα δεν θα ήμουν το ίδιο.

Έπειτα, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας για όλες τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο μαζί. Την Γεωργία Χαραλάμπους, την Αργυρώ Λιακωτάκη, την Πετρούλα Σερίδου και την κ. Αριάδνη Παντίδου, κάθε μία ξεχωριστά με τις ιδιαίτερες προσωπικότητες τους και την όρεξη να με βοηθήσουν όποτε ήταν αναγκαίο, αποτέλεσαν ένα μεγάλο σχολείο για εμένα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, που κατέστησαν αυτό το ταξίδι μαγικό και ήταν εκεί σε κάθε χαρά και κάθε λύπη μου.

Το τελευταίο ευχαριστώ, είναι για τους γονείς μου. Η ηθική τους στήριξη, η αγάπη τους και η συμπαράστασή τους, με βοήθησαν να μάχομαι και να προσπαθώ για το καλύτερο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	i
ABSTRACT .....	ii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	iii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	iv
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Πλαστικό: Ευλογία ή μήπως Κατάρα;.....	1
1.1.1 Το πλαστικό.....	1
1.1.2 Η παγκόσμια παραγωγή πλαστικού.....	2
1.2 Πλαστικά απορρίμματα στο θαλάσσιο περιβάλλον .....	5
1.3 Κατηγοριοποίηση πλαστικών ρύπων .....	8
1.4 Πηγές ρύπανσης πλαστικών απορριμμάτων .....	11
1.5 Πολυστυρένιο (PS).....	12
1.5.1 Δομή .....	13
1.5.2 Πολυμερισμός .....	14
1.5.3 Βιοαποδόμηση.....	14
1.5.4 Παράκτια μικροπλαστικά απορρίμματα πολυστυρενίου.....	15
1.5.5 Ανακύκλωση.....	15
1.6 Πολυαιθυλένιο (PE) .....	15
1.6.1 Φυσικές ιδιότητες.....	16
1.6.2 Χημικές ιδιότητες .....	16
1.6.3 Ταξινόμηση.....	16
1.6.4 Συμπεριφορά στο περιβάλλον.....	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Υλικά.....	19
2.2 Μέθοδοι .....	19
2.3 Ανάπτυξη μικροοργανισμών .....	22
2.4 Δειγματοληψία.....	24

2.4.1 Μικροβιακός πληθυσμός.....	26
2.4.2 Μέτρηση βάρους.....	27
2.4.3 Πρωτεΐνες.....	27
2.4.4 Υδατάνθρακες.....	29
2.4.5 Ταχύτητα καθίζησης.....	31
2.4.6 Μέγεθος μικροπλαστικών.....	32
2.4.7 Προσδιορισμός θρεπτικών.....	34
2.4.8 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
3.1 ΒΑΡΟΣ.....	39
3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ.....	42
3.2.1 Ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού σε φιλμ LDPE.....	45
3.3. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	46
3.4. ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	47
3.5 ΟΛΙΚΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ.....	50
3.6. ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ.....	54
3.7. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ.....	57
3.8. ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER (FTIR) .....	71
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	77
5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	78
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79



## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

ΕΙΚΟΝΑ 1 : Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών περιόδου 1960-2015

ΕΙΚΟΝΑ 2 : Παγκόσμια αύξηση παραγωγής πλαστικών περιόδου 1950-2014

ΕΙΚΟΝΑ 3 : Εκτιμώμενη ετήσια αύξηση πλαστικών στους ωκεανούς

ΕΙΚΟΝΑ 4 : Χώρες προέλευσης πλαστικών αποβλήτων που κατέληξαν στη θάλασσα το 2010, σε μετρικούς τόνους

ΕΙΚΟΝΑ 5 : Θαλάσσια ρεύματα και συγκεντρώσεις πλαστικών στο Βόρειο ειρηνικό Ωκεανό

ΕΙΚΟΝΑ 6 : Συγκεντρώσεις πλαστικών στους ωκεανούς

ΕΙΚΟΝΑ 7 : Τύποι συνηθισμένων πλαστικών απορριμμάτων στο θαλάσσιο περιβάλλον

ΕΙΚΟΝΑ 8 : Πηγές πλαστικών απορριμμάτων και τρόποι μεταφοράς τους στο υδάτινο περιβάλλον.

ΕΙΚΟΝΑ 9 : Σκληρυμένο αφρώδες πολυστυρένιο

ΕΙΚΟΝΑ 10 : Πολυμερισμός στυρενίου σε πολυστυρένιο

ΕΙΚΟΝΑ 11 : Ζύγιση των πλαστικών PS και LDPE

ΕΙΚΟΝΑ 12 : Ζυγισμένα και αριθμημένα πλαστικά

ΕΙΚΟΝΑ 13 : Σχοινάκια αποτελούμενα από τα οκτώ κομμάτια πλαστικού

ΕΙΚΟΝΑ 14 : Γυάλινα δοχεία για την εκπόνηση του πειράματος

ΕΙΚΟΝΑ 15 : Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών

ΕΙΚΟΝΑ 16 : Πειραματική διάταξη σε πλήρη ανάπτυξη

ΕΙΚΟΝΑ 17 : Απομάκρυνση βιοφίλμ από την επιφάνεια των πλαστικών με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας

ΕΙΚΟΝΑ 18 : Κάτοψη της πειραματικής διάταξης

ΕΙΚΟΝΑ 19 .Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

ΕΙΚΟΝΑ 20 : Πρότυπα διαλύματα με σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης του ορού αλβουμίνης βοδιού (BSA)

ΕΙΚΟΝΑ 21 : Πρότυπα διαλύματα με σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης

ΕΙΚΟΝΑ 22 : Ογκομετρικός κύλινδρος μέτρησης της ταχύτητας καθίζησης

ΕΙΚΟΝΑ 23 : Όργανο μέτρησης διασποράς μεγέθους πλαστικών

ΕΙΚΟΝΑ 24 : Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας του οργάνου.

- ΕΙΚΟΝΑ 25 : Φασματοφωτόμετρο LATON (LCK238)
- ΕΙΚΟΝΑ 26 : Φασματοφωτόμετρο HACH DR/2010
- ΕΙΚΟΝΑ 27 : Σχηματική απεικόνιση του συμβολομέτρου
- ΕΙΚΟΝΑ 28 : Αντλιοπρεσα κατασκευής δισκίου KBr
- ΕΙΚΟΝΑ 29 : Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραίωση  $10^{-1}$
- ΕΙΚΟΝΑ 30 : Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραίωση  $10^{-2}$
- ΕΙΚΟΝΑ 31 : Πέντε στάδια ανάπτυξης βιοφίλμ
- ΕΙΚΟΝΑ 32 : Αναπαράσταση πεπτιδικού δεσμού
- ΕΙΚΟΝΑ 33 : Διάγραμμα διάκρισης υδρογονανθράκων
- ΕΙΚΟΝΑ 34 : Βιοφίλμ στην επιφάνεια του LDPE τον 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο A.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο A.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 30 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 31 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 32 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 33 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 34 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 35 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου A

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 36: Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 37 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου B

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 38 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 39 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου C

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 40 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου D

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 41: Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου D



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Πλαστικό: Ευλογία ή μήπως Κατάρα;

Ο ΟΗΕ γιορτάζει συγκεκριμένες Ημέρες, Εβδομάδες, Έτη και Δεκαετίες ως αφορμές για την επισήμανση συγκεκριμένων γεγονότων ή θεμάτων, ώστε να προωθηθούν, μέσω της ευαισθητοποίησης και της συντονισμένης δράσης, οι στόχοι του Οργανισμού. Μια από αυτές τις ημέρες είναι και η 3η Ιουλίου που έχει οριστεί ως «παγκόσμια ημέρα κατά της πλαστικής σακούλας». Το γεγονός αυτό από μόνο του αποδεικνύει πως το ζήτημα της ρύπανσης από τα πλαστικά έχει λάβει πλέον διαστάσεις και αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα θα διαταράξει αρνητικά την εύθραυστη ισορροπία του πλανήτη μας. Ήδη από την 1η Ιανουαρίου 2018 εφαρμόζονται στη χώρα μας οι νέοι κανόνες σχετικά με τη διάθεση πλαστικών σακούλων από τα καταστήματα λιανικής, αφού η ελληνική νομοθεσία εναρμονίζεται πλέον με την Οδηγία 2015/720 της Ε.Ε., η οποία εκδόθηκε προκειμένου να προληφθούν ή να μειωθούν οι επιπτώσεις των συσκευασιών και των απορριμμάτων συσκευασίας στο περιβάλλον και ιδιαίτερα στα υδάτινα οικοσυστήματα.

Τα πλαστικά κατέχουν πλέον κυρίαρχο ρόλο, αφού έχουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς της καθημερινότητάς μας και έχουν μεταβάλλει σημαντικά την ποιότητα της ζωής μας. Ο λόγος της ευρείας χρήσης τους οφείλεται κυρίως στην ανθεκτικότητά τους, το χαμηλό κόστος και την αντοχή τους. Έχουν χαμηλό κόστος παραγωγής, αφού κατασκευάζονται από φτηνές πρώτες ύλες και με μικρές ενεργειακές απαιτήσεις. Οι παράγοντες αυτοί, καθώς και η μεγάλη ποικιλία και πολυμορφία των πλαστικών συνετέλεσαν ώστε να αναπτυχθεί μια μεγάλη βιομηχανία παραγωγή τους (PlasticsEurope 2015). Επακόλουθο όμως της μεγάλης παραγωγής πλαστικών προϊόντων ήταν και αυξημένη παραγωγή πλαστικών αποβλήτων. Τα αναμφίβολα πλεονεκτήματά τους αλλά και ο αργός ρυθμός αποσύνθεσής τους συνετέλεσαν ώστε να αποτελέσουν ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα της σύγχρονης εποχής.

#### 1.1.1 Το πλαστικό

Η λέξη "πλαστικό" πλαστικό ξεκίνησε να χρησιμοποιείται το 1925. Συνήθως με τον όρο "πλαστικό" περιγράφεται μια μεγάλη ποικιλία συνθετικών ή ημισυνθετικών οργανικών στερεών υλικών (Leszek et al 2003). Τα πλαστικά είναι πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους, γι' αυτό και η ονομασία πολλών από αυτά φέρει το πρόθεμα «πολύ-». Κύριο συστατικό παρασκευής τους είναι οι συνθετικές ρητίνες που διακρίνονται σε "εποξειδικές" και "ακρυλικές".(Βικιπαίδεια)

Αν και υπάρχει ένα μεγάλο πλήθος διαφορετικών μεταξύ τους πλαστικών, μπορούμε ωστόσο να τα κατατάξουμε σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Τα θερμοπλαστικά, που είναι πολυμερή με μεγαλύτερη πλαστικότητα, δηλαδή ευκολία στο να παραμορφωθούν και να αποκτήσουν το σχήμα που επιθυμούμε, κάθε φορά που θερμαίνονται.
- Τα θερμοσκληρυνόμενα που κατά την πρώτη θέρμανση και ανάμιξη των συστατικών τους προκαλείται πολυμερισμός και σκλήρυνση κατά τρόπο μη αντιστρεπτό. Δηλαδή τα θερμοσκληρυνόμενα μετά την πήξη τους δεν είναι δυνατό να μορφοποιηθούν άλλο

Θερμοπλαστικά		Θερμοσκληρυνόμενα	
Είδη	Χρήσεις	Είδη	Χρήσεις
Πολυπροπυλένιο - PP	Συσκευασία τροφίμων, οικιακές συσκευές	Βακελίτης	Καλές μηχανικές ιδιότητες, προφυλακτήρες αυτοκινήτων, δάπεδα
Πολυαιθυλένιο - PE	Πλαστικές σακούλες, πλαστικές φιάλες, σωλήνες	Εποξειδική ρητίνη	Ακριβό υλικό, κόλλες, ανθρακονήματα σκάφη θαλάσσης
Χλωριούχο πολυβινύλιο ή πολυβινυλοχλωρίδιο - PVC	Μόνωση ηλεκτρικών καλωδίων, δίσκοι γραμμοφώνων κουφώματα	Πολυεστερι-κές ρητίνες	Παρόμοιες εφαρμογές με εποξειδική ρητίνη, φτηνότερο υλικό
Νάιλον ή πολυαμίδες	Διακόπτες, πρίζες, τάπητες, μελανοταινίες, συνθετικά υφάσματα, πετονιά	τα πολυεστερικά πλαστικά μπορεί να είναι θερμοπλαστικά ή θερμοσκληρυνόμενα, ανάλογα με τη χημική σύσταση, ενώ οι ακόρεστοι πολυεστέρες ή αλλιώς πολυεστερικές ρητίνες είναι θερμοσκληρυνόμενα	

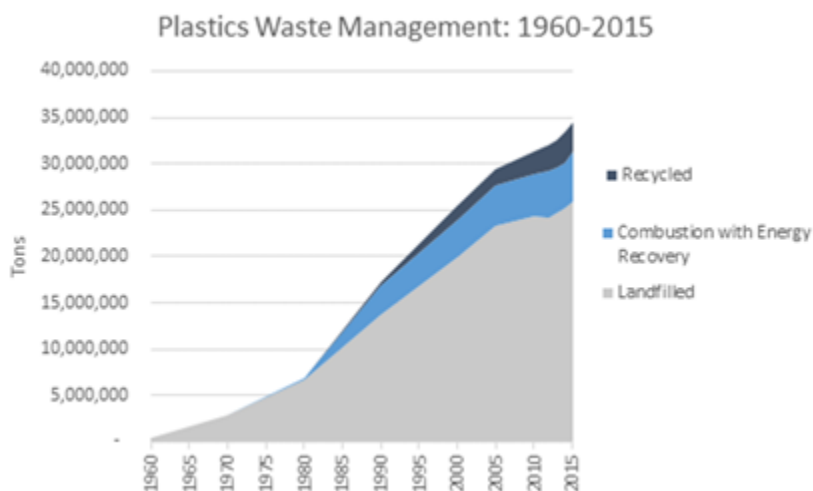
### 1.1.2 Η παγκόσμια παραγωγή πλαστικού

Ήταν ο Άγγλος Alexander Parkes (1813 - 1890) που ανακάλυψε το πρώτο συνθετικό πλαστικό και το εισήγαγε στον κόσμο ως ένα από τα σημαντικότερα υλικά που δημιουργήθηκαν από τον άνθρωπο. Παρόλο που ποτέ δεν κατάφερε να γίνει πλούσιος με τις εφευρέσεις του, η δημιουργία του συνθετικού πλαστικού που την ονόμασε Parkesine πυροδότησε την προσπάθεια αμέτρητων ερευνητών, οι οποίοι εργάστηκαν για να τελειοποιήσουν καινούργιους τύπους και να επιτρέψουν στο πλαστικό να γίνει ένα από τα πλέον διαδεδομένα υλικά στον κόσμο.

Το 1885 ο Parkes δημιούργησε το πρώτο πλαστικό διαλύοντας νιτρική κυτταρίνη σε αλκοόλη και καμφορά που περιέχει αιθέρα. Η προκύπτουσα ουσία ήταν διαφανής και χυτεύτηκε εύκολα όταν ήταν ζεστή, αλλά διατηρούσε σκληρότητα ενώ ήταν κρύα. Παρουσίασε την πλαστική σύνθεσή του με το όνομα Parkesine στο κοινό με μεγάλη επιτυχία στη Διεθνή Έκθεση του 1862 στο Λονδίνο (κεντρικά κομμάτια της παρουσιάσής του ήταν αντικείμενα κουζίνας από πλαστικό). Βλέποντας το ενδιαφέρον του κόσμου για αυτό το νέο προϊόν, συγκέντρωσε κεφάλαια και ίδρυσε το 1866 την Parkesine Company με στόχο την παραγωγή πλαστικών αντικειμένων σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα. Δυστυχώς, αυτό το όνειρο τελείωσε μετά από δύο μόνο χρόνια. Η κύρια αιτία ήταν η αδυναμία του Alexander Parkes να αλλάξει την πλαστική συνταγή ώστε να είναι φθηνότερη και ευκολότερη (Leszek et al 2003).

Η έκρηξη όμως στην παραγωγή του πλαστικού έγινε το 1935 όταν ο Ουάλλας Κάροδερς (Wallace Carothers) παρασκεύασε το συνθετικό πλαστικό "Νάιλον" (Nylon) στα εργαστήρια της εταιρίας DuPont.

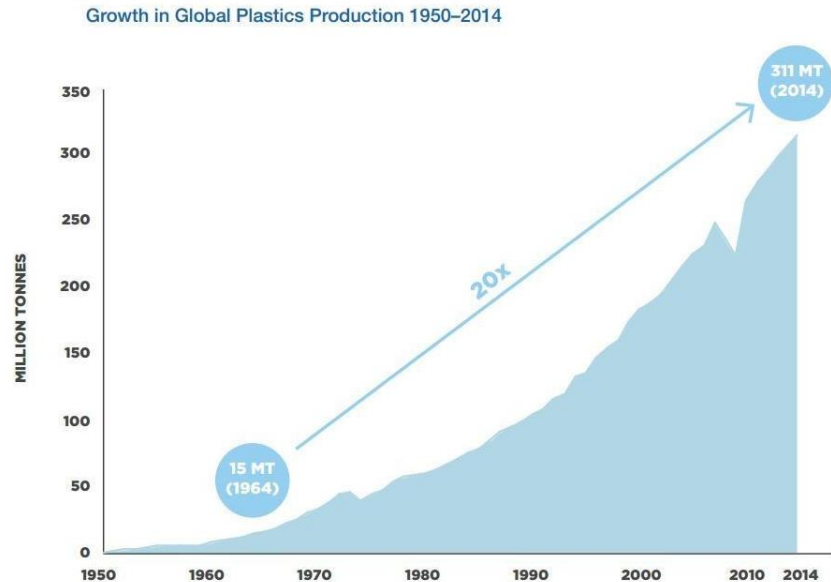
Σύμφωνα με έκθεση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής προς το Ευρωκοινοβούλιο, τις τελευταίες δεκαετίες έχει εκτοξευτεί η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών. Από το 1960 η παραγωγή έχει εικοσαπλασιαστεί (322 εκατομμύρια τόνους το 2015) και αναμένεται να διπλασιαστεί ξανά την επόμενη 20ετία. Ιδίως στην Ασία, η κατά κεφαλήν κατανάλωση πλαστικών αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Η μεγαλύτερη παραγωγή πλαστικού παγκοσμίως γίνεται στην Ασία αφού η οικονομία των χωρών βασίζεται κυρίως στη παραγωγή πλαστικού. Αξιοσημείωτο είναι ότι η Κίνα παρασκευάζει το ¼ του πλαστικού παγκοσμίως.



Εικόνα 1 : Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών περιόδου 1960-2015. (πηγή: [www.phys.org](http://www.phys.org))

Αλλά και η Ευρώπη έρχεται δεύτερη σε κατάταξη παγκοσμίως με ποσοστό 19 %, με τη Γερμανία να κατέχει τη πρώτη θέση στην παραγωγή πλαστικού αφού διαθέτει τεράστια βιομηχανία στον κλάδο αυτό (Plastics Europe 2015).





Εικόνα 2 : Παγκόσμια αύξηση παραγωγής πλαστικών περιόδου 1950-2014.

(πηγή: *Plastics Europe* 2015)

Επακόλουθο όμως της μεγάλης παραγωγής πλαστικών προϊόντων ήταν και αυξημένη παραγωγή πλαστικών αποβλήτων. Τα πλεονεκτήματά τους και ο αργός ρυθμός αποσύνθεσης συνετέλεσαν ώστε να αποτελούν σήμερα ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα της σύγχρονης εποχής. Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των διαφόρων θαλάσσιων σκουπιδιών κατέχει το πλαστικό και λόγω της ευκολίας με το οποίο μπορεί να μεταφερθεί, μπορεί να βρεθεί ανάμεσα στα απορρίμματα που συλλέγονται ακόμη και από τις πιο απομακρυσμένες τοποθεσίες (Ryan et al., 2009 )

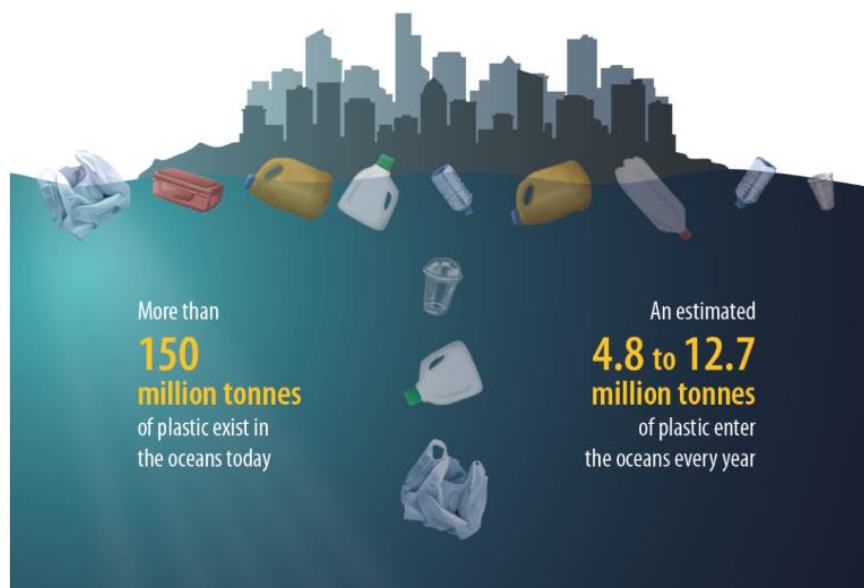
Έτσι σήμερα αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα η ρύπανση των θαλασσών από πλαστικό και ολόένα αυξανόμενο κίνδυνο για τη βιοποικιλότητα, το οικοσύστημα, την υγεία των ανθρώπων, την οικονομία και την κοινωνία γενικότερα. Τα πλαστικά απορρίμματα αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες πηγές θαλάσσιας ρύπανσης παγκοσμίως, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των απορριμμάτων που καταλήγουν στη θάλασσα αποτελείται από πλαστικό. Σε σχετική έρευνα υπολογίστηκε ότι για το 2008 πάνω από 150 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών αποτέθηκαν στους ωκεανούς (Thompson et al. 2009).

Ένα μεγάλο ποσοστό πλαστικών αποβλήτων που κυμαίνεται στο 27,3 %, παρά τη σημαντική εξέλιξη των τεχνικών ανακύκλωσης, εναποτίθεται στους χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ), όπου μπορεί να χρειαστεί μέχρι και αιώνες για να αποσυντεθεί, καθιστώντας έτσι το πλαστικό ένα από τους σημαντικότερους ρυπαντές (Barnes et al. 2009). Αυτό συμβαίνει διότι το πλαστικό κατασκευάζεται με γνώμονα την χρήση του, όχι με τη δυνατότητα του να ανακυκλωθεί ή να αξιοποιηθεί. Το μεγαλύτερο μάλιστα ποσοστό (39,9%) των αποβλήτων κατέχουν οι πλαστικές συσκευασίες (PlasticsEurope, 2017). Εάν συνεχιστεί η σημερινή τάση, όπου η παραγωγή αυξάνεται κατά περίπου 5% ετησίως, θα έχουν συσσωρευτεί επιπλέον 33 δισεκατομμύρια τόνοι πλαστικού στον πλανήτη έως το 2050.

Είναι γεγονός πως τα πλαστικά είναι συνδεδεμένα πλέον με την ζωή μας λόγω των διευκολύνσεων που προσφέρουν σε κάθε πτυχή της καθημερινότητάς μας και του χαμηλού κόστους παραγωγής, γεγονός που τα καθιστά αναντικατάστατα (Anthony L. et al. 2009). Το φθινό όμως κόστος παραγωγής των πλαστικών προϊόντων δεν αντικατοπτρίζει το πραγματικό κόστος το οποίο δεν επιβαρύνει τον παραγωγό, αλλά την κοινωνία στο σύνολό της (Newman et al. 2015). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην παραγωγή και κατανάλωση ολοένα και μεγαλύτερων ποσοτήτων πλαστικού με πολύ χαμηλό κόστος με αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση των πλαστικών απορριμμάτων.

## 1.2 Πλαστικά απορρίμματα στο θαλάσσιο περιβάλλον

Ιδιαίτερα η ρύπανση της θάλασσας από τα πλαστικά βρίσκεται στην κορυφή των ζητημάτων που χρειάζονται άμεση αντιμετώπιση. 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.

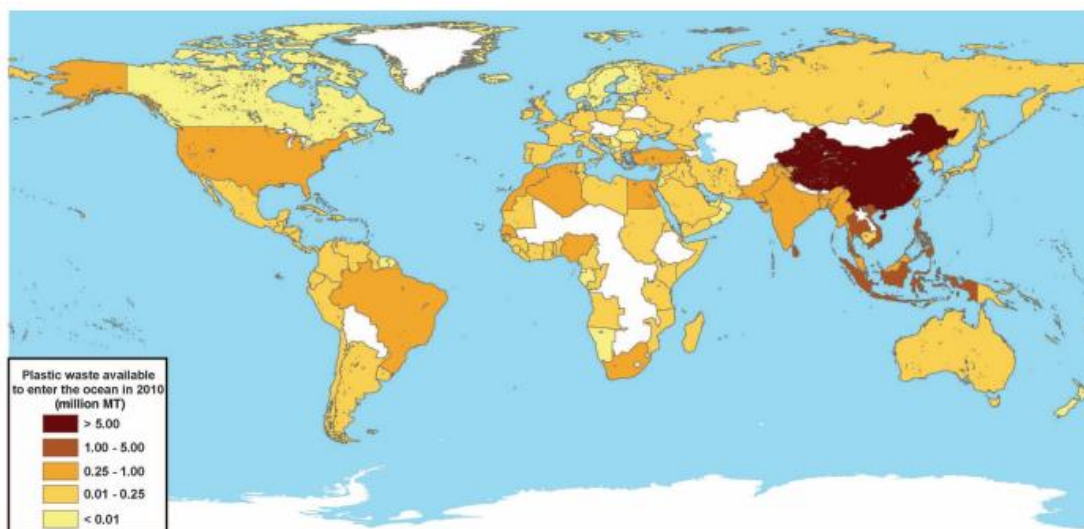


Εικόνα 3: Εκτιμώμενη ετήσια αύξηση πλαστικών στους ωκεανούς. (πηγή: European Parliament Research Service)

Τα πιο συνηθισμένα πλαστικά απορρίμματα στις θάλασσες και τις ακτές είναι πλαστικά μικροσφαιρίδια (pellets). Ο τρόπος μεταφοράς τους και η συμπεριφορά τους στη θάλασσα απασχολεί έντονα πλέον την επιστημονική κοινότητα. Η ηλιακή ακτινοβολία και η γήρανση

συντελούν στον θρυματισμό των μικροσφαιριδίων, γεγονός που βοηθάει στη διαδικασία της βιοαποδόμησής τους από μικροοργανισμούς (PlasticsEurope 2015).

Αναφέρεται χαρακτηριστικά πως «μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες, πρόσφατες και μεγάλης διάρκειας αλλαγές στην επιφάνεια του πλανήτη μας είναι η συσσώρευση και ο κατακερματισμός των πλαστικών» (Barnes et al. 2009). Εκτιμάται πως το 60-80% των απορριμμάτων στις θάλασσες αποτελείται από πλαστικά υλικά και άρα η παρουσία τους στο περιβάλλον δεν μπορεί πλέον να αμφισβητηθεί (Derraik 2002). Η όσο το δυνατόν ακριβής εκτίμηση της ποσότητας των πλαστικών απορριμμάτων είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία. Το σίγουρο όμως είναι πως εκατομμύρια τόνοι από αυτά θα καταλήξουν στον υδάτινο περιβάλλον.



Εικόνα 4 : Χώρες προέλευσης πλαστικών αποβλήτων που κατέληξαν στη θάλασσα το 2010, σε μετρικούς τόνους. (πηγή: Jambeck et al. 2015)

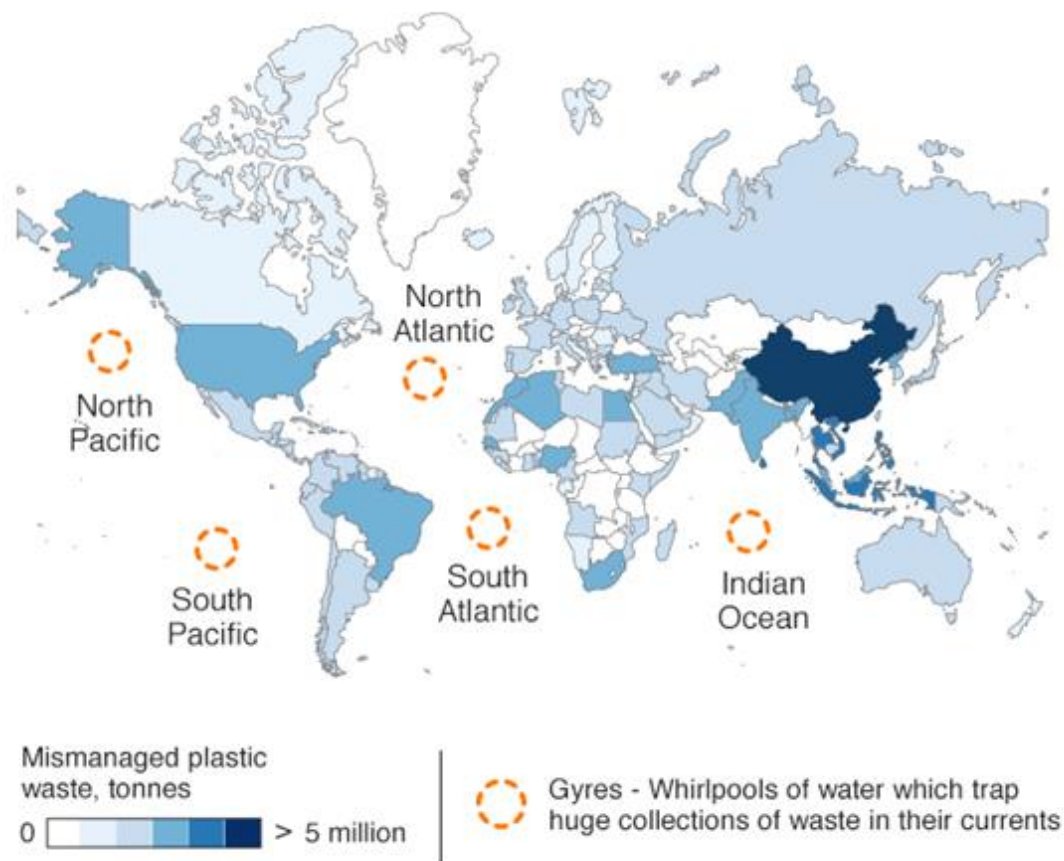
Τα επιπλέοντα πλαστικά απορρίμματα εξαπλώνονται πλέον σε όλα τα μήκai καιμ τα πλάτη των ωκεανών. Η συγκέντρωσή τους παρουσιάζει ποικίλει από περιοχή σε περιοχή γιατί επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες όπως ο άνεμος, τα θαλάσσια ρεύματα, αλλά και η ανθρώπινη δραστηριότητα (Barnes et al. 2009).



*Εικόνα 5 : Θαλάσσια ρεύματα και συγκεντρώσεις πλαστικών στο Βόρειο ειρηνικό Ωκεανό.  
(πηγή: US NOAA 2014)*

Η δυναμική της ωκεάνιας κυκλοφορίας μεγάλης κλίμακας δρα σαν μεταφορέας πλαστικών απορριμμάτων και βοηθά στη συγκέντρωσή τους σε τεράστιες περιοχές (US NOAA 2014).

## Ocean plastic



Εικόνα 6 : Συγκεντρώσεις πλαστικών στους ωκεανούς. (πηγή: Jambeck et al, περιοδικό Science 2015)

Αξίζει να σημειωθεί πως λόγω της συγκέντρωσης βακτηρίων, αλγών και συσσωρευμένων ιζημάτων, τα πλαστικά απορρίμματα κυρίως μικρού μεγέθους βυθίζονται και ταξιδεύουν μέχρι τον πυθμένα της θάλασσας (Barnes et al. 2009).

### 1.3 Κατηγοριοποίηση πλαστικών ρύπων

Στη βιβλιογραφία, εμφανίζονται διαφορετικές κατηγοριοποιήσεις των τμημάτων πλαστικών με βάση το μέγεθος. Άλλοι ερευνητές θεωρούν σαν μικροπλαστικά τα τμήματα μεγέθους έως 1mm, ενώ άλλοι αυτά με μέγεθος έως 5mm.

Σαν μικροπλαστικά ορίζονται: «τα αόρατα με το γυμνό μάτι τμήματα πλαστικού με διαστάσεις μικρότερες των 5mm, τα οποία συλλέγονται με τη χρήση κοσκίνων και φίλτρων και είτε

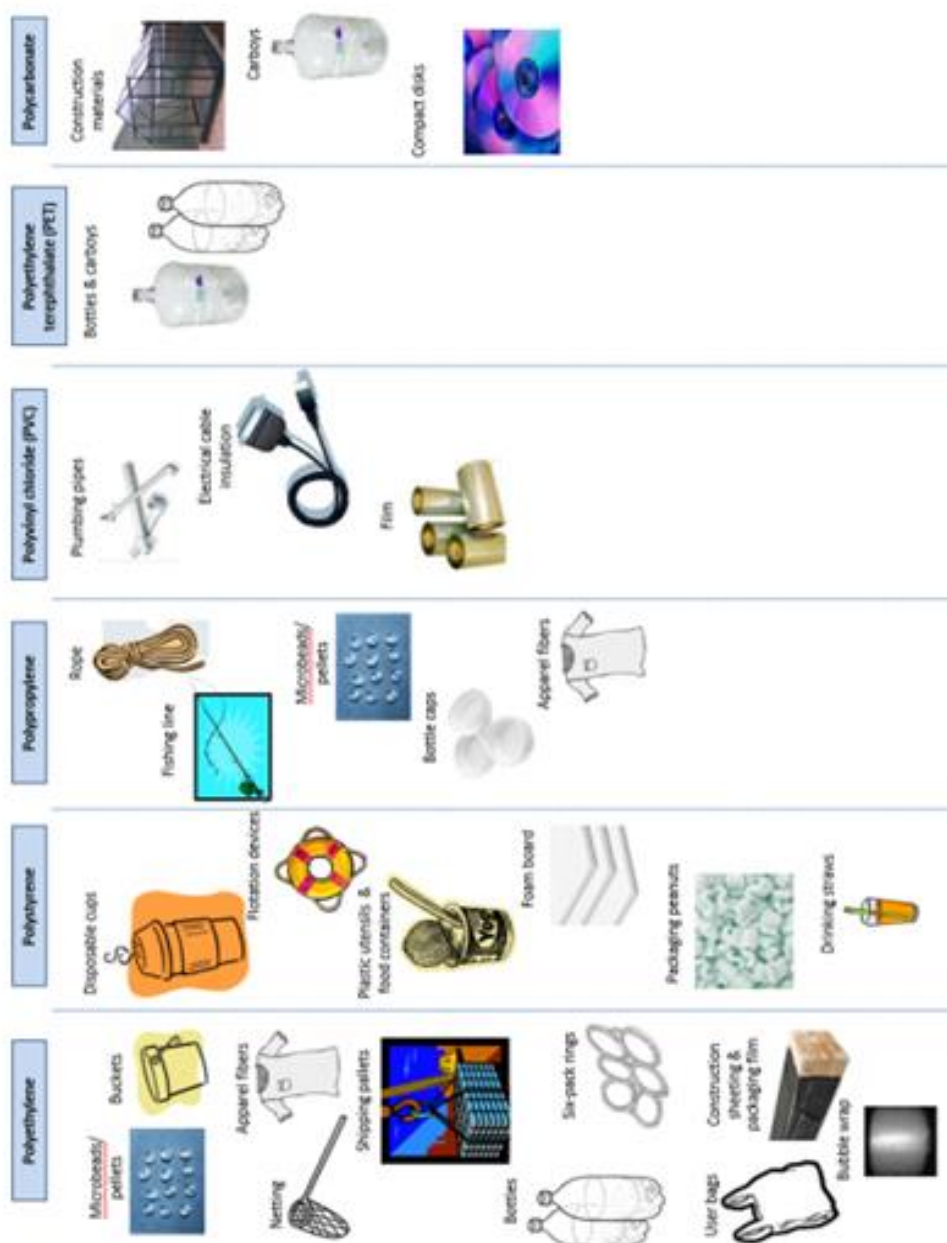
εισάγονται αυτούσια στα οικοσυστήματα μέσω της μεταφοράς από ρεύματα, είτε είναι προϊόντα της κατάτμησης μεγαλύτερων τμημάτων πλαστικών (δευτερογενή πλαστικά)» (Arthur et al, 2009).

Η κατάτμηση των πλαστικών έρχεται σαν αποτέλεσμα της γήρανσής τους, και της επακόλουθης διάσπασής των πολυμερικών αλυσίδων, υπό την επίδραση του νερού, του ηλιακού φωτός, αλλά και των μικροοργανισμών. Η γήρανση έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μικρο-ρωγμών στην επιφάνεια των πλαστικών, που στη συνέχεια επεκτείνονται και οδηγούν στον τεμαχισμό τους.

Τα πλαστικά απορρίμματα στο θαλάσσιο και παράκτιο περιβάλλον κατηγοριοποιούνται σε σχέση με το μέγεθός τους σε 5 κατηγορίες:

Τύπος απορριμμάτων	Διαστάσεις	Περιγραφή
Μεγαπλαστικά	> 1m	Ογκώδη απορρίμματα όπως πλαστικές καρέκλες, κουβάδες, παραθεριστικός εξοπλισμός, σπασμένες πλαστικές επιφάνειες κ.α.
Μακροπλαστικά	2,5cm έως 100cm	Δίχτυα, εργαλεία αλιείας, προϊόντα συσκευασίας, πλαστικά μπουκάλια και σακούλες, θραύσματα μεγαπλαστικών
Μεσοπλαστικά	0,1cm έως 2,5cm	1. Πρωτογενή: πλαστικά σφαιρίδια (pellets) και υμένια (film) 2. Δευτερογενή: προκύπτουν από τον κατακερματισμό και την γήρανση πλαστικών μεγαλύτερου μεγέθους
Μικροπλαστικά	1μm έως 0,1cm	1. Πρωτογενή: πλαστικά σφαιρίδια και υμένια 2. Δευτερογενή: προκύπτουν από τον κατακερματισμό και την γήρανση μεσοπλαστικών
Νανοπλαστικά	< 1μm	Ανιχνεύονται μόνο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και συλλέγονται με την βοήθεια νανόφιλτρων

(GESAMP, 2015)



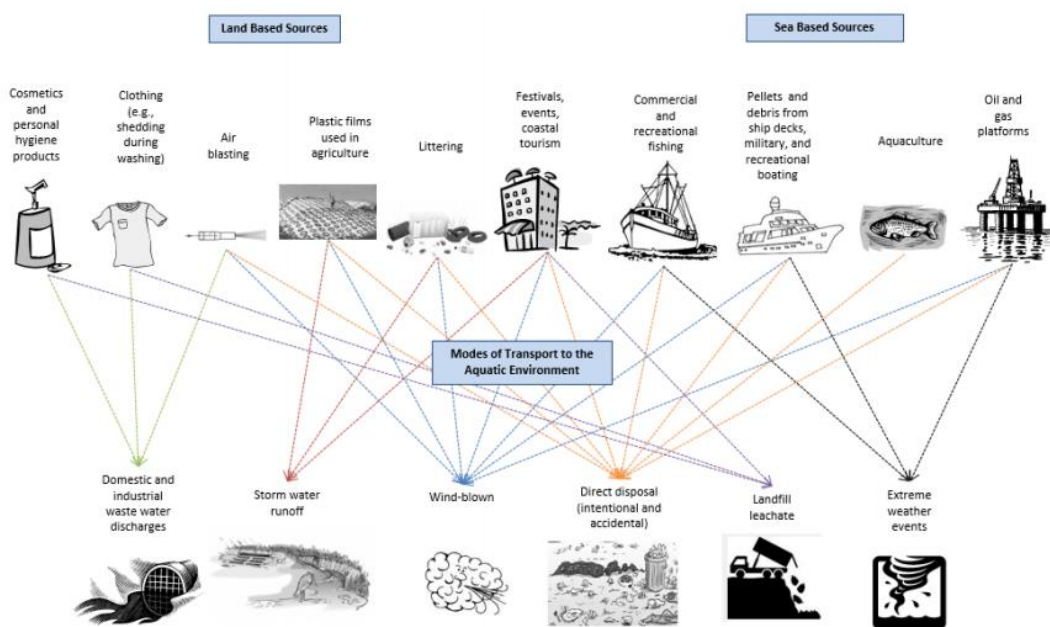
Εικόνα 7 : Τύποι συνηθισμένων πλαστικών απορριμμάτων στο θαλάσσιο περιβάλλον (Andrady, A.L. 2011)



Σε σχετικές έρευνες έχει βρεθεί πως η ποσότητα των μικροπλαστικών σε σύγκριση με τα μακροπλαστικά στο θαλάσσιο περιβάλλον αυξάνεται. Μάλιστα η πλειοψηφία πλαστικών κομματιών (90%) που βρίσκονται στους ωκεανούς είναι μικρότερη από 5 mm σε διάμετρο (Rochman et al., 2014).

#### 1.4 Πηγές ρύπανσης πλαστικών απορριμμάτων

Οι πηγές ρύπανσης πλαστικών προϊόντων χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, τις χερσαίες και τις θαλάσσιες. Εκτιμάται πως το 80% των πλαστικών απορριμμάτων προέρχεται από τις χερσαίες πηγές, κυρίως του βορείου ημισφαιρίου (Li et al 2016).



Εικόνα 8 : Πηγές πλαστικών απορριμμάτων και τρόποι μεταφοράς τους στο υδάτινο περιβάλλον. (Πηγή: Lambert, et. al. 2014)



<b>Χερσαίες πηγές</b>	<b>Περιγραφή</b>
Ακτές και παραθεριστικός τουρισμός	Συσκευασίες, πλαστικά δοχεία, παραθεριστικός εξοπλισμός
Εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και εκβολές ποταμίων	Είδη προσωπικής φροντίδας, μικροπλαστικά, ναυοπλαστικά, πλαστικά που απορρίφθηκαν κατευθείαν στα ποτάμια
Χώροι υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ), εγκαταστάσεις επεξεργασίας στερεών αποβλήτων και βιομηχανίες παραγωγής πλαστικού	Ισχυροί άνεμοι και βροχοπτώσεις μεταφέρουν κυρίως δευτερογενή μικροπλαστικά και ναυοπλαστικά
Κατασκευαστικός τομέας	Υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την κατασκευή κτιρίων και οδοστρωμάτων λόγω έκθεσής τους στην ηλιακή ακτινοβολία και γήρανσης
<b>Θαλάσσιες πηγές</b>	<b>Περιγραφή</b>
Αλιευτικές δραστηριότητες	Δίχτυα κυρίως, πετονιές από νάilon, πλαστικά εξαρτήματα
Ναυσιπλοΐα	προϊόντα συσκευασίας, καθαρές ρητίνες, υμένια πολυμερών, πλαστικά που προέρχονται από ατυχήματα

Η παρούσα εργασία αφορά την διαδικασία αποδόμησης δύο σημαντικών πλαστικών απορριμμάτων, του πολυστυρενίου (PS) και του πολυαιθυλενίου (PE). Για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς τους στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι αναγκαίο να εξετασθούν οι ιδιότητές τους που οφείλονται στον τρόπο παρασκευής.

## 1.5 Πολυστυρένιο (PS)

Το πολυστυρένιο (PS) είναι ένα συνθετικό πολυμερές αρωματικού υδρογονάνθρακα κατασκευασμένο από το μονομερές στυρένιο. Το πολυστυρένιο μπορεί να είναι στερεό ή αφρώδες. Το πολυστυρένιο γενικής χρήσης είναι σκληρό και μάλλον εύθραυστο (Scheirs 2003). Είναι ένα από τα πλέον διαδεδομένα πλαστικά, καθώς η κλίμακα της παραγωγής του είναι αρκετά εκατομμύρια τόνοι ετησίως (Maul et al 2007). Το πολυστυρένιο αργεί να βιοαποδομηθεί. Συσσωρεύεται ως μορφή σκουπιδιών στο υπαίθριο περιβάλλον, ιδιαίτερα κατά μήκος των ακτών και των πλωτών οδών, ιδίως υπό μορφή αφρού (Kwon et al 2014).

Η Διογκωμένη πολυστερίνη (EPS – Expanded polystyrene), γνωστή στην Ελλάδα και σαν φελιζόλ, είναι ένα ελαφρύ, θερμομονωτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται στην οικοδομή

και σε άλλες εφαρμογές. Παράγεται από κόκκους πολυστυρένιου, οι οποίοι είναι θερμοπλαστικοί.



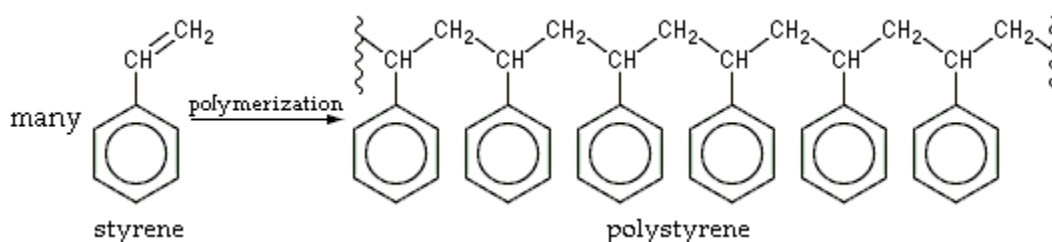
Εικόνα 9 : Σκληρυμένο αφρώδες πολυστυρένιο. (πηγή: <https://el.decorexpro.com>)

### 1.5.1 Δομή

Το πολυστυρένιο είναι υδρογονάνθρακας μακράς αλυσίδας όπου εναλλασσόμενα κέντρα άνθρακα συνδέονται με φαινυλομάδες (παράγωγο βενζολίου). Ο χημικός τύπος του πολυστυρενίου είναι  $(C_8H_8)_n$ . Οι ιδιότητες του υλικού καθορίζονται από τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ πολυμερών αλυσίδων. Δεδομένου ότι τα μόρια αποτελούνται από χιλιάδες άτομα, η σωρευτική ελκτική δύναμη μεταξύ των μορίων είναι μεγάλη (Roberts, 1977).

### 1.5.2 Πολυμερισμός

Πολυστυρένιο προκύπτει όταν διασυνδέονται τα μονομερή στυρενίου. Στον πολυμερισμό, ο διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα της βινυλικής ομάδας διασπάται και σχηματίζεται νέος δεσμός με τον άνθρακα ενός άλλου μονομερούς στυρολίου στην αλυσίδα. Ο νεοσυσταθείς δεσμός είναι ισχυρότερος από τον δεσμό που διασπάται, επομένως είναι δύσκολο να αποπολυμεριστεί το πολυστυρένιο. Περίπου μερικές χιλιάδες μονομερή τυπικά περιλαμβάνουν αλυσίδα πολυστυρενίου, δίνοντας μοριακό βάρος 100.000-400.000. (Roberts, 1977)



Εικόνα 10 : Πολυμερισμός στυρενίου σε πολυστυρένιο (πηγή: βικιπαίδεια)

Το πολυστυρένιο είναι χημικά πολύ αδρανές, ανθεκτικό στα οξέα και τις βάσεις, αλλά διαλύεται εύκολα από πολλούς χλωριωμένους διαλύτες και πολλούς διαλύτες αρωματικών υδρογονανθράκων (ACC, 2011)

### 1.5.3 Βιοαποδόμηση

Αν και το πολυστυρένιο θεωρείται γενικά μη βιοδιασπώμενο, ορισμένοι οργανισμοί είναι σε θέση να το αποδομήσουν, αν και πολύ αργά. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκε ότι μεθανιογενείς μικροοργανισμοί αποδομούν το στυρόλιο ως μοναδική πηγή άνθρακα (Grbić-Galić et al., 1990). Σε αυτή την περίπτωση το στυρόλιο αποδομείται σε μια σειρά από οργανικά ενδιάμεσα και διοξείδιο του άνθρακα.

Μια σειρά μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομήσουν το πολυστυρένιο για τις ενεργειακές τους ανάγκες όπως οι γαστροοισοφάγοι, μορφές των προνυμφών του μαύρου σκαθαριού *Tenebrio molitor*, τα σκουλήκια *Zophobas morio* και άλλοι τύποι προνυμφών εντόμων, συμπεριλαμβανομένου του Soldier Fly. (Biello, 2006)

#### 1.5.4 Παράκτια μικροπλαστικά απορρίμματα πολυστυρενίου

Γενικά τα απορρίμματα από πολυστυρόλιο είναι μη βιοαποδομήσιμα και ανθεκτικά για εκατοντάδες χρόνια στη φωτοοξείδωση. Τα ζώα δεν αναγνωρίζουν τον αφρώδη πολυστυρένιο ως τεχνητό υλικό και μπορεί ακόμη και να παραπλανηθούν θεωρώντας το για φαγητό. Αυτό μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των πτηνών ή των θαλάσσιων ζώων που καταπίνουν σημαντικές ποσότητες. (Eccleston 2016)

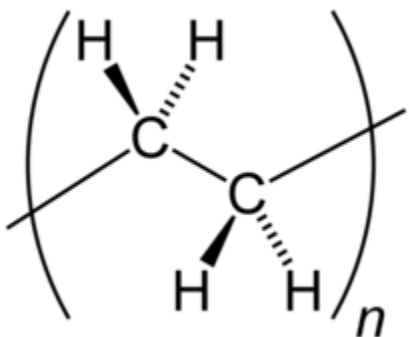
Ο περιορισμός της χρήσης της αφρώδους συσκευασίας τροφίμων πολυστυρολίου αποτελεί προτεραιότητα πολλών περιβαλλοντικών οργανώσεων στερεών αποβλήτων. Έχουν καταβληθεί προσπάθειες για την εξεύρεση εναλλακτικών λύσεων σε σχέση με το πολυστυρένιο. Πρωταρχικός στόχος όμως ήταν να εξαλειφθούν οι χλωροφθοράνθρακες (CFC), από τη διαδικασία παραγωγής.

#### 1.5.5 Ανακύκλωση

Γενικά, το πολυστυρένιο δεν γίνεται δεκτό σε προγράμματα ανακύκλωσης συλλογής απορριμμάτων και δεν διαχωρίζεται και ανακυκλώνεται όπου είναι αποδεκτό. Στη Γερμανία, συλλέγεται πολυστυρένιο, ως συνέπεια του νόμου περί συσκευασίας (Verpackungsverordnung), ο οποίος απαιτεί από τους κατασκευαστές να αναλάβουν την ευθύνη για την ανακύκλωση ή τη διάθεση οποιουδήποτε υλικού συσκευασίας που πωλούν (PPC 2009).

#### 1.6 Πολυαιθυλένιο (PE)

Πολυαιθυλένιο ή πολυαιθένιο (κατά IUPAC πολυαιθένιο ή πολυμεθυλένιο) είναι ίσως το περισσότερο αναπτυσσόμενο υλικό με τεράστια παγκόσμια παραγωγή. Η βασική του χρήση είναι στη συσκευασία (πλαστικές σακούλες, πλαστικές μεμβράνες, γεωμεμβράνες, σε δοχεία όπως φιάλες, κλπ.)(FDA, 2014). Πολλά είδη πολυαιθυλενίου είναι γνωστά, με τα περισσότερα να έχουν τον χημικό τύπο  $(C_2H_4)_n$ . Το PE δηλαδή είναι συνήθως ένα μείγμα παρόμοιων οργανικών ενώσεων που διαφέρουν στην τιμή του  $n$  (Scheirs 2004).



Εικόνα 11: Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του πολυαιθυλενίου (πηγή: Βικιπαίδεια)

### 1.6.1 Φυσικές ιδιότητες

Είναι διαφανές υλικό και ανάλογα με την κρυσταλλική δομή και τη σχετική μοριακή μάζα, μπορεί να έχει διαφορετικό σημείο τήξης και υαλώδη μετάπτωση. Για τις συνηθισμένες εμπορικές ποιότητες του μεσαίας και υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου, το σημείο τήξης είναι τυπικά στην περιοχή 120 έως 180°C. Το σημείο τήξης για μέσο, εμπορικό, χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο είναι , 105 έως 115°C.

### 1.6.2 Χημικές ιδιότητες

Οι περισσότερες ποιότητες LDPE, MDPE και HDPE έχουν εξαιρετική χημική αντίσταση, που σημαίνει ότι δεν προσβάλλονται από ισχυρά οξέα ή ισχυρές βάσεις. Αντιστέκονται επίσης σε ήπια οξειδωτικά και αναγωγικά. Καίγονται αργά και δεν διαλύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Το πολυαιθυλένιο μπορεί συνήθως να διαλυθεί σε αυξημένες θερμοκρασίες σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες όπως τολουόλιο ή ξυλένιο, ή σε χλωριωμένους διαλύτες όπως το 1,1,1-τριχλωροαιθάνιο ή τριχλωροβενζένιο. Το μονομερές είναι το αιθυλένιο ή αιθένιο, είναι ένας αέριος υδρογονάνθρακας με μοριακό τύπο  $C_2H_4$  είναι, που μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ζεύγος από μεθυλενομάδες ( $=CH_2$ ) συνδεδεμένες μεταξύ τους. Επειδή η ένωση αντιδρά έντονα, το αιθυλένιο πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας. Το αιθένιο παράγεται συνήθως από πετροχημικές πηγές, αλλά παράγεται επίσης από αφυδάτωση της αιθανόλης.

### 1.6.3 Ταξινόμηση

Ανάλογα με την πυκνότητά του και τη διακλάδωσή του, το πολυαιθυλένιο ταξινομείται σε διάφορες κατηγορίες με βάση. Οι μηχανικές του ιδιότητες εξαρτώνται από μεταβλητές όπως το μήκος του μορίου και ο τύπος της διακλάδωσης, η κρυσταλλική δομή και η σχετική μοριακή μάζα. Με βάση του όγκου παραγωγής, τα πιο σημαντικά είδη πολυαιθυλενίου είναι τα HDPE, LLDPE και LDPE.

#### Κατηγορίες πολυαιθυλενίου

- Υπερυψηλής σχετικής μοριακής μάζας πολυαιθυλένιο (Ultra-high-molecular-weight polyethylene)(UHMWPE)
- Υπερχαμηλής σχετικής μοριακής μάζας πολυαιθυλένιο (Ultra-low-molecular-weight polyethylene) (ULMWPE ή PE-WAX)
- Υψηλής σχετικής μοριακής μάζας πολυαιθυλένιο (High-molecular-weight polyethylene) (HMWPE)
- Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (High-density polyethylene) (HDPE)
- Διασταυρωμένο πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (High-density cross-linked polyethylene) (HDXLPE)
- Διασταυρωμένο πολυαιθυλένιο (Cross-linked polyethylene) (PEX or XLPE)
- Πολυαιθυλένιο μεσαίας πυκνότητας (Medium-density polyethylene) (MDPE)
- Γραμμικό πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (Linear low-density polyethylene) (LLDPE)
- Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (Low-density polyethylene) (LDPE)
- Πολυαιθυλένιο πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very-low-density polyethylene) (VLDPE)
- Χλωριωμένο πολυαιθυλένιο (Chlorinated polyethylene) (CPE)

#### **1.6.4 Συμπεριφορά στο περιβάλλον**

Είναι η περισσότερη χρησιμοποιούμενη χημική ουσία στην αγροτική βιομηχανία. Τα μεγάλα πλαστικά κομμάτια τραυματίζουν, προκαλούν ασφυξία και συχνά θάνατο στα ζώα της θάλασσας, συμπεριλαμβανομένων και ειδών που είτε προστατεύονται από το νόμο είτε κινδυνεύουν με εξαφάνιση, όπως οι θαλάσσιες χελώνες. Όμως, είναι τα μικροπλαστικά, τα μικρά θραύσματα πλαστικού τα οποία έχουν φτάσει σε επίπεδα ρεκόρ στη Μεσόγειο, όπου η συγκέντρωση μικροπλαστικών είναι σχεδόν τέσσερις φορές υψηλότερη από αυτήν του «πλαστικού νησιού» που βρίσκεται στον Βόρειο Ειρηνικό Ωκεανό. Όταν εισέρχονται στην

τροφική αλυσίδα αποτελούν απειλή για έναν μεγάλο αριθμό ειδών αλλά και για την ανθρώπινη υγεία.

Σχεδόν πάνω από το 90% της καταστροφής που προκαλείται στην άγρια ζωή των θαλασσών μας οφείλεται στα πλαστικά. Παγκοσμίως, περίπου 700 θαλάσσια είδη απειλούνται από τα πλαστικά, από τα οποία το 17% είναι καταχωρημένα στη λίστα της IUCN ως «απειλούμενα» ή «κρισίμως απειλούμενα». Τα θαλάσσια είδη καταπίνουν πλαστικά είτε ηθελημένα, είτε τυχαία, είτε έμμεσα επειδή τρέφονται από κάποιο θήραμα που ήδη έχει καταπιεί πλαστικά. Στη Μεσόγειο, 134 είδη πέφτουν θύματα της κατάποσης πλαστικών συμπεριλαμβανομένων 60 ειδών ψαριών, και των 3 ειδών χελωνών, 9 ειδών θαλασσοπούλιων και 5 ειδών θαλάσσιων θηλαστικών (φουσητήρες, πτεροφάλοι, ρινοδέλφια, σταχτοδέλφια και ζωνοδέλφια). Σήμερα το 90% των θαλασσοπούλιων έχουν κάποιο μικρό κομμάτι πλαστικού στο στομάχι τους (το 1960 το ποσοστό αυτό ήταν 5%). Μέχρι το 2050 αυτό το ποσοστό μπορεί να έχει αγγίξει το 99% αν δε ληφθεί δράση για τη μείωση των πλαστικών στη θάλασσα. Πλαστικές ίνες και μικροπλαστικά έχουν βρεθεί μέσα σε μύδια και στρείδια, ενώ πακέτα με τσιπς και τσιγάρα έχουν βρεθεί στα στομάχια μεγάλων πελαγικών ψαριών. Μία από τις χειρότερες περιπτώσεις ήταν όταν 9 μέτρα πετονιάς, 4,5 μέτρα εύκαμπτου σωλήνα, 2 γλάστρες κι άλλες πλαστικές παγίδες βρέθηκαν στο στομάχι ενός εκβρασμένου φουσητήρα.

Ακόμα και μικρότερα είδη, όπως τα μύδια, τα καβούρια και τα μπαρπούνια, τα οποία τρέφονται από το βένθος, μπορούν να είναι σημαντικοί συσσωρευτές μικροπλαστικών. Σύμφωνα με μία έρευνα που έγινε για μικροπλαστικά σε μύδια και στρείδια τα οποία καλλιεργούνταν για κατανάλωση ένας μέσος Ευρωπαίος καταναλωτής οστρακόδερμων μπορεί και να καταναλώνει μέχρι και 11,000 κομματάκια μικροπλαστικών το χρόνο. Όμως, οι επιπτώσεις των μικροπλαστικών στην ανθρώπινη υγεία είναι ακόμα άγνωστες. Τα πλαστικά έχουν επίσης εισέλθει και στον κόσμο των μικροσκοπικών ειδών. Το ζωοπλαγκτόν (οι μικροί οργανισμοί που βρίσκονται στη βάση της θαλάσσιας τροφικής αλυσίδα) άθελά του τρέφεται με σωματίδια πλαστικών μικρότερα του 1χιλιοστού. Αυτά τα κομματάκια, μπορεί να περιλαμβάνουν τοξικές ουσίες: καταπίνοντάς τα το ζωοπλαγκτόν τα μεταδίδει στην τροφική αλυσίδα φτάνοντας μέχρι τους ανθρώπους. (WWF αναφορά 2018)

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

Κατά την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη πλαστικών: το πολυστυρένιο (PS) και το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE). Τα δύο είδη πλαστικού προμηθεύτηκαν σε μορφή παρθένων υμενίων (virgin films). Παράλληλα, γυάλινα ενυδρεία (συνολικά 4 στον αριθμό) τοποθετήθηκαν στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης και χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση του πειράματος. Σε κάθε ένα από αυτά, τοποθετήθηκαν HOBO, τα οποία κατέγραφαν τη θερμοκρασία και την ακτινοβολία σε όλη τη διάρκεια τους πειράματος.

### 2.2 Μέθοδοι

Στο ξεκίνημα του πειράματος, τα δύο είδη πλαστικών κόπηκαν σε τετράγωνα κομμάτια με διαστάσεις 2 cm x 2 cm. Στο κέντρο καθενός από αυτά, δημιουργήθηκε μία οπή ώστε να περαστούν διαδοχικά σε πετονιά και στη συνέχεια μετρήθηκε το βάρος τους στη ζυγαριά του εργαστηρίου με ακρίβεια στο δεύτερο δεκαδικό ψηφίο σε μονάδες mg.



Εικόνα 11 : Ζύγιση των πλαστικών PS και LDPE

Κάθε πλαστικό, μετά τη ζύγισή του, τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο σημειώθηκε ο αριθμός του και το αρχικό του βάρος καταγράφηκε σε αρχείο. Στην πετονιά που είχε μήκος 105 cm, σηματοδεύτηκε η αρχή στα πρώτα 35 cm με μία διπλή θηλιά και στη συνέχεια δέθηκαν τα πλαστικά ανά 3 και 4 cm εναλλάξ.



Χρειάστηκαν περίπου 480 τετράγωνα κομμάτια από το κάθε είδος πλαστικού, ώστε να δημιουργηθούν 15 σχοινάκια, καθένα από τα οποία περιείχε 8 πλαστικά του κάθε τύπου πολυμερούς.



Εικόνα 12 : Ζυγισμένα και αριθμημένα πλαστικά

Παράλληλα δημιουργήθηκε μια ορθογώνια κατασκευή, από ανοξείδωτο ατσάλι, η οποία χωρίστηκε στη μέση με τέτοιο τρόπο ώστε από τη μία πλευρά να τοποθετηθούν 12 σχοινάκια πολυαιθυλενίου και από την άλλη ταυτόσημα τα σχοινάκια πολυστυρενίου.



Εικόνα 13 : Σχοινάκια αποτελούμενα από τα οκτώ κομμάτια πλαστικού

Τα σχοινάκια τοποθετήθηκαν σε 4 διαφορετικά ενυδρεία τα οποία ονομάστηκαν Α,Β,Σ,Δ και τα οποία το καθένα περιείχε:

- Φιλτραρισμένο νερό από τη θαλάσσια περιοχή της Σούδας και εκλιματισμένους μικροοργανισμούς (Α)
- Φιλτραρισμένο νερό από τη θαλάσσια περιοχή της Σούδας (Β)
- Αφιλτράριστο νερό από τη θαλάσσια περιοχή της σούδας και τους ίδιους μικροοργανισμούς με το ενυδρείο Α (Σ)
- Αφιλτράριστο νερό από τη θαλάσσια περιοχή της Σούδας (Δ).

Στα ενυδρεία, ο επαρκής αερισμός και ο ελαφρύς κυματισμός επιτυγχάνθηκε με τη χρήση αντλιών, ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκε η ορθογώνια κατασκευή με τα πλαστικά.



Εικόνα 14 : Γυάλινα δοχεία για την εκπόνηση του πειράματος.

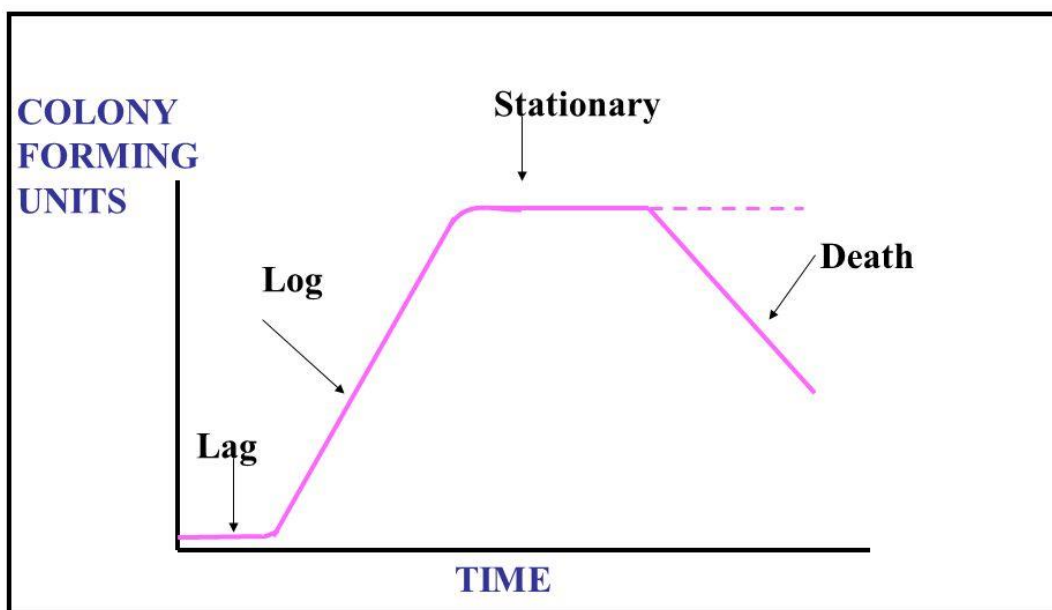
## 2.3 Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Για τη διεξαγωγή του πειράματος η θαλάσσια κοινότητα που χρησιμοποιήθηκε και με την οποία εμβολιάστηκαν τα ενυδρεία Α και Β, απομονώθηκε στα πλαίσια του FP-7 Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος BIOCLEAN (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.

Πρόκειται για μικροβιακές κοινότητες που αρχικά είχαν συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του Αγίου Ονούφριου στα Χανιά και εγκλιματίστηκαν για 6 μήνες σε περιβάλλον με μοναδική πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου και πολυστυρενίου. Οι θαλάσσιες κοινότητες ονομάστηκαν AGIOSPS και AGIOSPE και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για πειραματικές χρήσεις.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, στοιχεία για την μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών παρέχει η καμπύλη ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας.

### Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων



Εικόνα 15 : Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών (πηγή : <https://slideplayer.gr> )

Η γραφική παράσταση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με το χρόνο έχει τέσσερις διακριτές περιοχές:

Α) Η πρώτη περιοχή αφορά τη Φάση Προσαρμογής (Lag phase): Κατά το χρονικό αυτό διάστημα τα κύτταρα δε διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, αλλά συνθέτουν νέα συστατικά (π.χ. ένζυμα κλπ.)

Β) Η επόμενη χρονική περίοδος αφορά τη Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase): Κατά τη φάση αυτή τα κύτταρα αναπτύσσονται με μέγιστο σταθερό ρυθμό.

Γ) Το τρίτο χρονικό διάστημα είναι η Φάση στασιμότητας (Stationary phase): Στη φάση αυτή η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σταματά και παρατηρείται εξισορρόπηση του ρυθμού ανάπτυξης και θανάτου. Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στη φάση αυτή για διάφορους λόγους όπως έλλειψη θρεπτικών στοιχείων στο μέσο καλλιέργειας, έλλειψη οξυγόνου (αερόβια καλλιέργεια), συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων κλπ.

Δ) Η τελευταία φάση είναι η αυτή η φάση θανάτου (Maier 2009). Κατά τη φάση αυτή η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των τοξικών προϊόντων μεταβολισμού των μικροοργανισμών οδηγεί στο θάνατο των μικροοργανισμών.

Ο προσδιορισμός της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών έγινε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS στα 600nm με το οποίο υπολογίστηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων. Πραγματοποιήθηκαν και στις δυο διαφορετικές κοινότητες μικροοργανισμών επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας κάθε 30 min έως ότου να ληφθεί η επιθυμητή τιμή απορρόφησης.

Κατά την διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης των κοινότητων, 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 falkons από κάθε καλλιέργεια αναμίχτηκαν. Η ποσότητα εμβολιασμού υπολογίστηκε με βάση τον νόμο της αραιώσης :

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1 * V_1}{V_2} = \frac{\frac{10^8 CFU}{ml} * 30 ml}{3 ml} = 10^9 CFU/ml$$

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  $V_2 = 3 ml$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \rightarrow V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{\frac{10^4 CFU}{ml} * 40.000 ml}{10^9 ml} = 4000 \mu l$$

Όπου

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

$V_1$ : ζητούμενος όγκος εμβολιασμού

$C_2$ : επιθυμητός αριθμός αποικιών κάθε ενυδρείου

$V_2$  : όγκος κάθε ενυδρείου

Συνεπώς, τα 2 ενυδρεία Α και Β εμβολιάστηκαν με 4000 μl από την κοινότητα AGIOSPS από την κοινότητα AGIOSPE αντίστοιχα.



*Εικόνα 16 : Πειραματική διάταξη σε πλήρη ανάπτυξη*

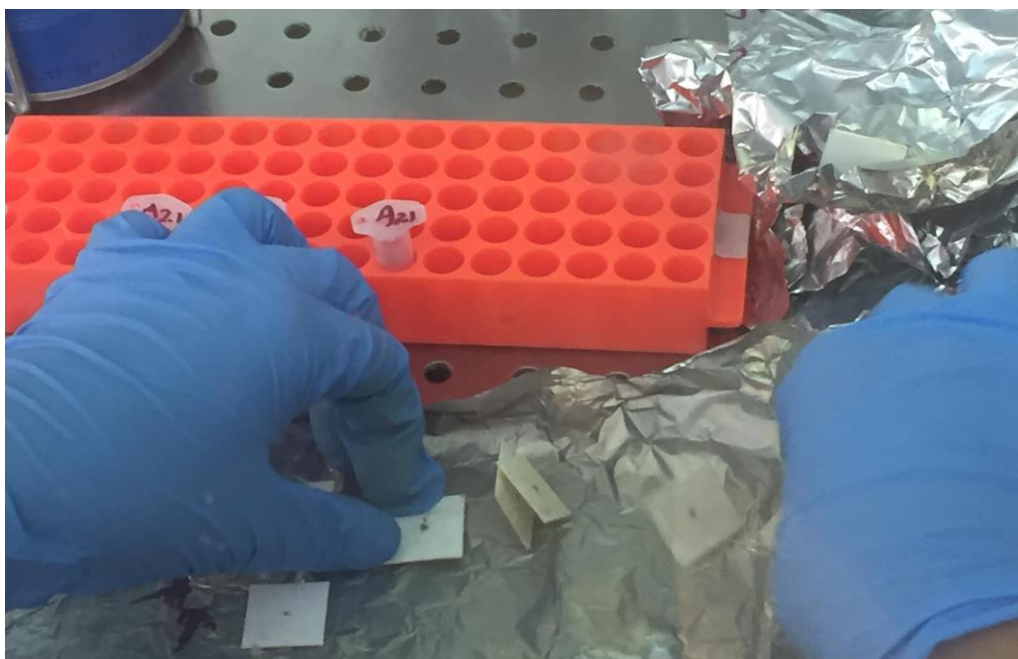
## **2.4 Δειγματοληψία**

Η δειγματοληψία λάμβανε χώρα κάθε μήνα, και διήρκησε συνολικά 4 μήνες. Κάθε μήνα κοβόταν διαδοχικά ένα σχοινάκι από κάθε είδος πλαστικού, ενώ παράλληλα συλλέγονταν περίπου 35 ml νερού από 3 διαφορετικά σημεία τα οποία ονομάστηκαν 1,2,3 όπως φαίνεται κ στη σχηματική απεικόνιση (εικόνα 17).

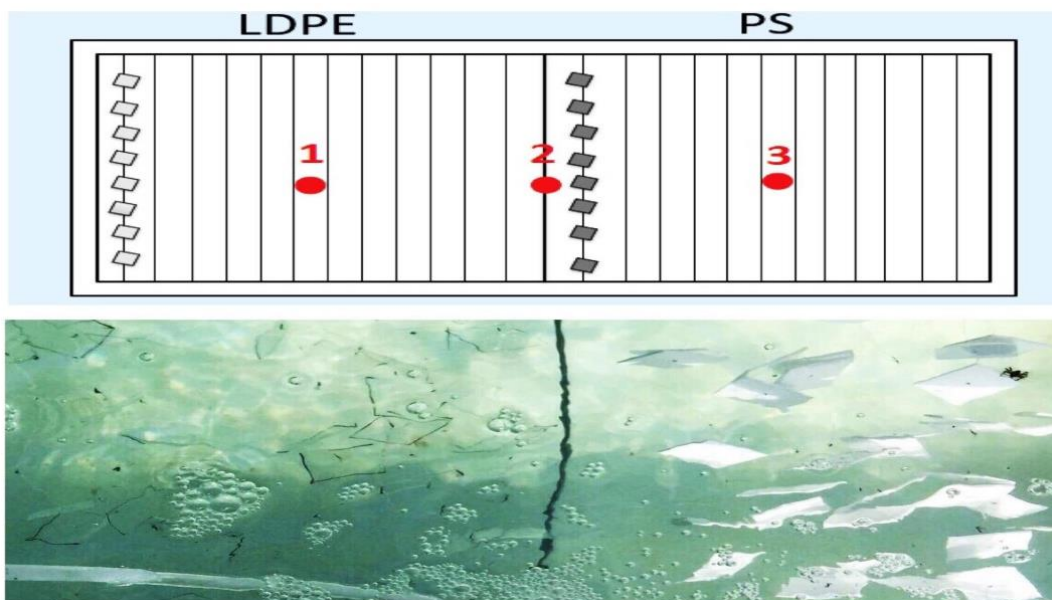
Συνεπώς το σημείο 1 αντιστοιχεί στη μέση των πλαστικών του πολυαιθυλενίου, το σημείο 2 αντιστοιχεί στη μέση της συνολικής πειραματικής διάταξης, ενώ το σημείο 3 στη μέση των πλαστικών του πολυστυρενίου. Μετά τη συλλογή του νερού σημειώθηκε στο falcon κατά σειρά το ενυδρείο, ο μήνας και τέλος το αντίστοιχο σημείο της δειγματοληψίας(π.χ Α<sub>1.3</sub>). Τα falcon αυτά στη συνέχεια φυλάσσονταν στην κατάψυξη ώστε να χρησιμοποιηθούν για περεταίρω αναλύσεις.

Όσον αφορά τη διαδικασία δειγματοληψίας για το καθένα πλαστικό, αφού αφαιρέθηκε το σχοινάκι από το ενυδρείο σημειώθηκε η προέλευση του, και σε αποστειρωμένες συνθήκες ξύστηκε η επιφάνειά τριών πλαστικών από κάθε είδος με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας, ώστε να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που δημιουργήθηκε σε αυτή.





Εικόνα 17 : Απομάκρυνση βιοφίλμ από την επιφάνεια των πλαστικών με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας.



Εικόνα 18 : Κάτοψη της πειραματικής διάταξης.

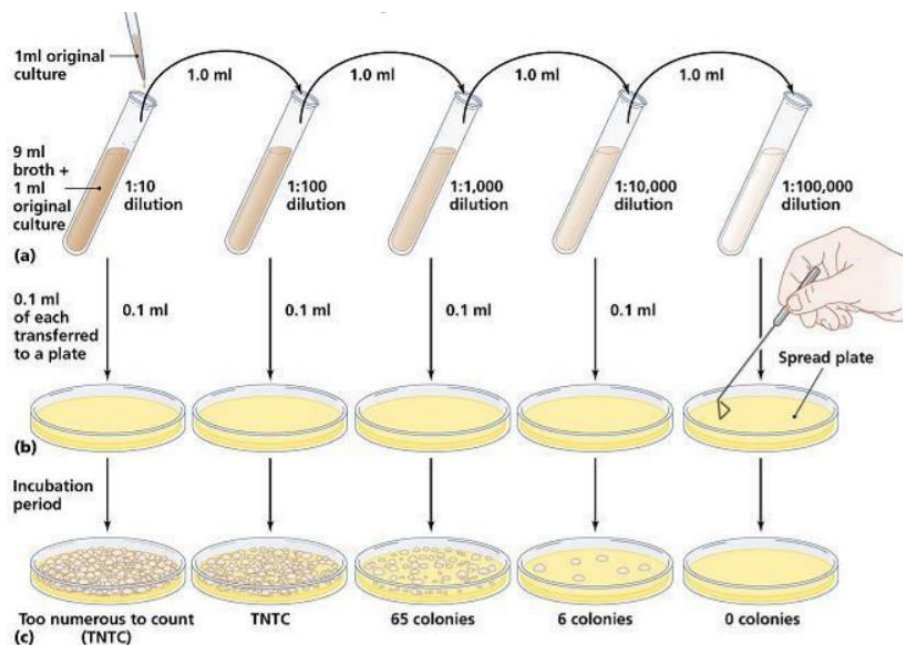
Αυτό τοποθετήθηκε σε eppendorfs με ονομασία ίδια με εκείνη των falcons με περίπου 1.5 ml αποστειρωμένου θαλασσινού νερού και τελικά αποθηκεύτηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

### 2.4.1 Μικροβιακός πληθυσμός.

Η εκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με πρότυπο τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, σύμφωνα με την οποία κάθε βακτηριακό κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μία αποικία θυγατρικών κυττάρων που είναι ορατή με γυμνό μάτι. Έτσι, πριν την επίστρωση σε τριβλία με άγαρ, το αρχικό δείγμα υπόκειται σε διαδοχικές αραιώσεις ώστε η αρίθμηση των αποικιών να είναι εφικτή. Οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν πολύ προσεκτικά σε αποστειρωμένες συνθήκες, παρόλο που το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μη αποστειρωμένες. Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού που απομονώθηκε από την επιφάνεια του πλαστικού πραγματοποιήθηκε

Στα τριβλία, χρησιμοποιήθηκε DSMZ-453 θρεπτικό υλικό του οποίου η συνταγή είναι:

- Peptone from meat 7.8 g
- Peptone from casein 7.8 g
- Yeast extract 2.8 g
- NaCl 5.6 g
- D(+)-Glucose 1.0 g
- Distilled water 1000 mL
- Agar 12 g



Εικόνα 19 .Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (Πηγή : <https://microbeonline.com>)

## 2.4.2 Μέτρηση βάρους.

Για το προσδιορισμό του βάρους τα πλαστικά, αφού πλύθηκαν με Tween<sup>80</sup>, και ώστε να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο βιοφίλμ και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό τοποθετήθηκαν στο φούρνο για περίπου μία βδομάδα. Έπειτα, μετρήθηκε το ξηρό βάρος τους και συγκρίθηκε με το αρχικό του καθενός πλαστικού. Η διαφορά βάρους προσδιορίστηκε από τον ακόλουθο τύπο :

$$\text{Μείωση βάρους (\%)} = \frac{\text{Αρχικό βάρος} - \text{Τελικό βάρος}}{\text{Αρχικό βάρος}} * 100$$

Όπου :

- Αρχικό βάρος, το αρχικό βάρος κάθε αριθμημένου πλαστικού
- Τελικό βάρος, το τελικό βάρος κάθε πλαστικού στην εκάστοτε δειγματοληψία

## 2.4.3 Πρωτεΐνες

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Lowry. Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη ώστε να υπολογίσουμε τη ποσότητα των πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Αρχικά, οι πρωτεΐνες προεπεξεργάζονται με ιόντα χαλκού σε αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια τα αρωματικά αμινοξέα στο επεξεργασμένο δείγμα μειώνουν το φωσφομολυβδαινικό οξύ που υπάρχει στο αντιδραστήριο Folin. Το ποσό των πρωτεϊνών υπολογίζεται διαβάζοντας τη απορρόφηση στα 750 nm.

Ο προσδιορισμός, λοιπόν, των πρωτεϊνών του βιοφίλμ πραγματοποιήθηκε και για τα δύο είδη πλαστικού σε κάθε μηνιαία δειγματοληψία. Αρχικά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 20 min, και το θαλασσινό νερό απομακρύνθηκε προσεκτικά ώστε να αντικατασταθεί εξίσου με 1.5 ml απιονισμένο νερό. Ο ορός αλβουμίνης βοδιού (BSA) με αρχική συγκέντρωση 100 mg/L χρησιμοποιήθηκε ώστε να κατασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα και μέσω της απορρόφησης τους να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη.



Τα διαλύματα αυτά ήταν :

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΣΥΝΘΕΣΗ
B	0.500 mg/ml	7.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml stock
C	0.250 mg/ml	2.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml B
D	0.200 mg/ml	3 ml H <sub>2</sub> O + 2 ml B
E	0.150 mg/ml	3.5ml H <sub>2</sub> O + 1.5 ml B
F	0.125 mg/ml	2.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml C
G	1.000 mg/ml	4 ml H <sub>2</sub> O + 1 ml B
H	0.075 mg/ml	2.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml E
I	0.050 mg/ml	2.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml G
J	0.025 mg/ml	2.5 ml H <sub>2</sub> O + 2.5 ml I



Εικόνα 20 : Φιαλίδια πρότυπων διαλυμάτων με σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης του ορού αλβουμίνης βοδιού (BSA) αρχικής συγκέντρωσης 100 mg/L.

Τα διαλύματα, παρέμειναν 30 min στο σκοτάδι, και στη συνέχεια 1,3 ml δείγματος μεταφέρθηκε σε καθαρή κυψελίδα ώστε να φωτομετρηθούν στα 750 nm.

#### 2.4.4 Υδατάνθρακες

Η συνολική ποσότητα υδατανθράκων στο δείγμα υπολογίστηκε με τη μέθοδο της ανθρόνης. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια απλή χρωματομετρική μέθοδο, η οποία όμως παρουσιάζει μία σχετική έλλειψη ευαισθησίας στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Αρχικά, πραγματοποιείται υδρόλυση των πολυσακχαριτών και η αφυδάτωση των μονομερών (προσθήκη θειικού οξέος και θερμική επεξεργασία). Τα σάκχαρα 5-άνθρακα (πεντόζη) και 6-άνθρακα (εξόζη) μετατρέπονται σε φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, αντιστοίχως. Στη συνέχεια προστίθεται η ανθρόνη, η οποία αποτελεί μια αρωματική ένωση και αντιδρά με τα παραπάνω προϊόντα πέψης και δίνει μια έγχρωμη ένωση (Gerhardt et al. 1994). Ως πρότυπο διάλυμα για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 100 mg glucose / L και οι συγκεντρώσεις ήταν οι εξής :

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΣΥΝΘΕΣΗ
A	20 mg/ml	8 ml H <sub>2</sub> O + 2 ml stock
B	15mg/ml	8,5ml H <sub>2</sub> O + 1,5 ml stock
C	10 mg/ml	9ml H <sub>2</sub> O + 1 ml stock
D	8mg/ml	9,2ml H <sub>2</sub> O + 0,8 ml stock
E	5mg/ml	5ml H <sub>2</sub> O + 5 ml C
F	1mg/ml	9ml H <sub>2</sub> O + 1 ml C
G	0,5mg/ml	5ml H <sub>2</sub> O + 5 ml F
H	0,1mg/ml	8ml H <sub>2</sub> O + 2 ml G

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης παρασκευάστηκε διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης 75 % από την προηγούμενη μέρα και αναμείχθηκε με διάλυμα ανθρακενόνης. Αυτό, παρασκευάστηκε από την ανάμειξη 0,5 gr ανθρακενόνης με 10 ml καθαρής αιθανόλης. Το τελικό διάλυμα, τοποθετήθηκε στην ανάδευση ώστε να διαλυθεί πλήρως.

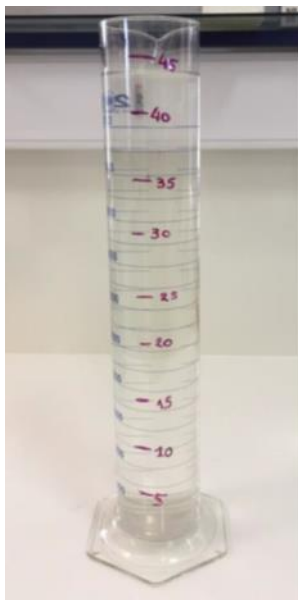


Εικόνα 21 : Φιαλίδια πρότυπων διαλυμάτων με σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης αρχικής συγκέντρωσης 100 mg/L

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, μέσα σε καθαρά φιαλίδια τοποθετήθηκε 1 ml δείγματος ή αραιώσεων, 2 ml θειικό οξύ και 4 ml διάλυμα ανθρακενόνης και μεταφέρθηκαν στο φούρνο στους 100° C για 15 min. Αφού απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, καθένα από τα δείγματα μεταφέρθηκε σε καθαρές κυψελίδες ώστε να φωτομετρηθεί στα 578 nm.

#### 2.4.5 Ταχύτητα καθίζησης

Ο χρόνος που χρειάζονται τα πλαστικά για να διαπεράσουν μια στήλη νερού και να κατακαθίσουν στον πυθμένα υπολογίζεται με τη μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 2 L, στον οποίο τοποθετήθηκε θαλασσινό νερό, το οποίο φιλτραρίστηκε με φίλτρο διαμέτρου πόρου περίπου 200  $\mu\text{m}$ . Στον κύλινδρο χαράχτηκαν 9 σημεία ανά 5 cm και υπολογίστηκε με τη βοήθεια χρονομέτρου ο χρόνος που χρειαζόταν το πλαστικό να περάσει από το κάθε σημείο.



Εικόνα 22 : Ογκομετρικός κύλινδρος μέτρησης της ταχύτητας καθίζησης.

#### 2.4.6 Μέγεθος μικροπλαστικών

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους μικροπλαστικών χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα SALD 7500. ρχικά, εισήχθη 5 ml θαλασσινού νερού ώστε να μηδενιστεί το μηχάνημα (blank) , και στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 ml από το δείγμα για κάθε ενυδρείο από τα δύο σημεία που αντιστοιχούν σε κάθε τύπο πλαστικού.

##### Αρχή Λειτουργίας Οργάνου



Εικόνα 23 : Όργανο μέτρησης διασποράς μεγέθους πλαστικών

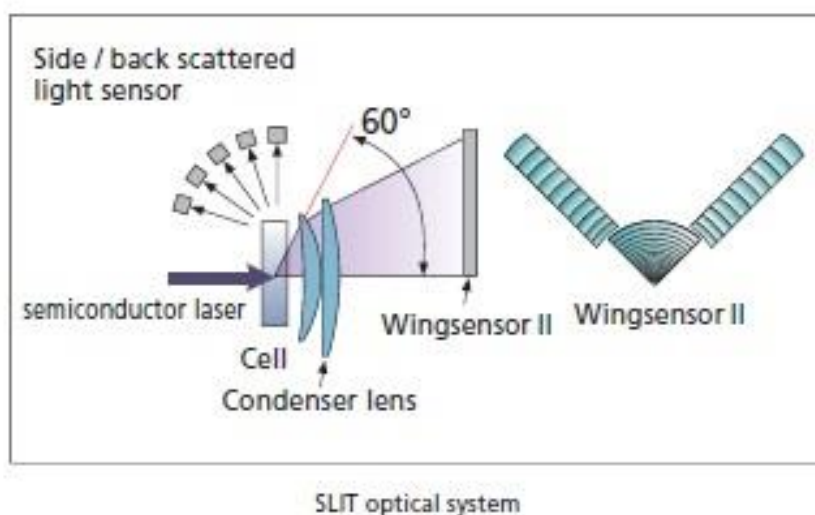
(Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))

Το όργανο βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης του φωτός. Σκέδαση ονομάζεται ο διασκορπισμός των φωτεινών ακτίνων όταν προσπέσουν σε μικροσκοπικά σωματίδια, έτσι ώστε να διαχέονται στο χώρο χωρίς να φαίνονται. Η οπτική αντίληψη του γεγονότος αυτού ονομάζεται φαινόμενο σκέδασης, σκεδαζόμενο φως (scattered light). Πρόκειται ουσιαστικά, για απορρόφηση του φωτός και επανεκπομπή του από τα μικροσκοπικά σωματίδια πάνω στα οποία προσπίπτει, ενώ οι συχνότητες από τις οποίες αποτελείται το φως, παραμένουν αμετάβλητες. 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).

Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο κατανέμεται στο χώρο το σκεδαζόμενο φως είναι δυνατός ο καθορισμός των φυσικών χαρακτηριστικών του σκεδαστή π.χ. μέγεθος, δομή. Σκεδαστής μπορεί να είναι σωματίδιο ή μικροοργανισμός. Η σκέδαση του φωτός από μικροοργανισμούς είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που οφείλεται στη μεγάλη ανομοιογένεια της βιολογικής ύλης. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να αναγνωρισθούν διάφορες μορφολογικές δομές που είναι υπεύθυνες για τη σκέδαση. Τη σκέδαση γενικά μπορούμε να την περιγράψουμε με την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε μια κατεύθυνση που σχηματίζει γωνία σε σχέση με την

αρχική ακτινοβολία. Κατά τη σκέδαση έχουμε διάφορες γωνίες εκτροπής χωρίς να μεταβάλλεται η ενέργεια της φωτεινής δέσμης.

Αν η διάμετρος ενός σωματιδίου ή μικροοργανισμού είναι μεγάλη, τότε το σκεδαζόμενο φως εκπέμπεται κυρίως στην μπροστινή κατεύθυνση (π.χ. στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας ακτίνας του λέιζερ) και παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις σε μια περιοχή γωνιών που είναι πολύ μικρή για να αναπαρασταθεί. Σε σχέση με το φως που εκπέμπεται προς τη μπροστινή κατεύθυνση, η ένταση της υπόλοιπης ακτινοβολίας είναι αρκετά χαμηλή. Όσο όμως η διάμετρος του σωματιδίου γίνεται μικρότερη, το σκεδαζόμενο φως εκτείνεται σε μεγαλύτερες γωνίες. Όταν το σωματίδιο γίνεται ακόμα μικρότερο, η ένταση του φωτός που εκπέμπεται πλάγια και πίσω γίνεται εντονότερη. Έτσι το σωματίδιο ή ο μικροοργανισμός φαίνεται να ακτινοβολεί προς όλες τις κατευθύνσεις σχεδόν σφαιρικά και ομοιόμορφα. Ανάλογα λοιπόν με τον τρόπο κατανομής έντασης του φωτός μπορεί να υπολογιστεί η διάμετρος του σωματιδίου. Βέβαια οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε ομάδες σωματιδίων και όχι σε μεμονωμένα σωματίδια. Έτσι η τελική κατανομή της έντασης του φωτός που εκπέμπεται από την ομάδα οφείλεται σε ένα συνδυασμό σκεδαζόμενου φωτός που εκπέμπεται από κάθε μεμονωμένο σωματίδιο.



Εικόνα 24 : Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας του οργάνου.

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

#### 2.4.7 Προσδιορισμός θρεπτικών

Σε κάθε δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκαν και ποσοτικές μετρήσεις των θρεπτικών συστατικών που περιέχονταν μέσα σε καθένα από τα ενυδρεία A,B,C,D. Συγκεκριμένα εκτιμήθηκαν το ολικό άζωτο (TN), τα φωσφορικά ιόντα ( $PO_4^{3-} - P$ ), τα αμμωνιακά ιόντα ( $NH_4^+ - N$ ), τα νιτρικά ιόντα ( $NO_3^- - N$ ) καθώς και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD). Οι μετρήσεις των παραπάνω πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο HACH (μοντέλο DR2800) το οποίο πραγματοποίησε την ένδειξη μέσω του back code.

##### Ολικό Άζωτο (TN)

Για τη μέτρηση του ολικού αζώτου χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από την εταιρία LATON (LCK238). Σε καθαρά φιαλίδια τοποθετήθηκε 0.5 ml από το δείγμα και 2 ml από το αντιδραστήριο A καθώς και μία ταμπλέτα B. Χωρίς να ανακατευθεί το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στον φούρνο για 30 min, στους 120° C. Έπειτα, όταν απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, ανακινήθηκε και με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετήθηκε 0.5 ml από το αρχικό φιαλίδιο σε εκείνο που περιέχεται στην συσκευασία, προσθέτοντας επίσης 0.2 ml από το αντιδραστήριο D. Ανακινήθηκε ξανά κ μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο. A

##### Φωσφορικά ιόντα ( $PO_4^{3-} - P$ )

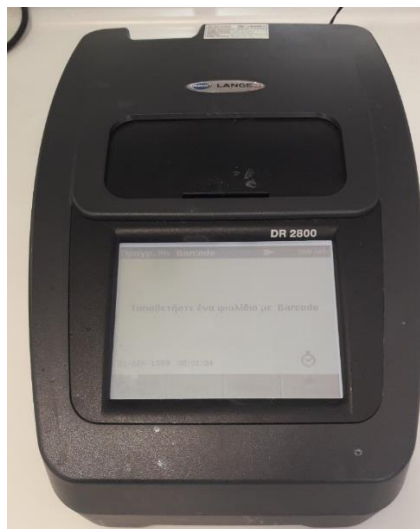
Για την εκτίμηση των φωσφορικών ιόντων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από την εταιρεία HACH (LCK 349). Τα ειδικά φιαλίδια που περιέχονται μέσα στο κουτί, διαθέτουν ένα dosicap, το οποίο αφού προσθέσαμε 2.0 ml από το δείγμα, ξετυλίχθηκε και στη συνέχεια σφράγισε το φιαλίδιο. Αφού ανακινήθηκε, τοποθετήθηκε στον φούρνο στους 120° C για 30 min. Όταν το φιαλίδιο απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε 0.2 ml από το αντιδραστήριο B, και το παλιό dosicap αντικαταστάθηκε με νέο ονομαζόμενο C. Ανακινήθηκε και μετά από 10 min πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του.

##### Αμμωνιακά ιόντα ( $NH_4^+ - N$ )

Η εκτίμηση των αμμωνιακών ιόντων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια από την εταιρεία HACH ( LCK 304). Στα φιαλίδια του κουτιού περιέχεται ένα dosicap, όπως και σε εκείνων των φωσφορικών. Σε αυτά προστέθηκε 5 ml δείγμα και σφραγίστηκε με τρόπο ίδιο με προηγουμένως και ανακινήθηκε. Μετά από 15 min, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

##### Νιτρικά ιόντα ( $NO_3^- - N$ )

Για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια που προμηθεύτηκαν από την εταιρεία HACH ( LCK 339). Στα φιαλίδια που περιέχονται στο κουτί, προστέθηκε 1 ml δείγμα και 0.2 ml αντιδραστήριου A, το οποίο υπάρχει εξίσου στο κουτί. Αφού ανακινήθηκε, μετά από 15 min πραγματοποιήθηκε η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.



Εικόνα 25 : Φασματοφωτόμετρο LATON (LCK238).

#### Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Για τον προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από την εταιρεία La Motte (0073-SC). Στα φιαλίδια, αφού πρώτα ανακινήθηκαν προστέθηκαν 2 ml από το δείγμα και τοποθετήθηκαν στον φούρνο στα 2 ώρες. Όταν αποκτήθηκε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο της εταιρείας HACH (μοντέλο DR/2010) στο πρόγραμμα #435, το οποίο αντιστοιχεί σε high range περιοχή. Μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα ετοιμάστηκε και ένα τυφλό διάλυμα ώστε να μηδενιστεί το μηχάνημα.

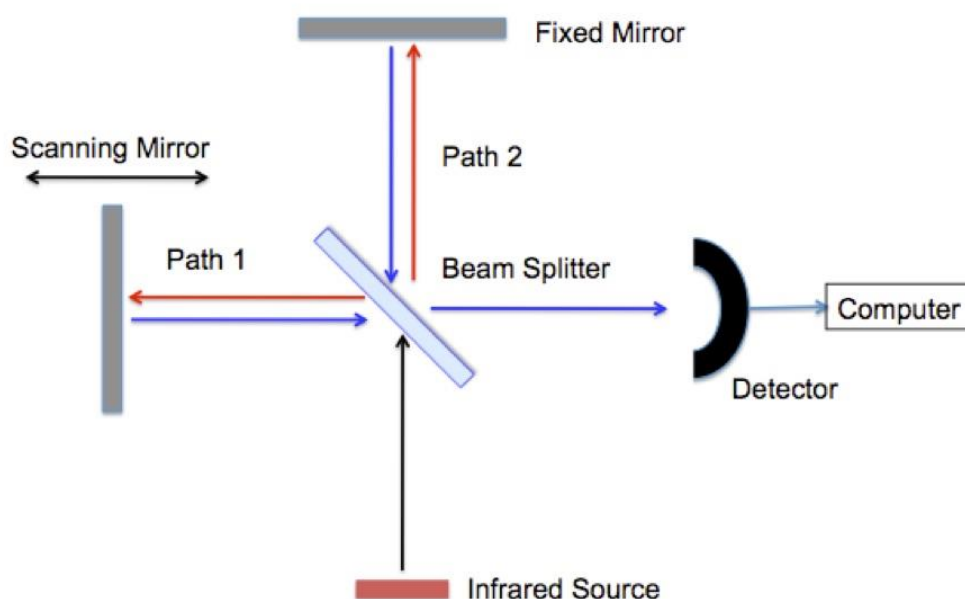


Εικόνα 26 : Φασματοφωτόμετρο HACH DR/2010.



## 2.4.8 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier

Η φασματοσκοπία υπερύθρου στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με το υπέρυθρο φως. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγές στη διπολική ροπή του μορίου, που μελετάται δημιουργώντας δονήσεις. Οι δονήσεις αυτές, που εμφανίζονται σε ένα φάσμα υπερύθρου μπορούν να μας δώσουν την ταυτότητα των χημικών ειδών, που υπάρχουν στο δείγμα. Στη φασματοσκοπία υπερύθρου μετράται η απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα σε συνάρτηση με τη συχνότητα. Το φάσμα απορρόφησης είναι η παράμετρος που χαρακτηρίζει μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων. Τα φάσματα που λαμβάνονται από ένα φασματοφωτόμετρο έχουν ως βάση λειτουργίας την μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier). Κατά τη διαδικασία αυτή δύο ανακλώμενες δέσμες, συμβάλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής, με τη μελέτη των οποίων εξάγονται συμπεράσματα.



Εικόνα 27 : Σχηματική απεικόνιση του συμβολομέτρου

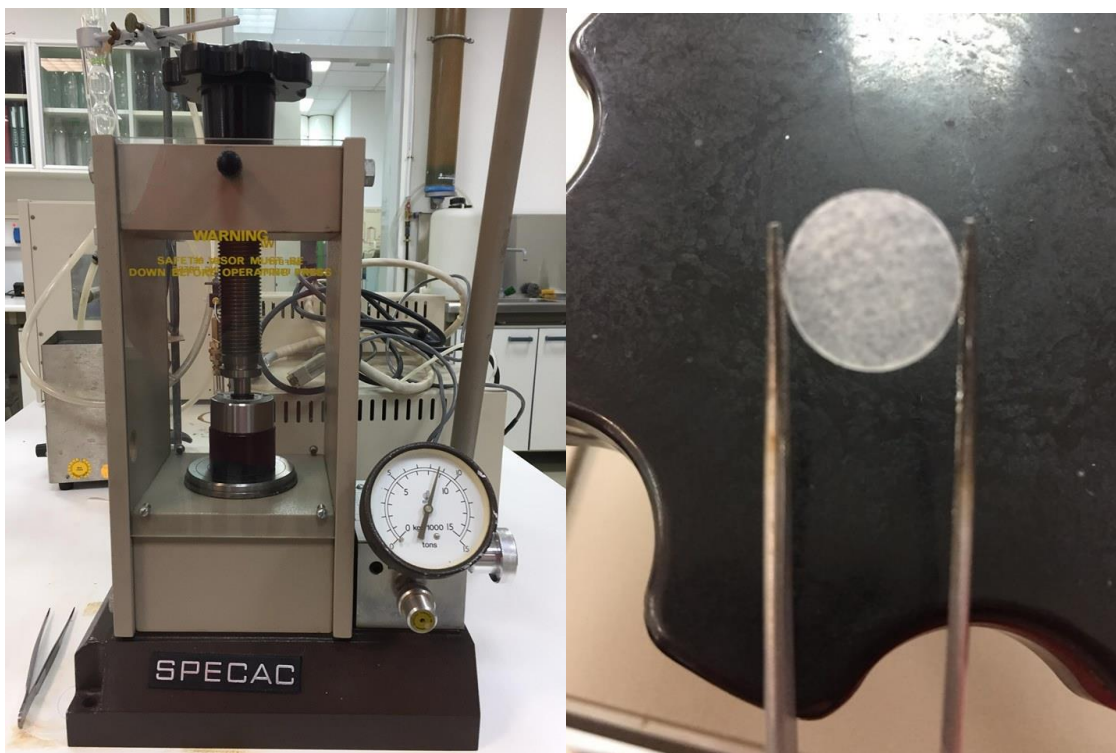
(πηγή: <https://chem.libretexts.org/>)

Επειδή κάθε διαφορετικό υλικό είναι ένας μοναδικός συνδυασμός ατόμων, δύο ενώσεις δεν παράγουν το ίδιο ακριβώς υπέρυθρο φάσμα. Επιπλέον, το μέγεθος των κορυφών στο φάσμα είναι μια άμεση ένδειξη της ποσότητας του υπάρχοντος υλικού. Η μέθοδος φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό άγνωστων υλικών, προσδιορίζοντας την ποιότητα ή τη συνοχή ενός δείγματος και την ποσότητα συστατικών σε ένα μείγμα. Η φασματοσκοπία απορρόφησης με υπεριώδη και ορατή (UV-Vis) είναι η μέτρηση της εξασθένησης μίας φωτεινής δέσμης αφού περάσει από ένα δείγμα ή μετά

από ανάκλαση από μια επιφάνεια δείγματος. Στην περίπτωση του φάσματος UV-Vis, λαμβάνεται υπόψη μόνο η απορρόφηση του φωτός από την ύλη, επειδή το φως είναι μια μορφή ενέργειας και η απορρόφηση του φωτός από την ύλη προκαλεί την αύξηση του ενεργειακού περιεχομένου των μορίων ή των ατόμων. Όταν το φως διέρχεται από την ένωση, η ενέργεια από το φως χρησιμοποιείται για την προώθηση ενός ηλεκτρονίου από μια τροχιά σύνδεσης ή μη σύνδεσης σε ένα από τα κενά αντιδραστικά τροχιακά που είναι η αιτία να εμφανιστούν οι κορυφές των ενώσεων. (Ashraf). Η ανάλυση των χαρακτηριστικών ομάδων στην επιφάνεια των δειγμάτων του HDPE πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου υπερύθρου (Frontier FT-IR spectrometer, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), ενώ τα φάσματα ελήφθησαν και υπέστησαν επεξεργασία με το λογισμικό Spectrum της Perkin Elmer. Η ανάλυση σάρωσης (scan resolution) ορίστηκε στα  $4\text{cm}^{-1}$  για τιμές απορρόφησης από  $4000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ .

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανάλυση υποβάθρου (background scan) για τον ατμοσφαιρικό αέρα και οι τιμές των κορυφών των δειγμάτων λαμβάνονταν μετά από διόρθωση με βάση τις κορυφές του αέρα (baseline correction). Λόγω της μορφής των δειγμάτων, δεν ήταν δυνατή η άμεση εισαγωγή τους στο όργανο. Για το λόγο αυτό τα δείγματα ενσωματώνονταν σε δισκία από βρωμιούχο κάλλιο (KBr) πριν πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις. Το KBr λειτουργεί σαν ένα μη απορροφητικό πρότυπο αναφοράς, ενώ πραγματοποιείται διόρθωση για την παρουσία του από το όργανο, πριν από την εμφάνιση των φασμάτων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση υποβάθρου (background scan), για τον ατμοσφαιρικό αέρα, και έπειτα για τα δείγματα ώστε οι τιμές των κορυφών αυτών να ληφθούν με βάση τις κορυφές του αέρα (baseline correction). Πριν από την προετοιμασία κάθε δείγματος, ο εξοπλισμός καθαριζόταν με ακετόνη, για την απομάκρυνση τυχόν ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Με μια μικρή σπάτουλα εργαστηρίου, ένα τμήμα του δείγματος (3-5 mg) τοποθετούνταν στο γουδί και στη συνέχεια προστίθετο ποσότητα βρωμιούχου καλλίου (KBr) τέτοια, ώστε να είναι αρκετή η παρασκευή 2-3 δισκίων πάχους 1-2 mm και διαμέτρου περίπου 1 cm. Με το γουδοχέρι πραγματοποιούνταν ισχυρή ανάμιξη, για τη θραύση και την ομογενοποίηση του μίγματος. Η ανάμιξη αυτή έπρεπε να λαμβάνει χώρα σε μικρό χρονικό διάστημα, γιατί το KBr αποτελεί υγροσκοπική ουσία και έχει την τάση να απορροφά νερό από την ατμόσφαιρα και να αλλοιώνεται, προκαλώντας στη συνέχεια σφάλματα στην ανάλυση. Μέρος του μίγματος τοποθετούνταν μεταξύ μεταλλικών κυλίνδρων καθαρισμένων με ακετόνη στο εσωτερικό αντλιοπρέσας. Το δείγμα στερεώνονταν με τη βοήθεια βαλβίδας στο πλάι της πρέσας και η αντλία ενεργοποιούνταν για 2 min, ώστε να επιτευχθούν συνθήκες κενού. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, με τη βοήθεια μοχλού ασκούσαν πίεση ίση με 10 ton, που ελέγχονταν από μανόμετρο. Η αντλία λειτουργούσε υπό κενό και πίεση για 3 min και στη συνέχεια απενεργοποιούνταν και το δείγμα απομακρύνονταν. Το δείγμα αφαιρούνταν από την αντλιοπρέσα και είχε τη μορφή διάφανου δισκίου, ενδεχομένως με μικρές άσπρες κηλίδες, σε περιπτώσεις που το μίγμα δεν είχε ομογενοποιηθεί πολύ καλά. Αν το δισκίο είχε ορατές ατέλειες, προετοιμαζόταν ξανά. Τα δισκία τοποθετούνταν στο ειδικό εξάρτημα και εισάγονταν στο όργανο για την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

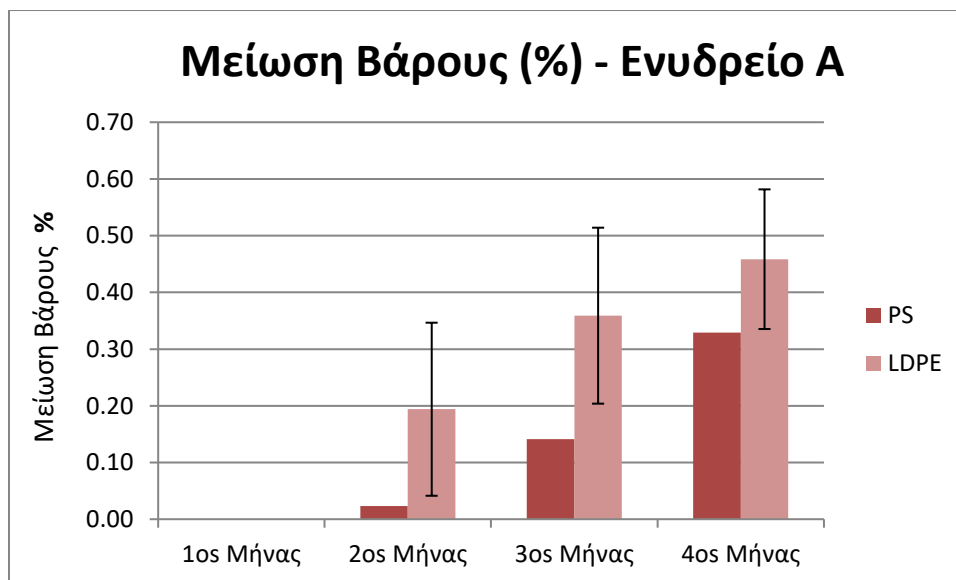


Εικόνα 28 : Αντλιοπρεσα κατασκευής δισκίου KBr

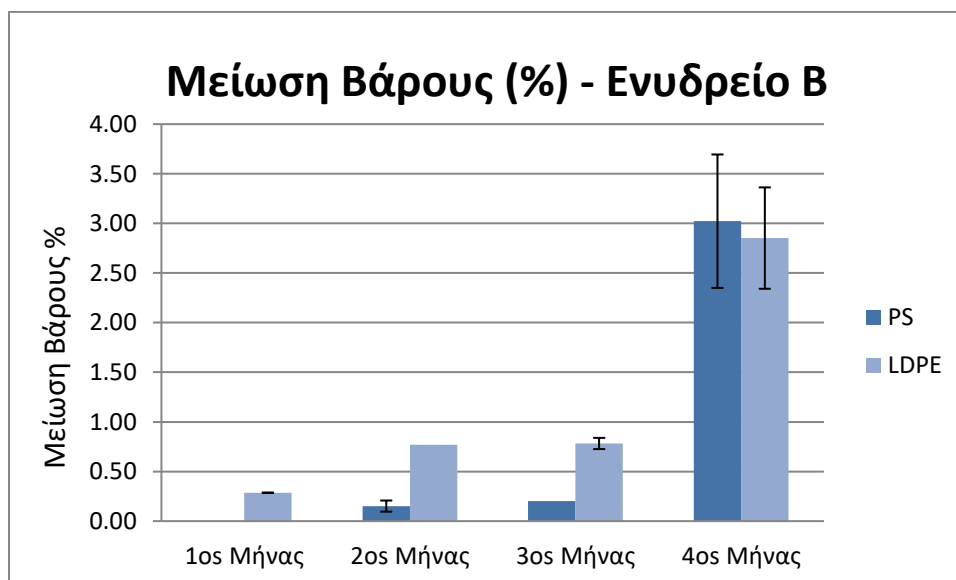
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 ΒΑΡΟΣ

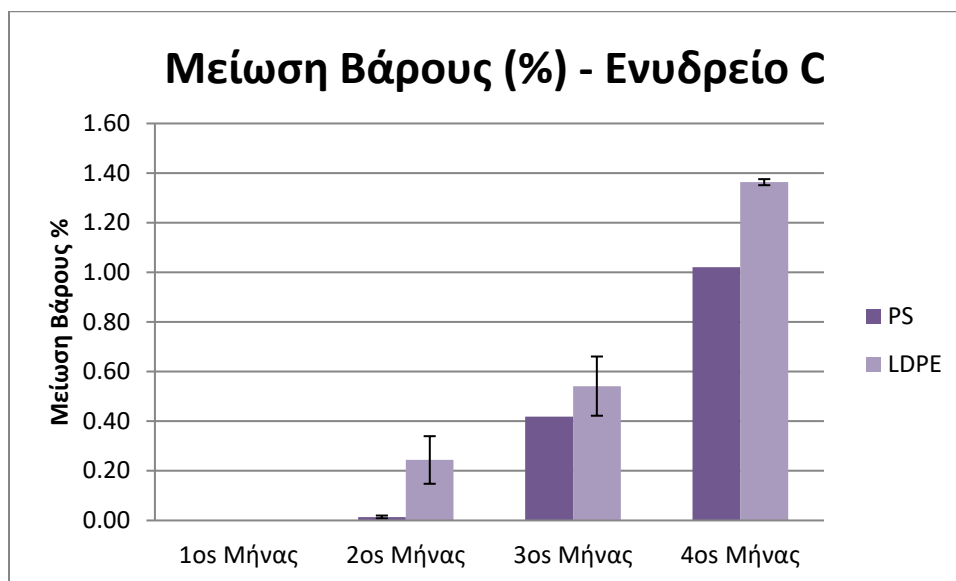
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μείωσης του βάρους για τα δύο είδη πλαστικών, συγκριτικά, για καθένα από τα τέσσερα ενυδρεία.



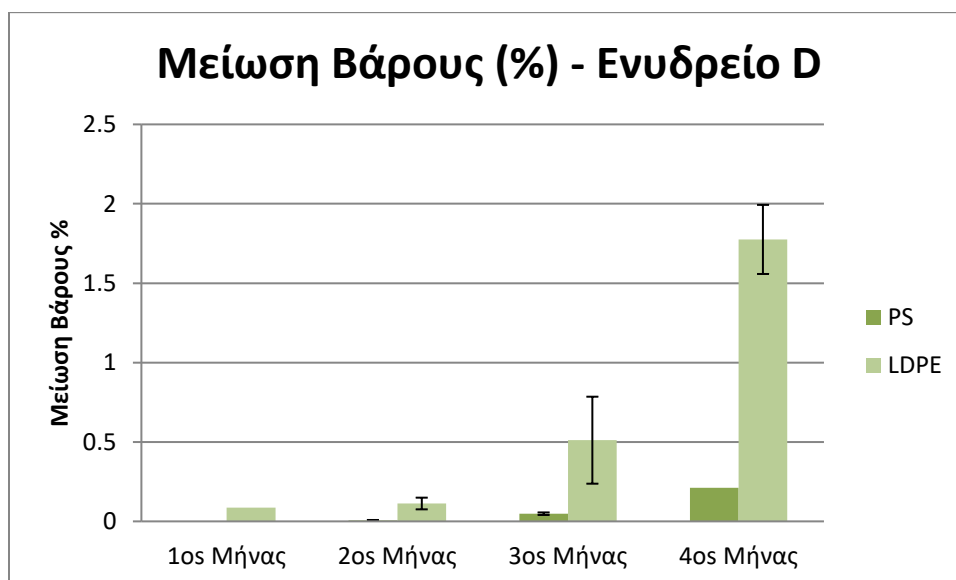
Διάγραμμα 1 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο Α.



Διάγραμμα 2 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο B.



Διάγραμμα 3 : Μείωση βάρους PS και LDPE ανά μήνα, ενυδρείο C.



Διάγραμμα 4 : Μείωση βάρους PS και LDPE φιλμ ανά μήνα στο ενυδρείο D.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, σε κανένα από τα τέσσερα ενυδρεία τον πρώτο μήνα δεν έχει παρουσιαστεί μείωση βάρους των PS φιλμ. Αντίθετα το βάρος των LDPE

φιλμ παρόλο που στα ενυδρεία A και C δεν παρουσιάζει μείωση, στα ενυδρεία B και D παρουσιάζει μείωση της τάξης του 0,29 % και 0,07 %. Φτάνοντας, ωστόσο, στον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρήθηκε μείωση βάρους των PS φιλμ που ισούταν με 0,33% για το ενυδρείο A, 3,02% για το ενυδρείο B, 1,02% για το ενυδρείο C και τέλος 0,21 % για το ενυδρείο D. Ενώ αντίθετα, όσον αφορά τα LDPE φιλμ, το ποσοστό μείωσης τους βάρους για τον τέταρτο μήνα παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά που εκτιμώνται ως 0,46% για το ενυδρείο A, 2,85% για το ενυδρείο B, 1,36% για το ενυδρείο C, ενώ τέλος για το ενυδρείο D το ποσοστό μετρήθηκε 1,78 %. Είναι, δε, εμφανές πως και για τα δύο είδη πλαστικού σε όλα τα ενυδρεία υπάρχει αύξηση του ποσοστού μείωσης του βάρους.

Σχετικές έρευνες που έγιναν από τους Hadad *et al.* (2005) και Duddu *et al.* (2015) έδειξαν πως τέσσερα βακτηριακά στελέχη που σχετίζονται με τα γένη *Bacillus* και *Prolinoborus* ήταν ικανά να χρησιμοποιούν το LDPE ως πηγή άνθρακα. Απομονώθηκαν στελέχη, τα οποία διαπιστώθηκε πως είναι ικανά για αποδόμηση του LDPE, και αφού επωάστηκαν 90 ημέρες, υπολογίστηκε η ποσοστιαία απώλεια βάρους του πλαστικού.

Για τα *Bacillus krulwichiae*, *Bacillus pseudofirmus*, *Prolinoborus asciculus* και *Bacillus sp.*, τα ποσοστά % απώλειας βάρους προσδιορίστηκαν αντίστοιχα σε  $9,9 \pm 0,05\%$ ,  $8,3 \pm 0,1\%$ ,  $5,1 \pm 0,2\%$  και  $6,3 \pm 0,2\%$ .

Σε άλλες έρευνες οι Tribedi και Sil (2012) και Kyawet *et al.* (2012) έδειξαν ότι τα θερμόφιλα βακτήρια *Brevibacillus borstelensis* και *Streptomyces coelicoflavus* μπορούν να αποδομήσουν το LDPE το οποίο έχει απώλεια βάρους 11% και 30% σε μόλις 30 ημέρες και 120 ημέρες, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης των 90 ημερών, το υψηλότερο ποσοστό βιοαποδόμησης του πολυαιθυλενίου που παρατηρήθηκε ήταν αυτό του *Bacillus krulwichiae* για τον οποίο μετρήθηκε απώλεια βάρους  $9,9 \pm 0,05\%$ .

Το επίπεδο βιοαποδόμησης από αυτό το στέλεχος ήταν υψηλότερο από προηγούμενες παρατηρήσεις κατά τις οποίες υπολογίστηκε πως σε αντίστοιχη χρονική περίοδο η απώλεια βάρους ήταν 5% σε LDPE που υποβλήθηκε σε διαδικασία αποδόμησης με *Pseudomonas sp* και 9% σε LDPE που υποβλήθηκε σε διαδικασία αποδόμησης με *Pseudomonas putida*.

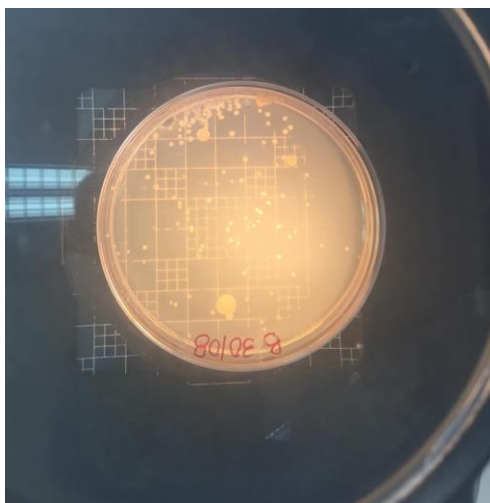
Σε άλλη παρόμοια έρευνα μελετήθηκαν εξήντα θαλάσσια βακτηρικά στελέχη που απομονώθηκαν από πελαγικά ύδατα και εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αποδομούν χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο. Από αυτά, τρία βρέθηκαν ικανά να αναπτυχθούν σε μέσο που περιείχε πολυαιθυλένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τα βακτήρια αυτά ταυτοποιήθηκαν ως *Kocuria palustris* M16, *Bacillus pumilus* M27 και *Bacillus subtilis* H1584. Η απώλεια βάρους πολυαιθυλενίου ήταν αντίστοιχα 1%, 1,5% και 1,75% μετά από επώαση 30 ημερών. (Kumar Harshvardhanab *et al.* 2013)

Επίσης οι Mor και Sivan (2008) μελέτησαν τη δυνατότητα του *Rhodococcus ruber* C208 να βιοαποδόμηση ει την πολυστερίνη σε σχέση με την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται και να σχηματίζει αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχουν πολυστυρενίο ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αντίστοιχα σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς πολυστυρένιο. Σε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης της αποδόμησης, το *Rhodococcus ruber* C208 καλλιεργήθηκε σε νιφάδες πολυστυρενίου για 4 και 8 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε μείωση στο βάρος πολυστυρενίου κατά 0,5% και 0,8% αντίστοιχα. Η σχέση της αποδόμησης με τη θερμοκρασία μελετήθηκε από τον Müller (2005) ο οποίος παρατήρησε έντονη εξάρτηση. Στην

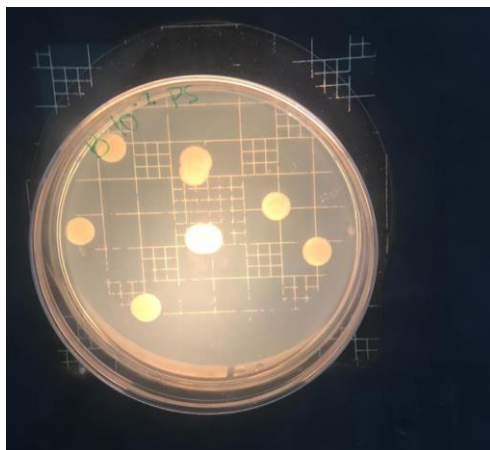
έρευνα μελέτησε συνθήκες βιοαποδόμησης σε νερό από καθαρές πηγές. Στις περισσότερες περιπτώσεις σημειώθηκαν μεγαλύτερες απώλειες βάρους και μέγιστη αποδόμηση στους 40 ° C. Το βάρος μπορεί να είναι ένας παράγοντας βιοαποδόμησης αλλά στην περίπτωση μας δεν ήταν καθοριστικός, γι' αυτό χρειάστηκαν περαιτέρω αναλύσεις.

### 3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.1 ο μικροβιακός πληθυσμός εκτιμήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων για την επιφάνεια του πλαστικού. Στον εκάστοτε μήνα της δειγματοληψίας, στα τρυβλία παρατηρήθηκαν μικρές κυκλικές αποικίες όπως παρουσιάζεται και στις παρακάτω εικόνες (29 και 30).

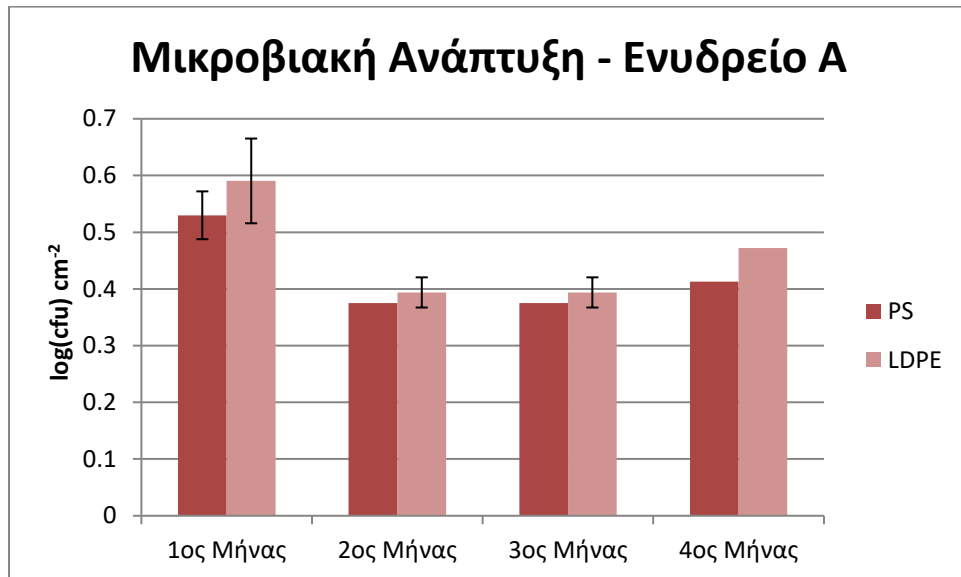


Εικόνα 29 : Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση  $10^{-1}$ .

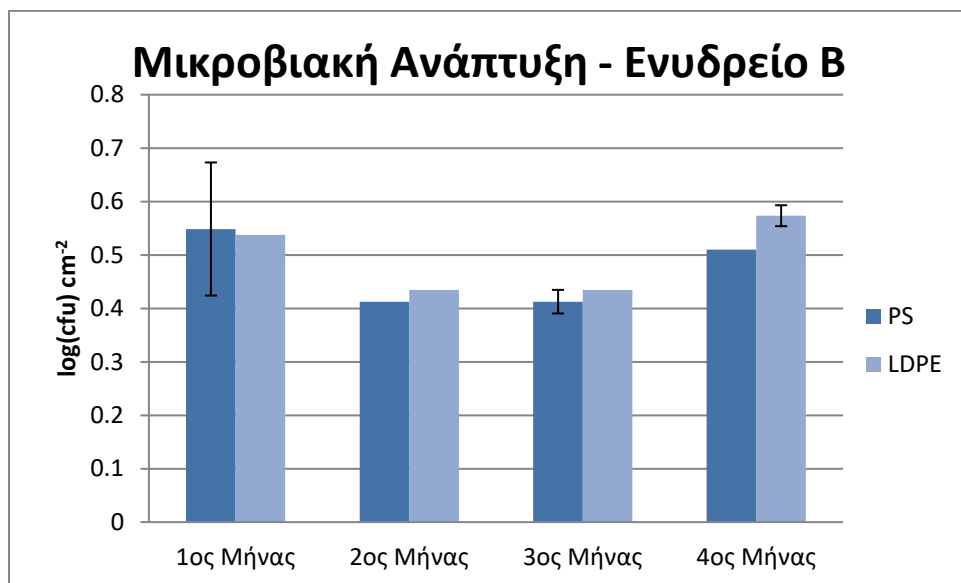


Εικόνα 30 : Τρυβλίο που αντιστοιχεί σε αραιώση  $10^{-2}$ .

Ο αριθμός των αποικιών που μετρήθηκε κάθε μήνα εκφράστηκε σε μονάδες CFU cm<sup>-2</sup> και έτσι τα αποτελέσματα συγκεντρωτικά για τα τέσσερα ενυδρεία παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

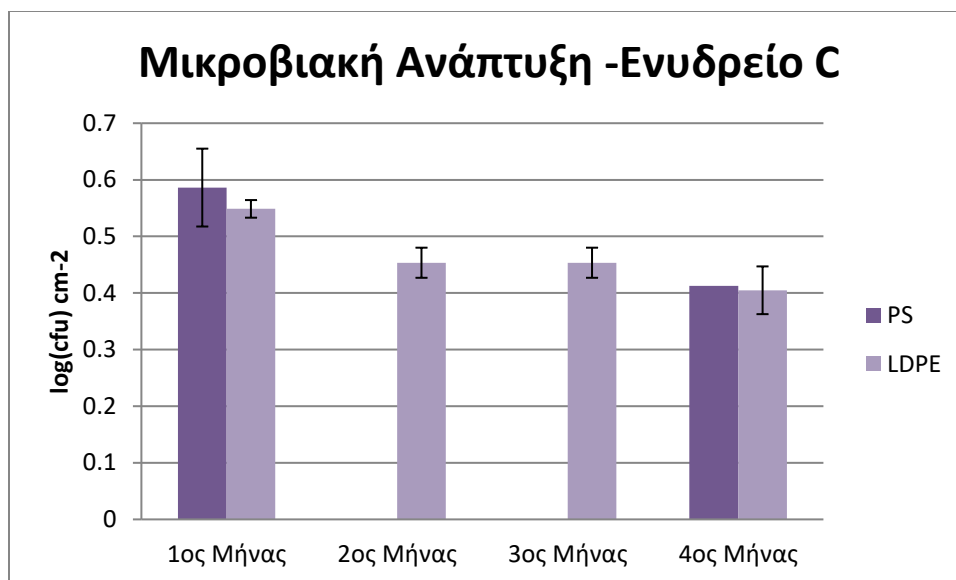


Διάγραμμα 5 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο Α

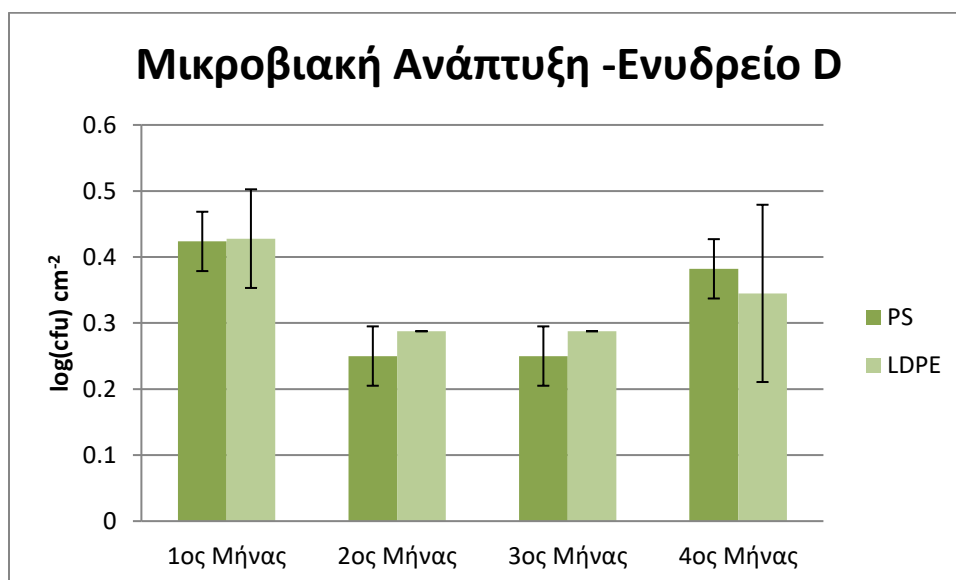


Διάγραμμα 6 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο Β





*Διάγραμμα 7 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο C*



*Διάγραμμα 8 : Αριθμός αποικιών στο ενυδρείο D.*

Παρατηρώντας τα διαγράμματα, όλα τα ενυδρεία συμφωνούν ότι τον δεύτερο και τρίτο μήνα παρουσιάζεται μείωση των πληθυσμών η οποία σε όλες τις περιπτώσεις, με εξαίρεση το ενυδρείο C, σχεδόν αποκαθίσταται. Αυτό, πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι ο χώρος που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος είναι ένα θερμοκήπιο, στο οποίο η θερμοκρασία ήταν ιδιαίτερα αυξημένη κατά τους μήνες διεξαγωγής, ιδιαίτερα Ιούλιο και Αύγουστο, τους κατά τεκμήριο θερμότερους μήνες του καλοκαιριού, αλλά και στις ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούσαν στα ενυδρεία. για αυτό και μετά την προσθήκη αζώτου και φωσφόρου στα μέσα του 3<sup>ου</sup> μήνα παρουσιάζεται σταθεροποίηση του αριθμού αποικιών σε όλα τα ενυδρεία και τελικά ανάκαμψη τον 4<sup>ο</sup> μήνα στο A,B και D, ενώ στο C συνεχίστηκε η μείωση. Συγκεκριμένα κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα δειγματοληψίας και τα τέσσερα ενυδρεία παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση από την αρχική  $10^4$ . Για το ενυδρείο A οι τιμές των μικροβιακών πληθυσμών εκτιμήθηκαν  $2 \cdot 10^4$  CFU/ml και  $8 \cdot 10^4$  CFU/ml , για το PS και το LDPE αντίστοιχως. Το B ενυδρείο παρουσίασε τιμές  $2,5 \cdot 10^4$  CFU/ml και  $10^4$  CFU/ml για PS και LDPE και C, για PS και PE,  $7 \cdot 10^4$  CFU/ml και  $2,5 \cdot 10^4$  CFU/ml. Ενώ, τέλος, το ενυδρείο D παρουσίασε τιμές  $2,5 \cdot 10^4$  CFU/ml και  $4 \cdot 10^4$  CFU/ml για PS και LDPE αντίστοιχα. Κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα η αύξηση των μικροβιακών πληθυσμών ήταν παράλληλη με τη μείωση βάρους και των δύο ειδών πλαστικών φιλμ, σε όλα τα ενυδρεία που κατά τον ίδιο μήνα παρουσίασαν τον μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης.

### 3.2.1 Ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού σε φιλμ LDPE

Τα αποτελέσματα ερευνών έδειξαν πως ο γρήγορος αποικισμός του πολυαιθυλενίου προκύπτει κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο έως έξι ημερών επώασης (Gilan et al., 2004; Balasubramanian et al., 2010).

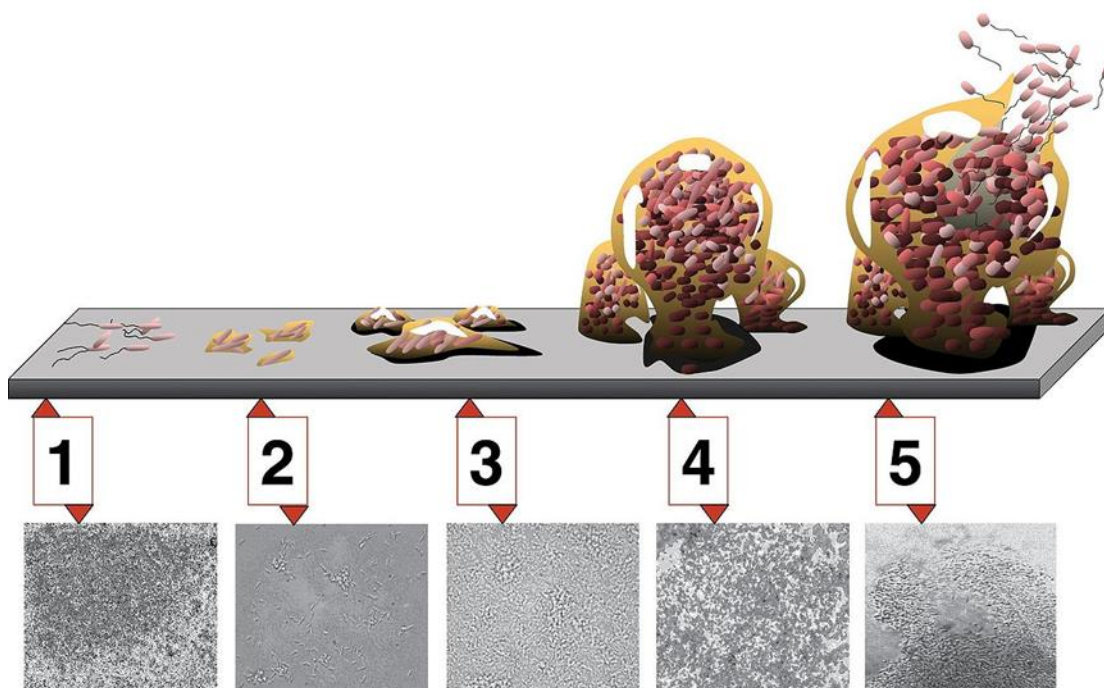
Η Μείωση της βακτηριακής βιομάζας δείχνει την εξάντληση του ορυκτελαίου ως πηγή άνθρακα. Μόλις, δηλαδή καταναλώθηκε το πετρελαιοειδές, αναπτύχθηκε στο πολυαιθυλένιο ένας χαμηλής πυκνότητας πληθυσμός κυττάρων ικανών να το χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των Hadad κ.ά. (2005) σχετικά με τη βιοαποδόμηση του πολυαιθυλενίου από το θερμοφίλο βακτήριο, *Brevibacillus borstelensis*. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, ο βακτηριακός αποικισμός του πολυαιθυλενίου, που μετρήθηκε ως εκχυλίσιμη πρωτεΐνη από το *B. borstelensis*, αρχικά αυξήθηκε, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε μια σταδιακή μείωση που οδήγησε στην απουσία εκχυλίσιμης πρωτεΐνης μέχρι την 20ή ημέρα επώασης. Παρατηρήθηκε πως τελικά, αργά αλλά σταθερά αναπτύχθηκε στο πλαστικό ένας βακτηριακός πληθυσμός.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και μελέτη ανάπτυξης του *Rhodococcus ruber*, που χρησιμοποιούσε ως πηγή άνθρακα LDPE (Gilan et al. 2004).

### 3.3. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ

Διάφορες συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για να προστατευτούν δημιουργούν μια λεπτή επιφάνεια η οποία αποτελείται από κύτταρα που κολλούν μεταξύ τους και είναι γνωστή ως βιοφίλμ. Τα κύτταρα προσκολλώνται με τέτοιο τρόπο ώστε η επιφάνεια που δημιουργούν να αποτελείται από Εξωκυτταρικές Πολυμερείς Ουσίες, (Extracellular Polymeric Substances) ή περισσότερο γνωστές ως EPS, όπως επίσης πολυσθενή κατιόντα, βιογενή και ανόργανα σωματίδια (Stoodley L, 2004).

Τα EPS όμως είναι τα κυρίως υπεύθυνα για τη δομική και λειτουργική ενότητα του . Το ποσοστό των EPS στα βιοφίλμ κυμαίνεται στα 50-90% της συνολικής οργανικής ύλης (Flemming, 2000).



Εικόνα 31 : Πέντε στάδια ανάπτυξης βιοφίλμ (πηγή: D. Davis et al. 2007 )

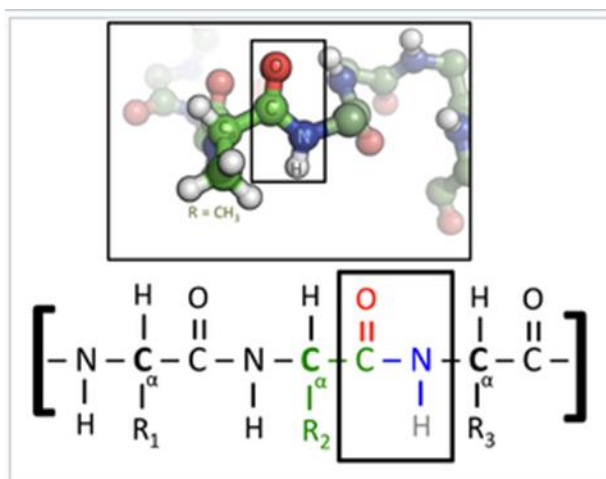
Όλα τα στάδια στην εικόνα 31 παρουσιάζονται στην ίδια κλίμακα και είναι κατά σειρά: (1) αρχική προσκόλληση, (2) Μη αναστρέψιμη προσκόλληση, (3) Ωρίμανση I, (4) Ωρίμανση II, και (5) Διασπορά. Κάθε στάδιο ανάπτυξης στο διάγραμμα συνδυάζεται με μια φωτομικρογραφία ενός αναπτυσσόμενου βιοφίλμ το *P. aeruginosa*.

Το βιοφίλμ είναι ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τα βακτήρια που επιτρέπει την πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά. Λειτουργεί επίσης ως άμυνα ενάντια σε διάφορους παράγοντες όπως θερμοκρασία, διατμητικές δυνάμεις, χημικές ουσίες, κ.λπ. Περισσότερο από το 99% της συνολικής μικροβιακής δραστηριότητας εμφανίζεται στο βιοφίλμ. Μπορεί έτσι να παίξει αποτελεσματικό ρόλο στη βιοαποδόμηση πολυσύνθετων συνθετικών πολυμερών όπως είναι τα πλαστικά. Ο σχηματισμός βιοφίλμ στις επιφάνειες των πλαστικών, επιτρέπει τη δημιουργία

προστατευόμενων μικροβιακών συγκεντρώσεων που αυξάνουν την επιβίωση της μικροβιακής κοινότητας σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να ενισχύεται και η διαδικασία της βιοαποδόμησης τους (Morohoshi et al 2018).

### 3.4. ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους, μακρομόρια. Ακόμη και σ' ένα απλό βακτηριακό κύτταρο εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες με την καθεμία εξ αυτών να έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου, είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων. Είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται από την ένωση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού.

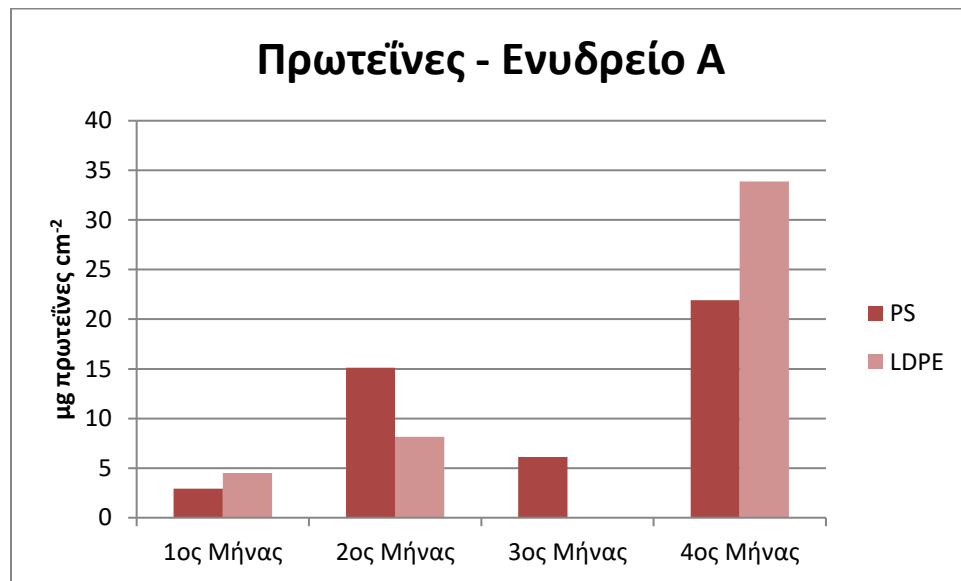


Εικόνα 32 : Αναπαράσταση πεπτιδικού δεσμού (πηγή: βικιπαίδεια)

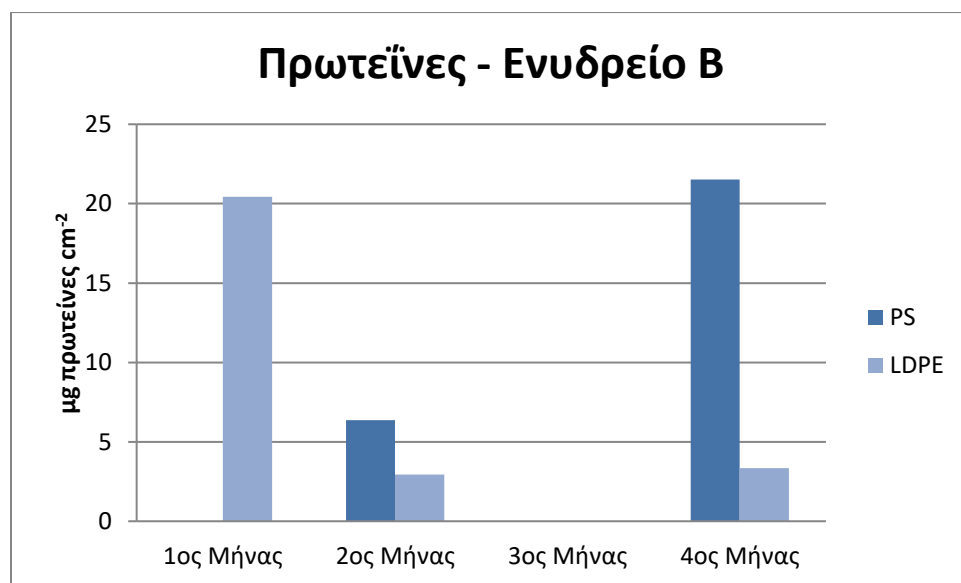
Ορισμένοι μικροοργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον ζουν πάνω ή σε στενή σύνδεση με επιφάνειες και σχηματίζουν βιοφίλμ. Οι ακριβείς συνθέσεις των μητρών βιοφίλμ διαφέρουν πολύ μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών και των συνθηκών ανάπτυξης κάτω από τις οποίες σχηματίζονται βιοφίλμ, αλλά γενικά αποτελούνται από εξωπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Τα πρωτεϊνικά συστατικά περιλαμβάνουν συγκολλητίνες κυτταρικής επιφάνειας, πρωτεϊνικές μονάδες flagella και pili, εκκρινόμενες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και

πρωτεΐνες κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (Jiunn et al 2015). Γενικά οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και το DNA είναι σημαντικοί παράγοντες για τον σχηματισμό του βιοφίλμ, τη σταθερότητα και τη λειτουργία του (Whitchurch et al. 2002).

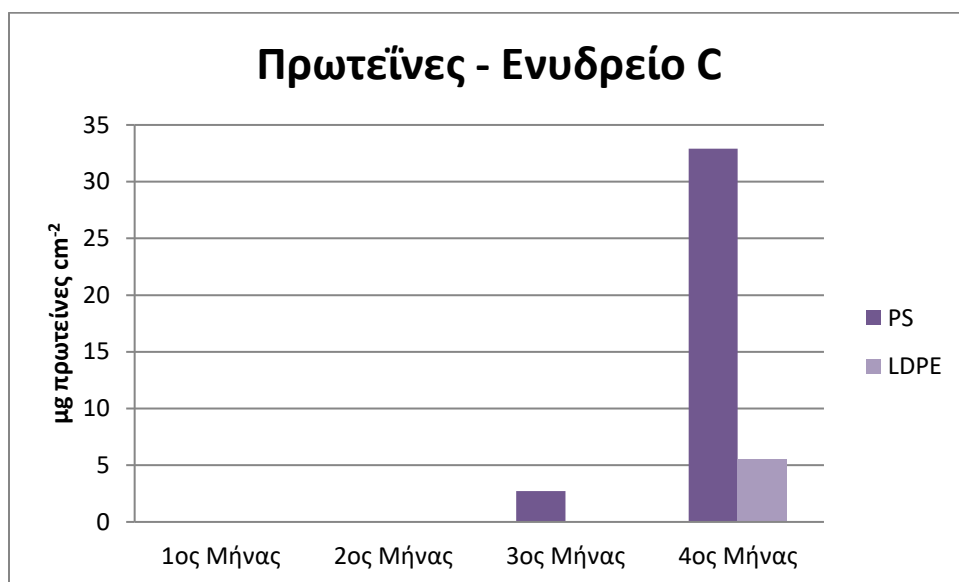
Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2.4.3 για την εκτίμηση των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry . Έτσι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ανά μονάδα  $\text{cm}^2$  για το PS και LDPE για τα τέσσερα διαφορετικά ενυδρεία παρουσιάζεται στα παρακάτω γραφήματα.



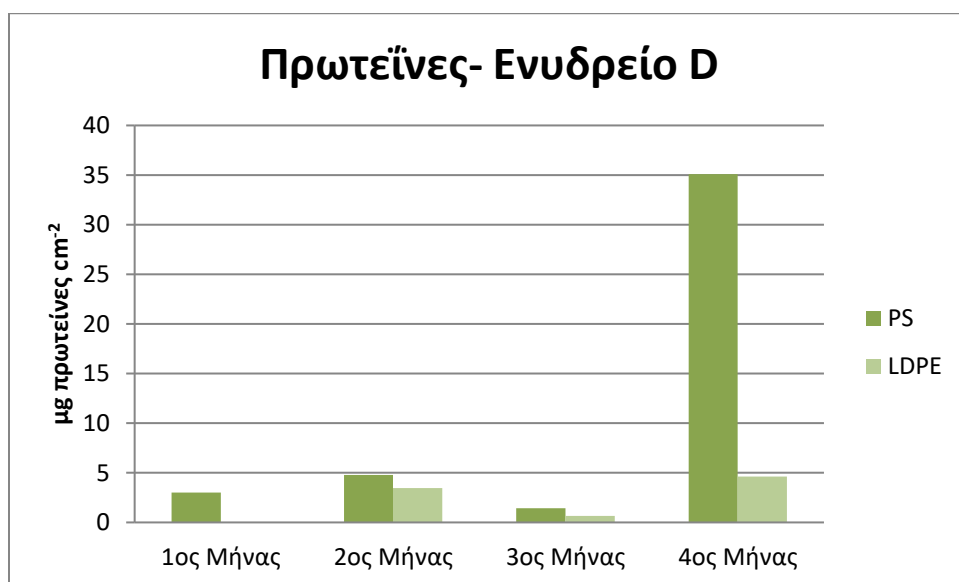
Διάγραμμα 9 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο Α



Διάγραμμα 10 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο Β



Διάγραμμα 11 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο C



Διάγραμμα 12 : Συγκέντρωση πρωτεϊνών στο ενυδρείο D

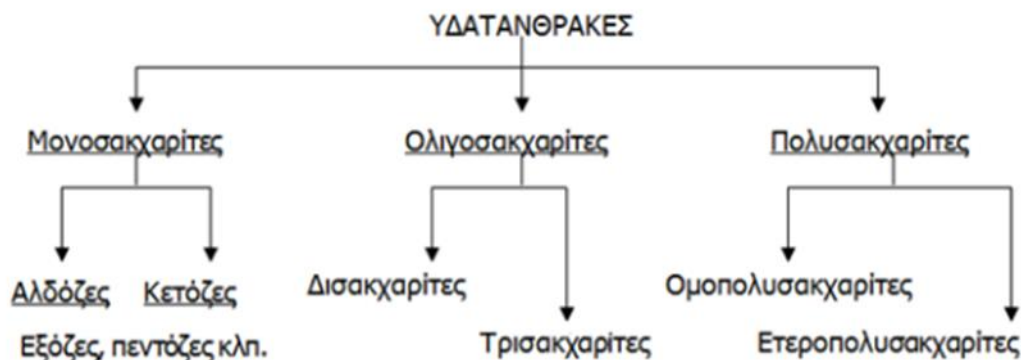
Είναι λοιπόν φανερό πως η συμπεριφορά των πρωτεΐνων είναι διαφορετική για τα τέσσερα ενυδρεία. Πιο αναλυτικά, λοιπόν, παρακολουθώντας το ενυδρείο Α, και για τα δύο είδη πλαστικών ο 1<sup>ος</sup> μήνας είχε την μικρότερη τιμή πρωτεϊνών με συγκέντρωση 2,94  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το PS και 4,50  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το LDPE, τιμή η οποία συνέχισε να αυξάνεται τον 2<sup>ο</sup> μήνα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε μία αισθητή μείωση τον 3<sup>ο</sup> μήνα της δειγματοληψίας, πιθανόν λόγω των ολιγοτροφικών συνθηκών που επικρατούσαν στα ενυδρεία, φτάνοντας τελικώς στον 4<sup>ο</sup> και τελευταίο μήνα να έχουμε την υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης για τις πρωτεΐνες που αντιστοιχεί σε 21,90  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το PS και 33,87  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το LDPE. Προχωρώντας στο ενυδρείο Β οι συγκεντρώσεις κινούνται λίγο διαφορετικά σε σχέση με το ενυδρείο Α, καθώς τα δύο είδη πλαστικών φαίνεται να συμπεριφέρονται αντιστρόφως ανάλογα. Συγκεκριμένα, το PS ξεκινάει με μηδενική συγκέντρωση, έχοντας μια αύξηση και μείωση στον 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> μήνα αντιστοίχα, καταλήγοντας στον 4<sup>ο</sup> μήνα να λαμβάνει τη μέγιστη συγκέντρωση πρωτεϊνών με τιμή 21,52  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Αντίθετα, το LDPE ξεκινάει με μία αρκετά μεγάλη τιμή συγκέντρωσης, 20,44  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Στη συνέχεια, μειώνεται τον 2<sup>ο</sup> μήνα μηδενίζοντας τη συγκέντρωση τον 3<sup>ο</sup> μήνα και επανέρχεται με μία μικρότερη τιμή ίση με 3,34  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Τα πράγματα φαίνεται να είναι λίγο διαφορετικά για το ενυδρείο C, αφού τον 1<sup>ο</sup> και τον 2<sup>ο</sup> μήνα και τα δύο είδη πλαστικού παρουσίασαν μηδενική συγκέντρωση πρωτεϊνών, η οποία συνεχίστηκε και τον 3<sup>ο</sup> μήνα για το πλαστικό LDPE, σε αντίθεση με το PS που εμφάνισε τιμή συγκέντρωσης 2,73  $\mu\text{g cm}^{-2}$  το μήνα αυτό. Τελικά, τον 4<sup>ο</sup> μήνα οι τελικές τιμές των δύο εκτιμήθηκαν 32,89  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το PS και 5,54  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το LDPE. Το ενυδρείο D, τέλος, ξεκίνησε με μηδενική συγκέντρωση για το LDPE ενώ εκτιμήθηκε 3  $\mu\text{g cm}^{-2}$  η συγκέντρωση του PS. Τους επόμενους μήνες ακολούθησε παρόμοιο μοτίβο με το ενυδρείο Α φτάνοντας δηλαδή στον 4<sup>ο</sup> μήνα να πετύχει τις μέγιστες συγκεντρώσεις των PS και LDPE, ίσες με 35,08  $\mu\text{g cm}^{-2}$  και 4,61  $\mu\text{g cm}^{-2}$  αντίστοιχα.

### 3.5 ΟΛΙΚΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Οι υδατάνθρακες είναι πολυϋδρόξυ-αλδεΐδες (αλδόζες) ή πολυ-ϋδρόξυκετόνες (κετόζες) και πολλές ενώσεις έχουν τον εμπειρικό τύπο  $\text{Cx}(\text{H}_2\text{O})_y$  (Avenas,2012). Πήραν το όνομα τους από την αναλογία ατόμων υδρογόνου-οξυγόνου που είναι 2:1, δηλαδή ενώσεις του άνθρακα με το νερό. (EPNOE

Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμη και γλυκίδια, αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Έτσι μερικοί έχουν μοριακά βάρη μικρότερα του 100 g/mol, ενώ άλλοι είναι πραγματικά μακρομόρια, με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες g/mol

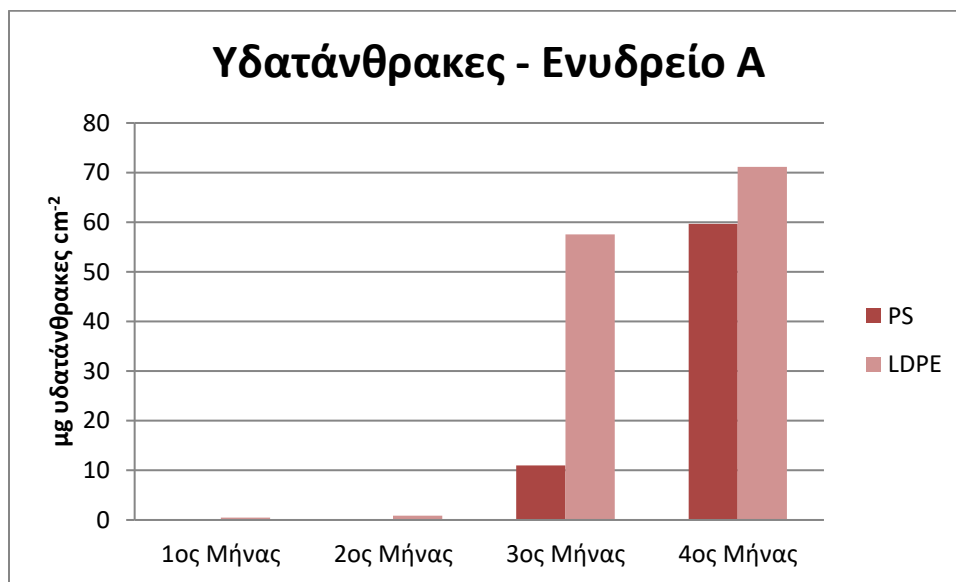
Οι υδατάνθρακες διακρίνονται σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα



Εικόνα 33 : Διάγραμμα διάκρισης υδρογονανθράκων (πηγή: <https://repository.kallipos.gr/>)

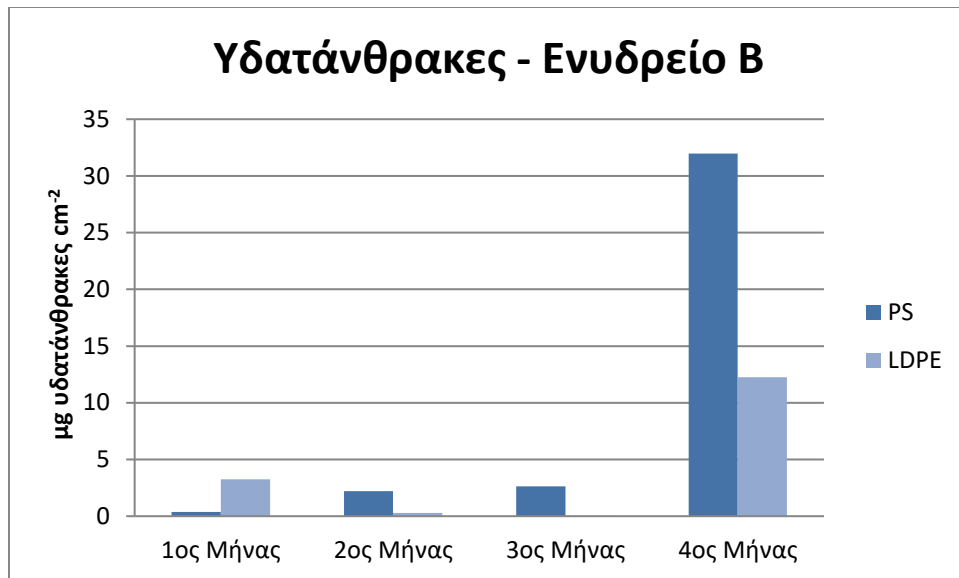
Οι υδατάνθρακες εκτελούν πολυάριθμους ρόλους σε ζωντανούς οργανισμούς, ιδιαίτερα στις βιολογικές διεργασίες. Χρησιμοποιούνται για αποθήκευση ενέργειας (π.χ. άμυλο και γλυκογόνο ) και ως δομικά συστατικά (π.χ. κυτταρίνη σε φυτά και χιτίνη στα αρθρόποδα) (Solomon EP, et al 2004).

Όπως προαναφέρθηκε 2.4.5 για τον υπολογισμό των ολικών υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανθρόνης. Η περιεκτικότητα του βιοφίλμ στην επιφάνεια των πλαστικών, σε υδατάνθρακες εκτιμήθηκε σε μονάδες  $\mu\text{g cm}^{-2}$  και η διακύμανση τους κατά τη διάρκεια των τεσσάρων μηνών στα ενυδρεία αποτυπώνεται παρακάτω:

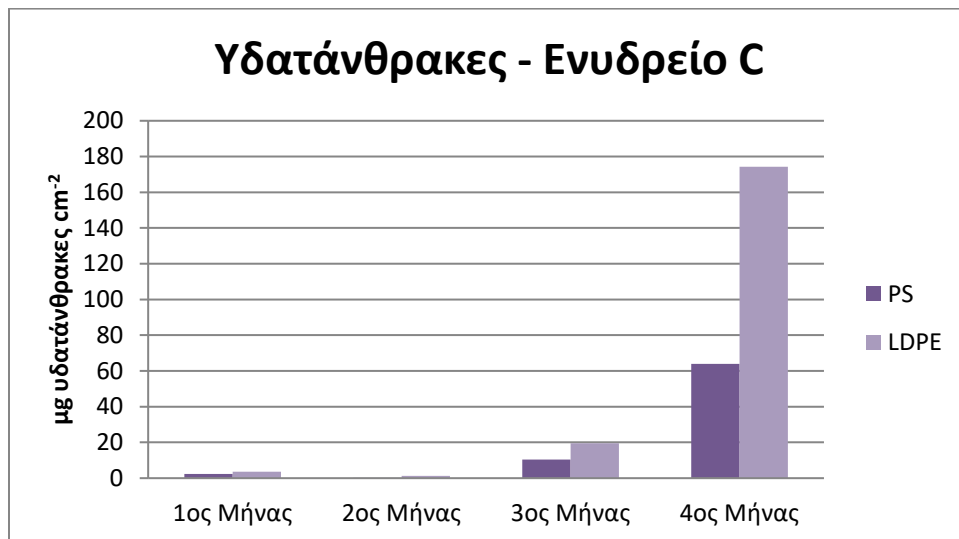


Διάγραμμα 13 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο Α

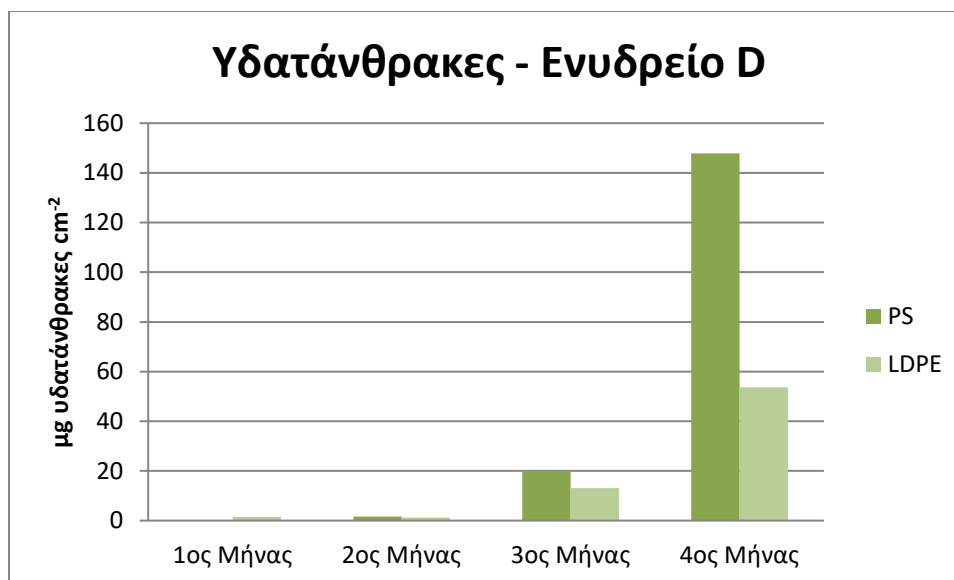




Διάγραμμα 14 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο Β



Διάγραμμα 15 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο C



*Διάγραμμα 16 : Συγκέντρωση υδατανθράκων στο ενυδρείο D*

Είναι εμφανές πως τα ενυδρεία A και D παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, αφού και τα δύο ξεκινούν με σχεδόν μηδενικές τιμές καταλήγοντας να πετυχαίνουν μέγιστες συγκεντρώσεις στον 4<sup>ο</sup> μήνα. Πιο αναλυτικά, για το ενυδρείο A οι αρχικές συγκεντρώσεις διαμορφώθηκαν ως μηδενική για το PS και ως 0,48  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το LDPE ενώ για το ενυδρείο D, 0,08  $\mu\text{g cm}^{-2}$  και 1,49  $\mu\text{g cm}^{-2}$  αντίστοιχα. Και στα δύο ενυδρεία παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των υδατανθράκων φτάνοντας έτσι όπως προαναφέρθηκε οι συγκεντρώσεις να πάρουν τιμή, για το ενυδρείο A 59,66  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το PS και 71,15  $\mu\text{g cm}^{-2}$  για το LDPE και ομοίως για το ενυδρείο D 147,87  $\mu\text{g cm}^{-2}$  και 53,69  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Σε ότι αφορά το ενυδρείο B, ενώ το PS παρουσιάζει αυξητικό μοτίβο με αρχική συγκέντρωση 0,38  $\mu\text{g cm}^{-2}$  και πετυχαίνοντας τελική 31,97  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , το ίδιο δεν ισχύει και στην περίπτωση του LDPE, αφού ξεκινώντας από 3,69  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , τον 2<sup>ο</sup> μήνα παρουσίασε μια μείωση η οποία σταδιακά τον 3<sup>ο</sup> μήνα αποκαταστάθηκε φτάνοντας τελική συγκέντρωση 12,26  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Το ίδιο συνέβη, στο ενυδρείο C, που αυτή τη φορά ισχύει και για τα δύο είδη πλαστικού. Συγκεκριμένα το PS από 2,36  $\mu\text{g cm}^{-2}$  κατέληξε σε τελική τιμή 63,92  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , ενώ το LDPE από 3,69  $\mu\text{g cm}^{-2}$  άγγιξε την τιμή των 174,29  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

Η αποδόμηση του πολυμερούς συνδέεται με αρκετές φυσικές και χημικές διεργασίες που οδηγούν μόνο σε μικρές δομικές αλλαγές αλλά σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας του υλικού (Sudhakaret al. 2008). Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα εξω-ένζυμα για να διασπασούν μεγάλα και σύνθετα πολυμερή σε μικρότερες αλυσίδες ολιγομερών, διμερή ή μονομερή με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων, όπως είναι αφυδρογενάσες, διοξυγενάση και μονοοξυγενάση. Αυτά τα μικρότερα μόρια μπορούν στη συνέχεια να απορροφηθούν από την ημιδιαπερατή μεμβράνη μικροβίων και να χρησιμοποιηθεί ως άνθρακας και πηγή ενέργειας (Singh et al., 2016). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αποδεικνύουν την αξιοσημείωτη ικανότητα των στελεχών του γένους *Bacillus* να χρησιμοποιούν το LDPE ως πηγή άνθρακα.

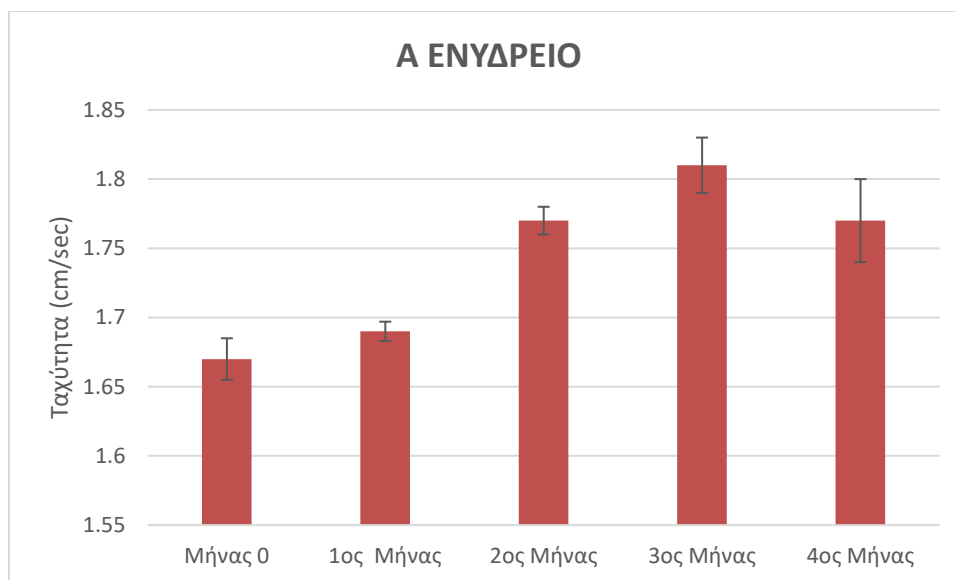
Σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή προσαρμογή διαδραματίζουν τα EPS, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που επιτρέπει τη διατήρησή τους. Εξίσου σημαντικός ο ρόλος των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων που βοηθούν στη δομή και στη διατήρηση του βιοφίλμ, το οποίο με τη σειρά του βοηθά στο σχηματισμό σταθερών μικροβιακών κοινοτήτων, επιτρέπει την ανταλλαγή γονιδίων, αποθηκεύει θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον του και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικές ουσίες και αποξήρανση (Mohan 2010).

Οι Matthyse et al. (2008) σε μελέτη τους διαπίστωσαν πως τα EPS διαδραματίζουν έναν ακόμη σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια των πλαστικών και μετέπειτα στον σχηματισμό του βιοφίλμ. Συγκεκριμένα βρήκαν ότι κάποιοι 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.

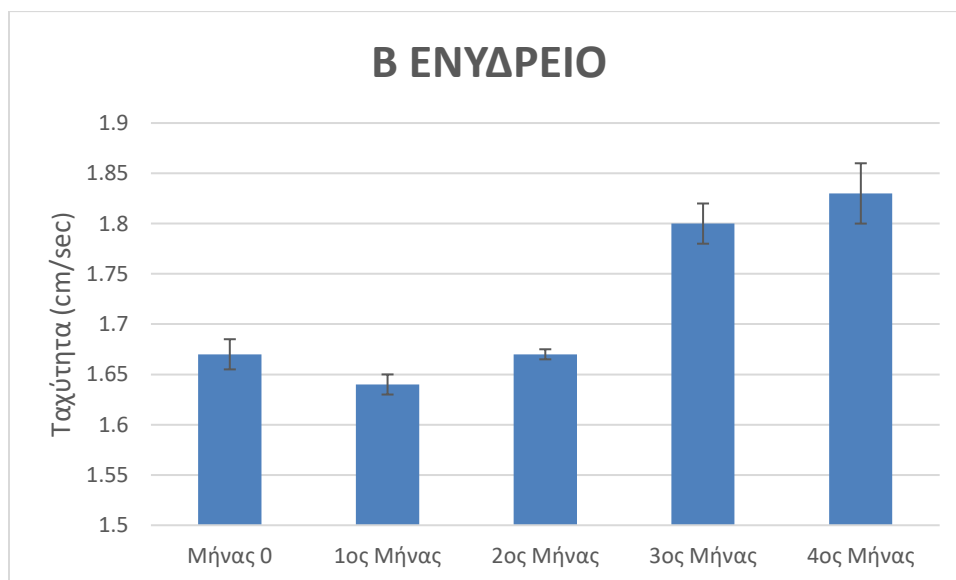
Επίσης σε έρευνά του ο Sutherland (2001) διαπίστωσε ότι η παραγωγή των EPS επηρεάζεται από την κατάσταση των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης. Συγκεκριμένα η περίσσεια του διαθέσιμου άνθρακα και ο περιορισμός του αζώτου, του καλίου ή του φωσφορικού άλατος ενισχύουν τη σύνθεση των EPS.

### **3.6. ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ**

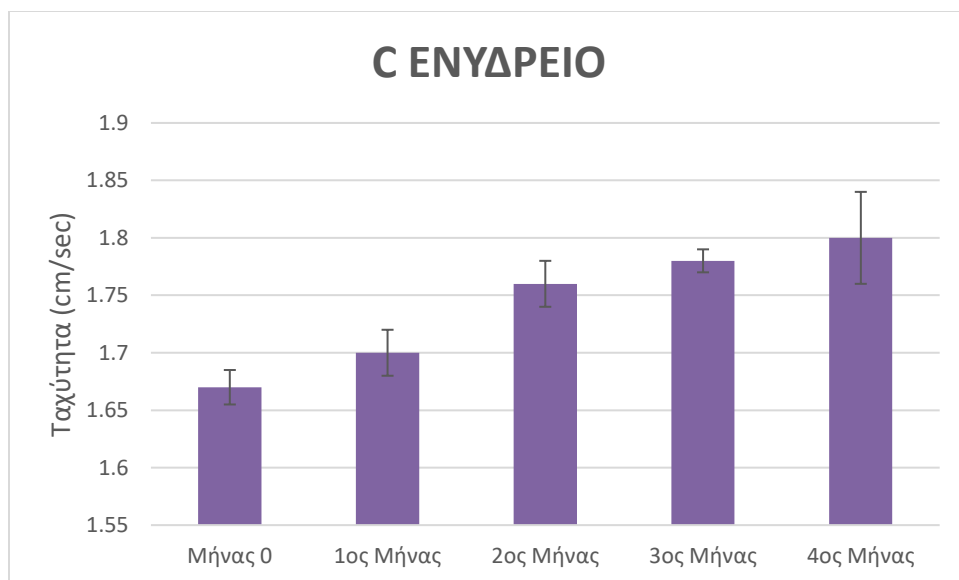
Η ταχύτητα καθίζησης προσδιορίστηκε υπολογίζοντας τον χρόνο που χρειάστηκε το πλαστικό να διαπεράσει τον αριθμημένο ογκομετρικό κύλινδρο και να φτάσει στον πυθμένα. Όπως θα φανεί και στα παρακάτω διαγράμματα τα κομμάτια PS είχαν μια διακριτή διαφορά στην ταχύτητα καθίζησης μέχρι τον 4<sup>ο</sup> μήνα (με μικρή εξαίρεση το ενυδρείο Α), πράγμα όμως που δεν ισχύει για το LDPE αφού δεν κατάφερε να βυθιστεί σε καμία δειγματοληψία. Έτσι για τα τέσσερα ενυδρεία η ταχύτητα καθίζησης του PS διαμορφώθηκε ως εξής:



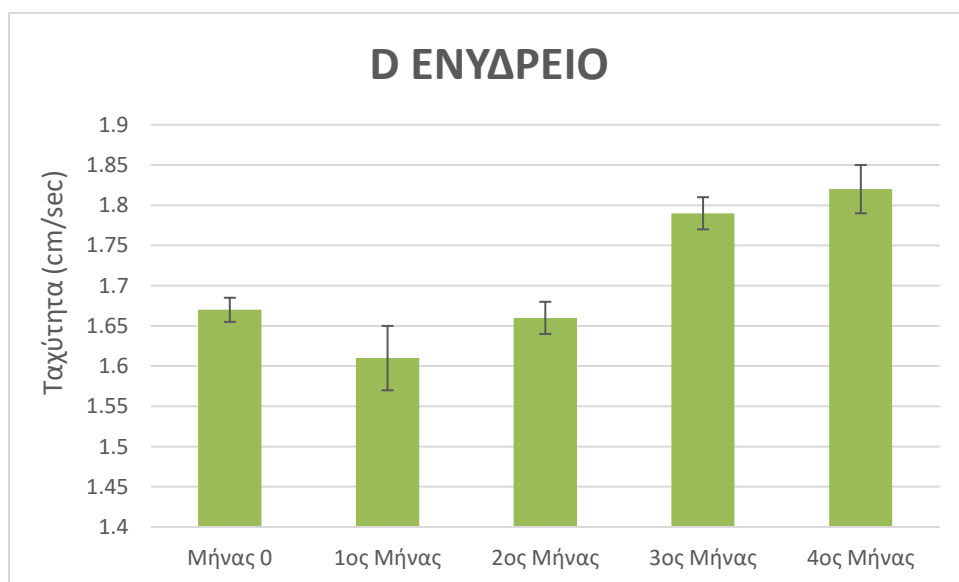
Διάγραμμα 17 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο A



Διάγραμμα 18 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο B



Διάγραμμα 19 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο C



Διάγραμμα 20 : Ταχύτητα καθίζησης πολυστυρενίου (PS), ενυδρείο D

Στα ενυδρεία Β και D, τα φίλμς παρουσιάζουν μεγαλύτερη τιμή συγκριτικά με τον πρώτο μήνα, κάτι που δε συμβαίνει στα ενυδρεία Α και C. Οι φυσικές ιδιότητες των μικροπλαστικών - η πυκνότητα τους, το μέγεθος και το σχήμα - καθορίζουν τη συμπεριφορά τους στη θάλασσα, δηλαδή την κίνηση τους σε στρωματοποιημένο και τυρφώδες θαλάσσιο περιβάλλον καθώς και τον χρόνο παραμονής τους σε διαφορετικές θαλάσσιες περιοχές. Έρευνα στη Βαλτική Θάλασσα των Hidalgo-Ruz κ.α. (2012) με στόχο τη διερεύνηση των ταχυτήτων βύθισης και συμπεριφοράς των σωματιδίων με διαφορετικές πυκνότητες και σχήματα έδειξε πως τα εξαιρετικά ελαφρά μικροπλαστικά επιπλέουν στην επιφάνεια (π.χ. αφρώδη σωματίδια πολυστυρενίου  $0,05 \text{ g/cm}^3$ ) και μπορεί να χρειαστούν μόνο περίπου 2-3 ημέρες για να διασχίσουν τη Βαλτική από τη μία ακτή στην άλλη (περίπου 250 χλμ.) με μέτρια ανέμους των  $10 \text{ m/s}$ . Για σωματίδια όμως ελαφρώς βαρύτερα (π.χ. πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο) η αύξηση της μέσης πυκνότητας των σωματιδίων οδηγεί στη βύθιση.

Γενικότερα, ο χρόνος ρύπανσης ενός θαλάσσιου περιβάλλοντος εξαρτάται γραμμικά από τη χαρακτηριστική κλίμακα μήκους ενός σωματιδίου (ακτίνα σφαίρας, πάχος της μεμβράνης ή ακτίνα). Κατά την παραμονή των πολυμερών στους μεσόκοσμους, παρατηρείται σταθερή ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνεια τόσο του LDPE, όσο και του PS, καταδεικνύοντας την ικανότητα των θαλάσσιων κοινότητων να επιβιώσουν με τα πολυμερή σαν μοναδική πηγή άνθρακα.

Το LDPE χαρακτηρίζεται από μια πυκνότητα  $d_{\text{LDPE}}=0.92 \text{ g/cm}^3$ , σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του θαλασσινού νερού ( $d_{\text{θαλασσινού νερού}}=1.023 \text{ g/cm}^3$ ). Για το λόγο αυτό, το παρθένο πολυμερές, δεν κατάφερε να βυθιστεί. Για το PS, ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση της ταχύτητας καθίζησης. Στους μεσόκοσμους Α και C, όπου είχε προηγηθεί εμβολιασμός με εγκλιματισμένες κοινότητες, η διαφορά στην ταχύτητα καθίζησης των κομματιών του πολυμερούς εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τον 4ο μήνα παραμονής τους, σε σχέση τόσο με το παρθένο υλικό, όσο και με τους πρώτους δυο μήνες.

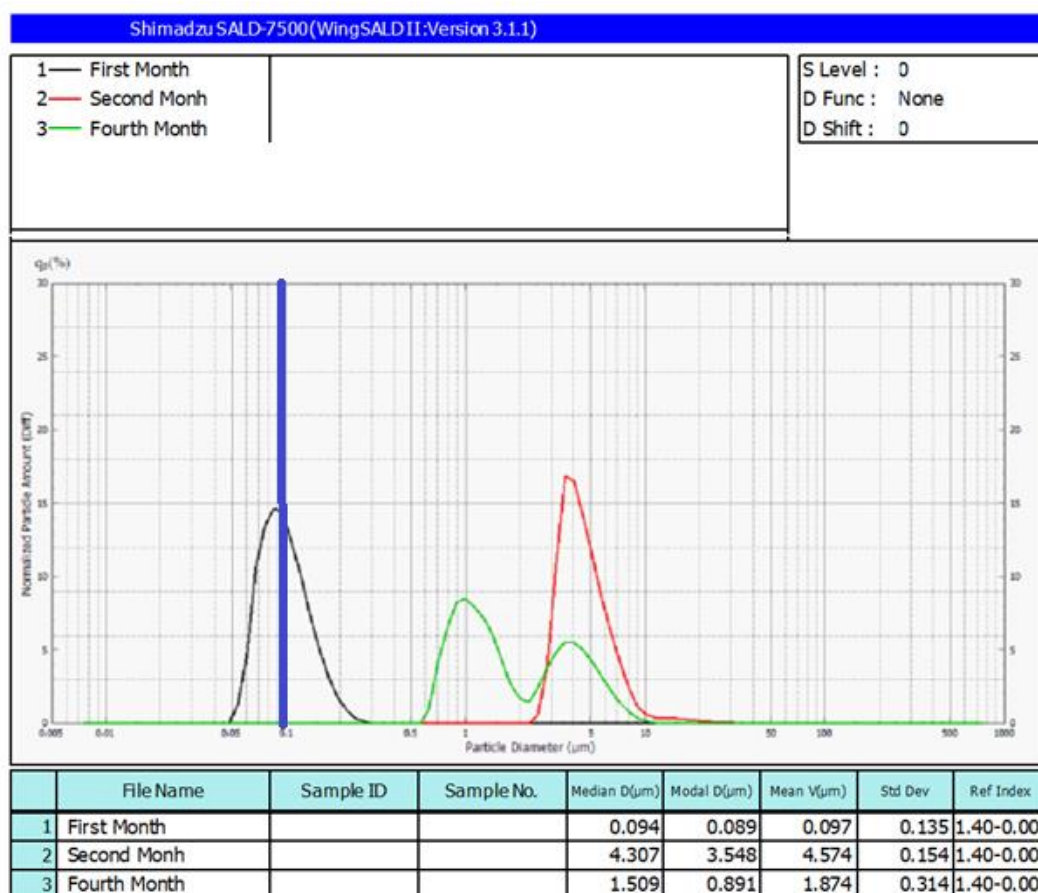
Ειδικά στον μεσόκοσμο Α, ήδη από τον 3ο μήνα οι μεταβολές είναι στατιστικά σημαντικές σε σχέση με τούς προηγούμενους. Στους μεσόκοσμους που δεν είχαν υποστεί εμβολιασμό, παρά την εμφανή αύξηση της ταχύτητας καθίζησης, οι μεταβολές δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από μήνα σε μήνα, με μοναδική εξαίρεση το ενυδρείο με φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό, στο οποίο η ταχύτητα καθίζησης του PS μεταβάλλεται σημαντικά από τον 1ο στο 2ο μήνα.

### 3.7. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Τα πλαστικά που περιέχονταν μέσα στο ενυδρείο διασπάστηκαν σε μικρότερα κομμάτια. Αυτό συνέβη λόγω της ακτινοβολίας του ήλιου αλλά και τη βιοαποδόμηση. Η κατανομή του μεγέθους των δευτερογενών μικροπλαστικών που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των τεσσάρων μηνών, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του μηχανήματος SALD-7500 Nano. Έτσι, με αυτό εκτιμήθηκε η διακύμανση της διαμέτρου των μικροπλαστικών σε πραγματικό χρόνο.

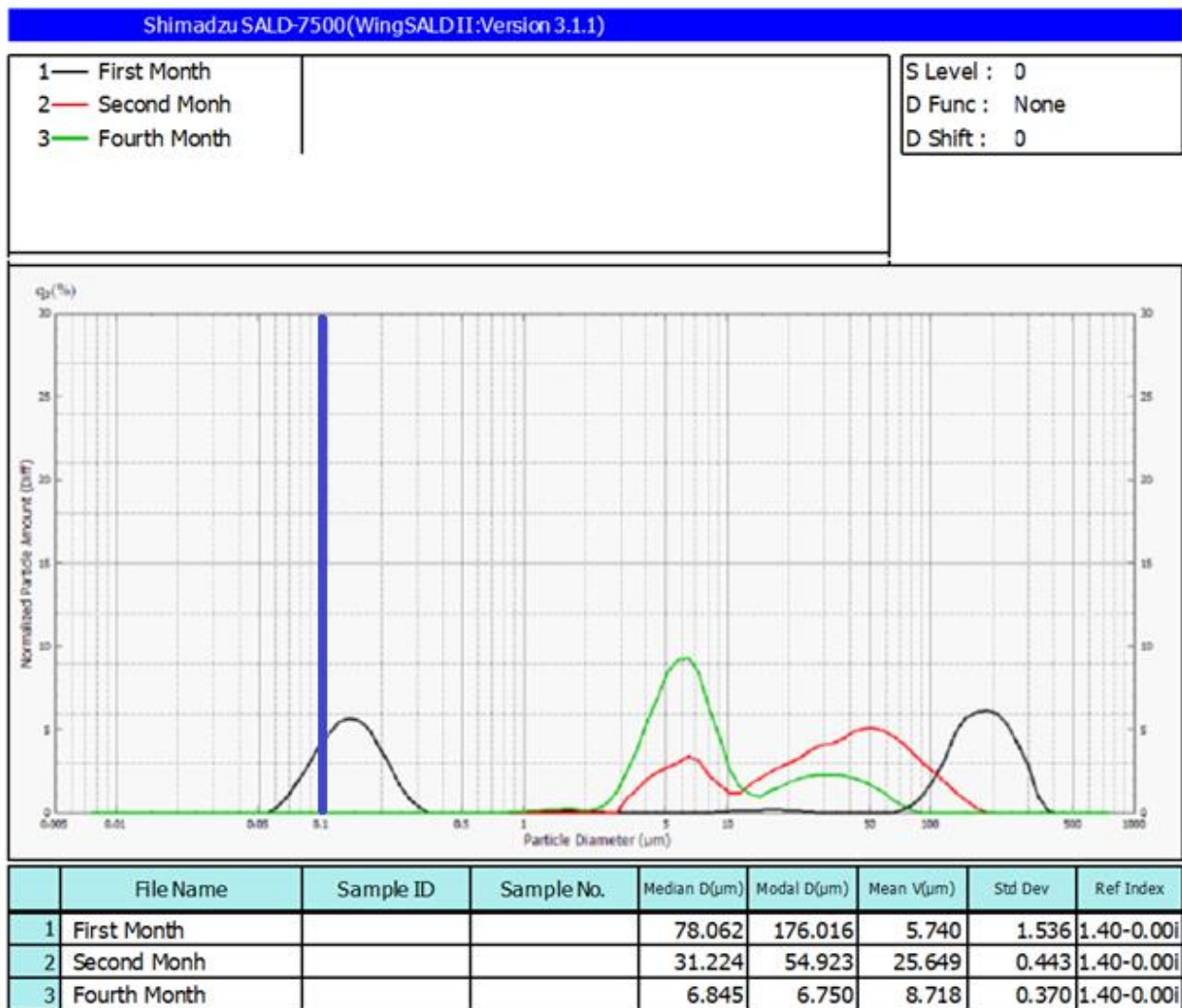
Όπως αναφέρθηκε και στην πειραματική διαδικασία, συλλέχθηκε νερό από τρία σημεία της πειραματικής διάταξης. Το νερό από σημεία 1 και 3 χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη ανάλυση ώστε να προσεγγίσουμε τη διάμετρο των μικροπλαστικών PS και LDPE. Τα αποτελέσματα για το καθένα από τα ενυδρεία A,B,C και D εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

## ΕΝΥΔΡΕΙΟ Α



Διάγραμμα 21 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο Α.

Στο διάγραμμα 21 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών στο ενυδρείο Α, με βάση τον αριθμό τους. Παρατηρείται έτσι ότι η μέση διάμετρος από 0,089 μm τον 1<sup>ο</sup> μήνα, αυξήθηκε αρκετά τον δεύτερο μήνα και κατέληξε σε 0,891 μm τον 4<sup>ο</sup> μήνα της δειγματοληψίας.



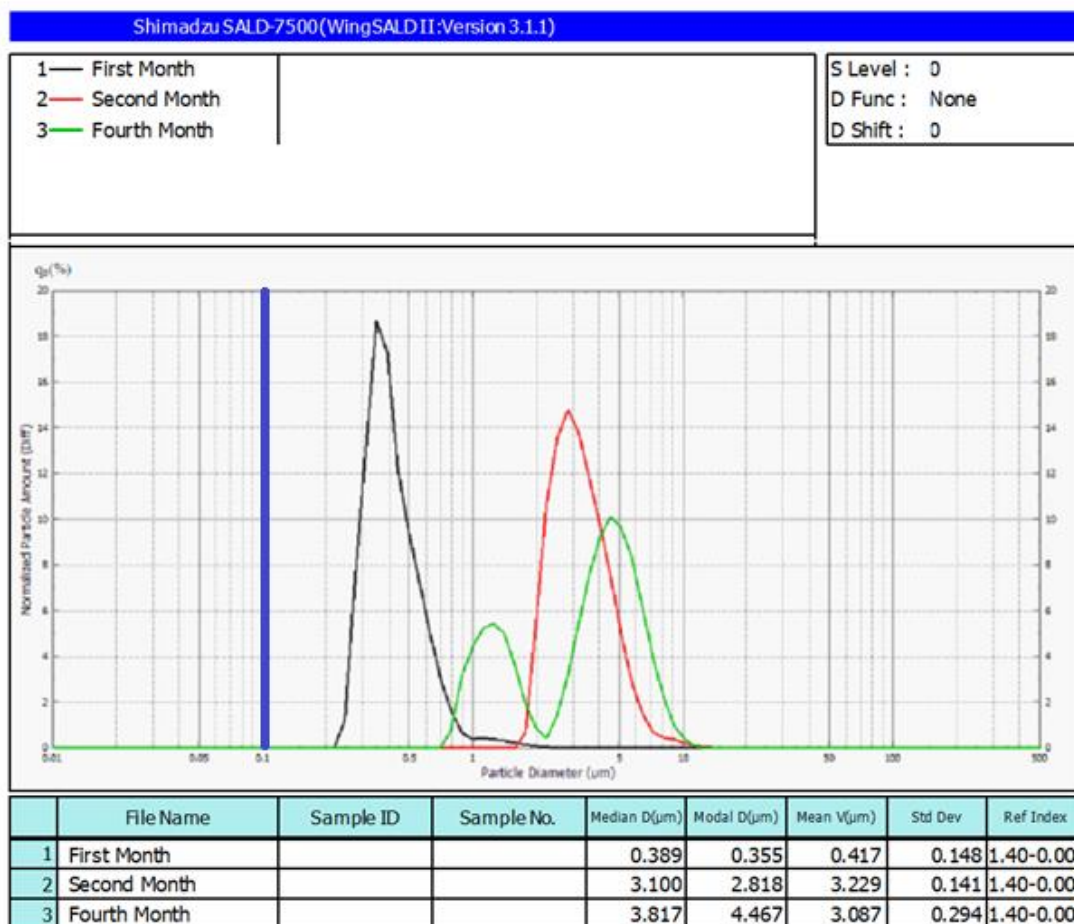
Διάγραμμα 22: Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3 βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο A.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανομή μικροπλαστικών που αφορούν το ενυδρείο A, με βάση τον όγκο τους. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων μειώνεται αρκετά καθώς από 176,016  $\mu\text{m}$  που υπολογίστηκε τον πρώτο μήνα, έφτασε σε 6,750  $\mu\text{m}$  τον 4<sup>ο</sup>. Είναι σημαντικό ωστόσο να γίνει αντιληπτή η διαφορά μεταξύ της κατανομής της διαμέτρου και της κατανομής του όγκου. Είναι πιθανόν ο αριθμός των σωματιδίων με μεγάλη διάμετρο να είναι ίδιος με εκείνων που έχουν μικρότερη αλλά παρόλα αυτά ο όγκος τους διαφέρει.

Είναι κατανοητό, πως τα σωματίδια με μεγαλύτερη διάμετρο θα καταλαμβάνουν μεγαλύτερο χώρο, συνεπώς θα έχουν και μεγαλύτερη διάμετρο, από εκείνα με μικρότερη διάμετρο. Από το διάγραμμα 22,ωστόσο, σε σχέση με τον όγκο των μεγάλων σωματιδίων κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται και μια αξιοσημείωτη εμφάνιση μικρότερων σωματιδίων με διάμετρο <0,1  $\mu\text{m}$ , τάξη που αντιστοιχεί στα νανοπλαστικά. Συνεπώς, σε συνδυασμό των δύο αυτών διαγραμμάτων διαπιστώνεται η ύπαρξη νανοσωματιδίων που μπορεί να οφείλεται στην βιοαποδόμηση από

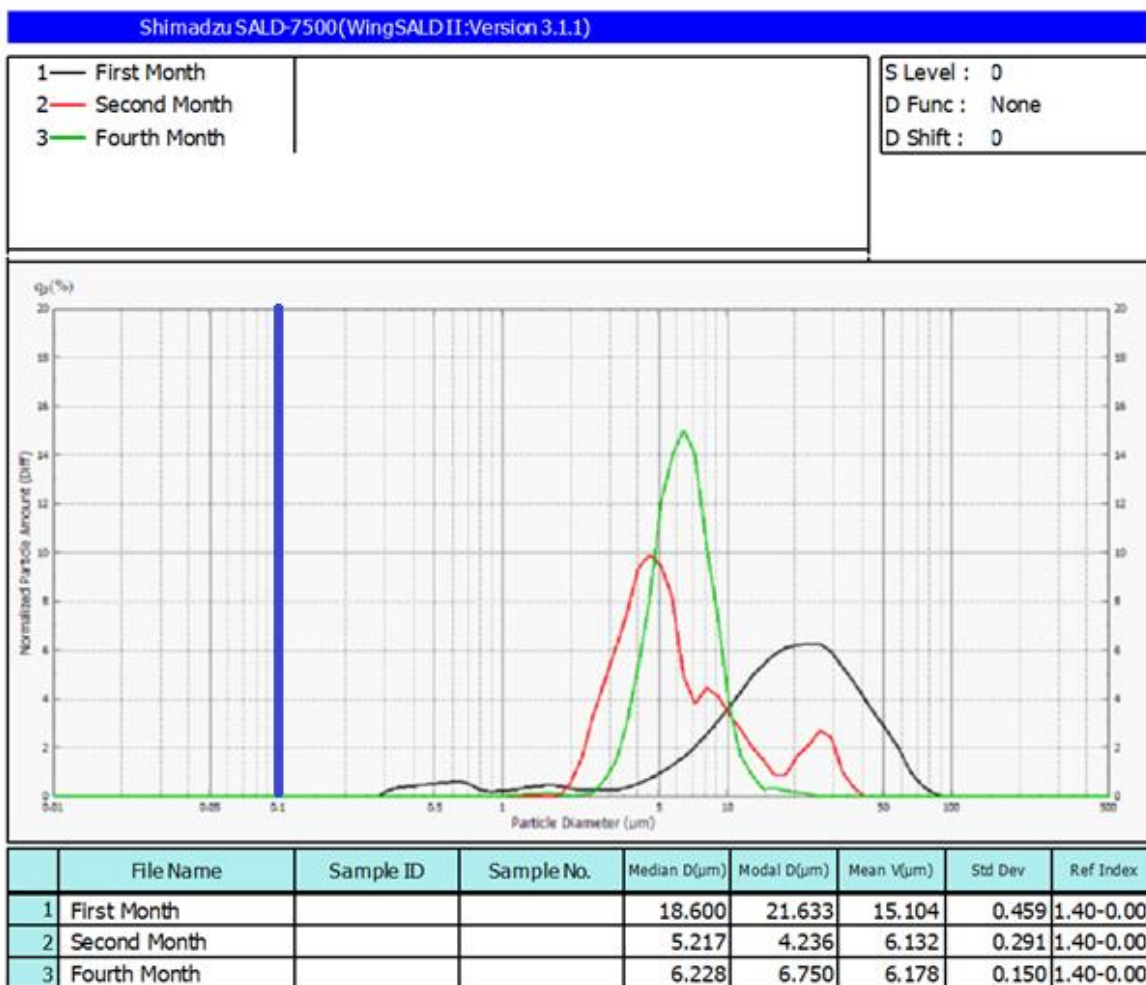


τους μικροοργανισμούς που εμβολιάστηκαν στο ενυδρείο, ή και από την φωτοαποδόμηση λόγω της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας που επικρατούσε κατά τους μήνες της δειγματοληψίας (Μάιος- Αύγουστος).



Διάγραμμα 23 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο Α.

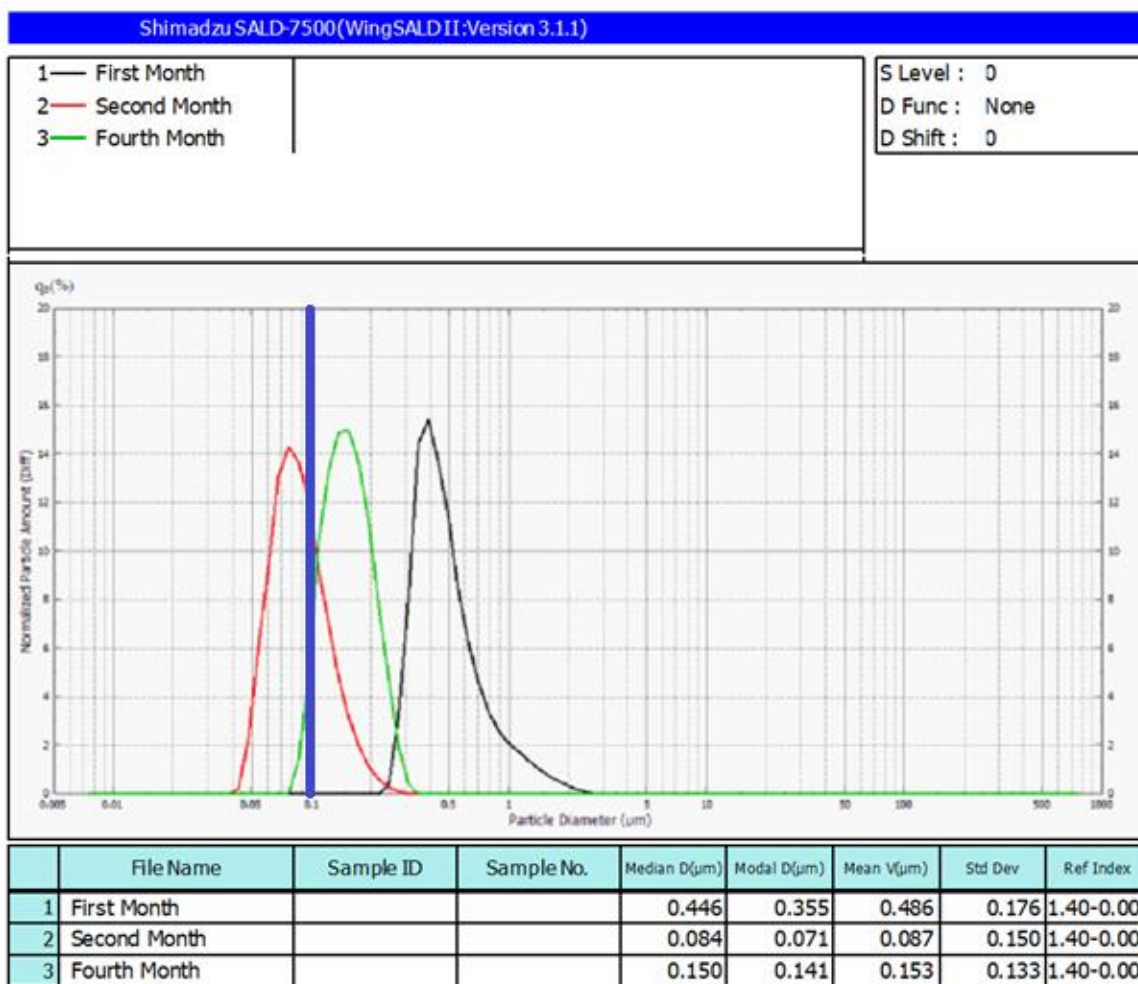
Στο διάγραμμα 23 παρουσιάζεται επίσης, κατανομή των μικροπλαστικών σε σχέση με τη διάμετρό τους. Παρατηρούμε ότι η μέση διάμετρος, με βάση την κατανομή του αριθμού αυξάνεται σταδιακά. Συγκεκριμένα από 0,355  $\mu\text{m}$  κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα, έφτασε 4,467  $\mu\text{m}$  τον 4<sup>ο</sup>.



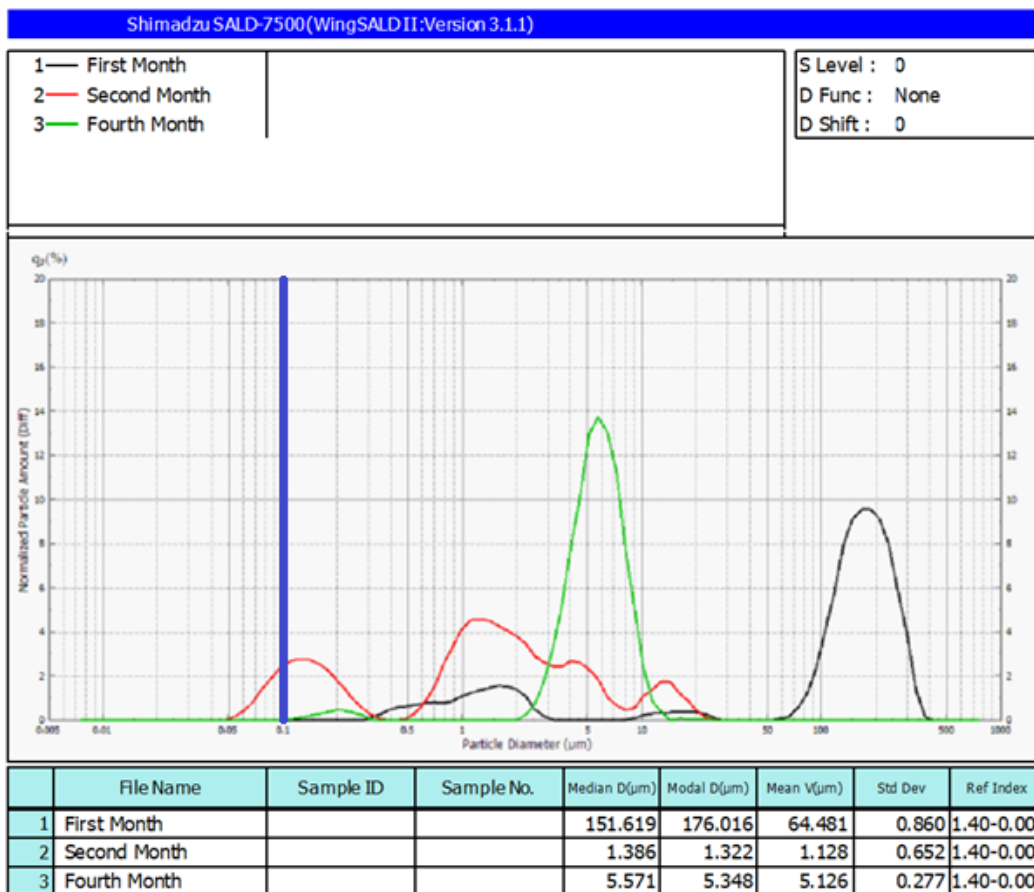
Διάγραμμα 24 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο Α.

Στο διάγραμμα 24 που αφορά την κατανομή του όγκου των μικροπλαστικών αντίθετα παρατηρείται μια μείωση στη μέση διάμετρο, αφού από 21,633  $\mu\text{m}$  άγγιξε στον τελευταίο μήνα τα 6,750  $\mu\text{m}$ . Όμως σε κανένα από τα δύο διαγράμματα δεν παρατηρείται σωματίδιο με διάμετρο  $<0,1 \mu\text{m}$ , ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.

## ΕΝΥΔΡΕΙΟ Β

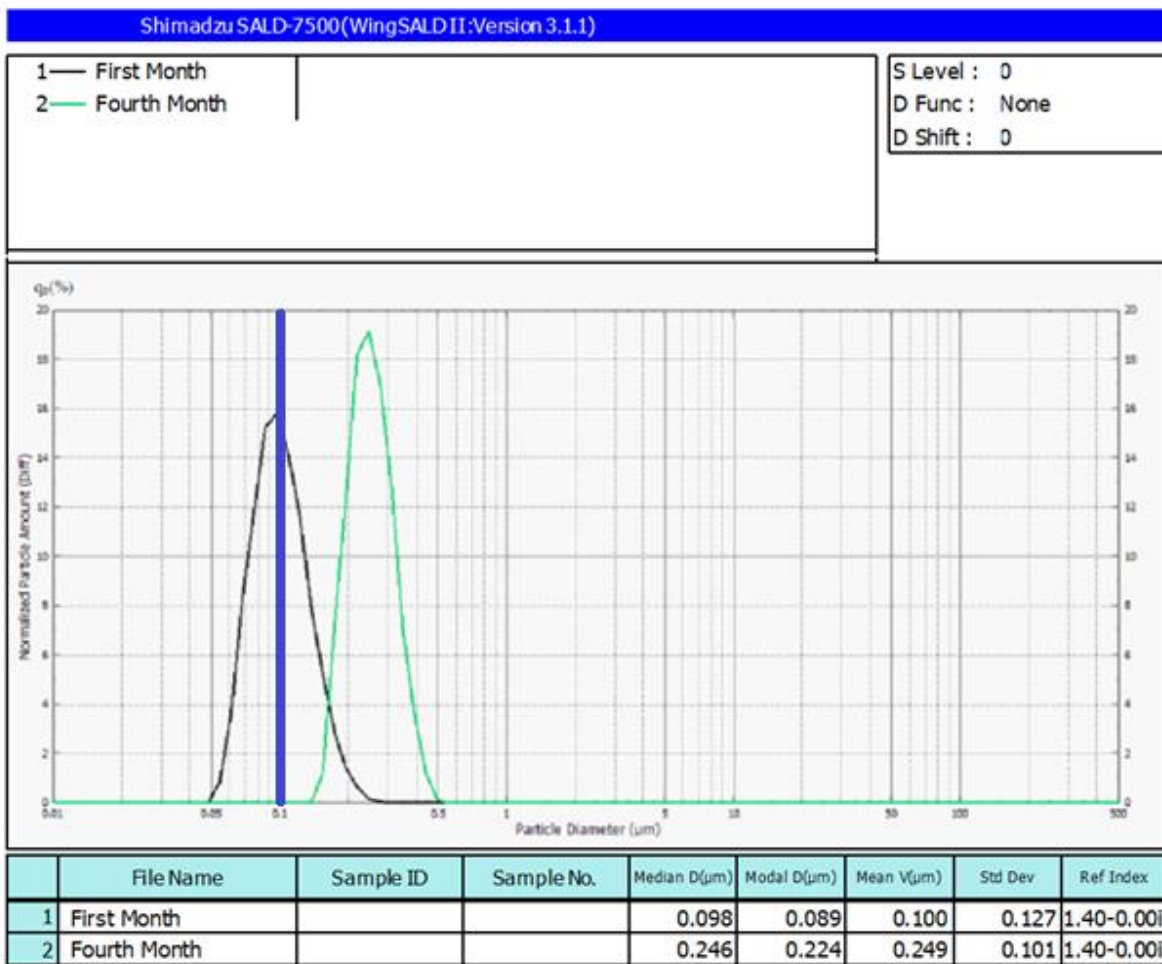


Διάγραμμα 25 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο Β.

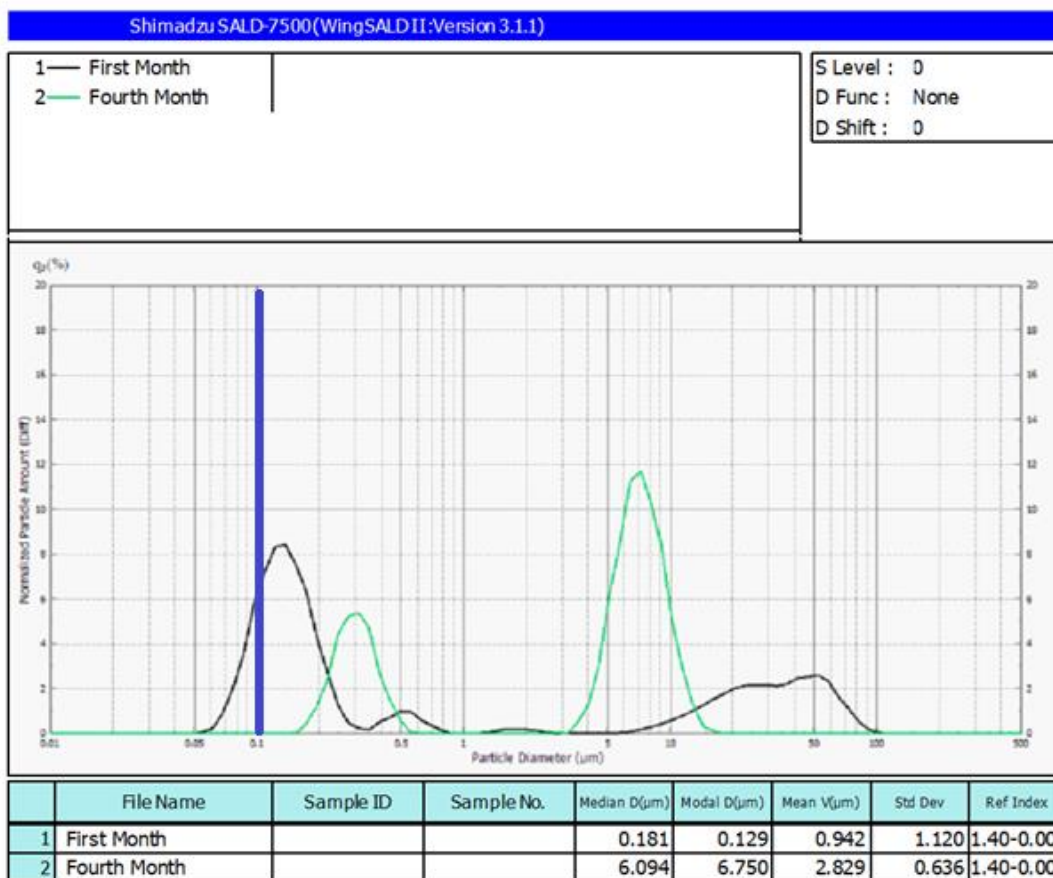


Διάγραμμα 26 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο B.

Τόσο η κατανομή του αριθμού, όσο και η κατανομή του όγκου των μικροσωματιδίων ακολουθούν παρόμοιο μοτίβο. Αυτό, εμφανίζει μείωση τον δεύτερο μήνα ενώ τον τέταρτο αύξηση και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, η διάμετρος από 0,355  $\mu\text{m}$  τον 1<sup>ο</sup> μήνα μειώθηκε σε 0,071  $\mu\text{m}$  και έφτασε τελικά τα 0,141  $\mu\text{m}$ . Ενώ το ίδιο συμβαίνει και με την κατανομή των σωματιδίων με βάση τον όγκο αφού από 176,016  $\mu\text{m}$  αρχική τιμή μέσης διαμέτρου, μειώθηκε στα 1,322  $\mu\text{m}$  και τελικά τον τέταρτο μήνα πήρε την τιμή 5,348  $\mu\text{m}$ . Και σε αυτή την περίπτωση, είναι ορατή η ύπαρξη νανοσωματιδίων με διάμετρο <0,1  $\mu\text{m}$ , που εμφανίζονται κυρίως κατά τους τελευταίους μήνες.



Διάγραμμα 27 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο Β.

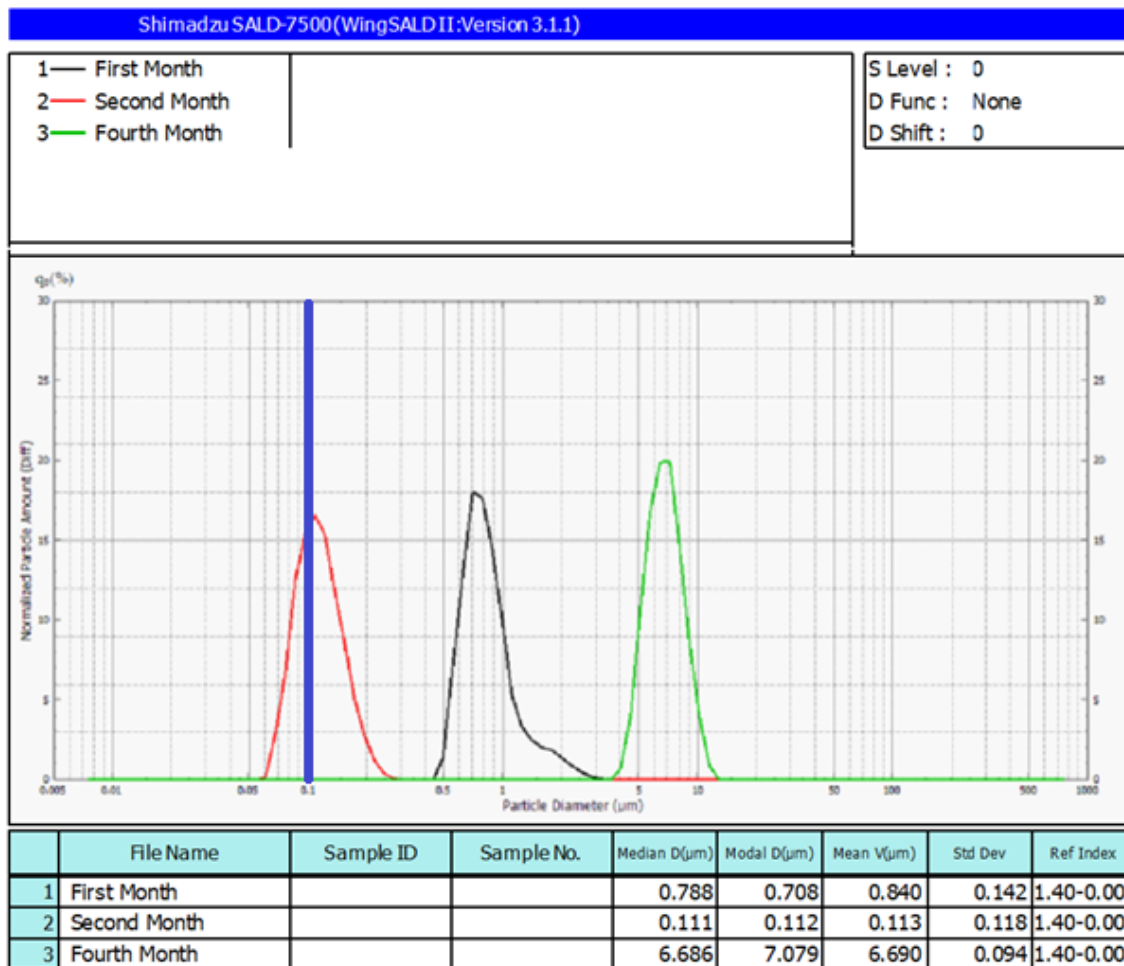


Διάγραμμα 28 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο B.

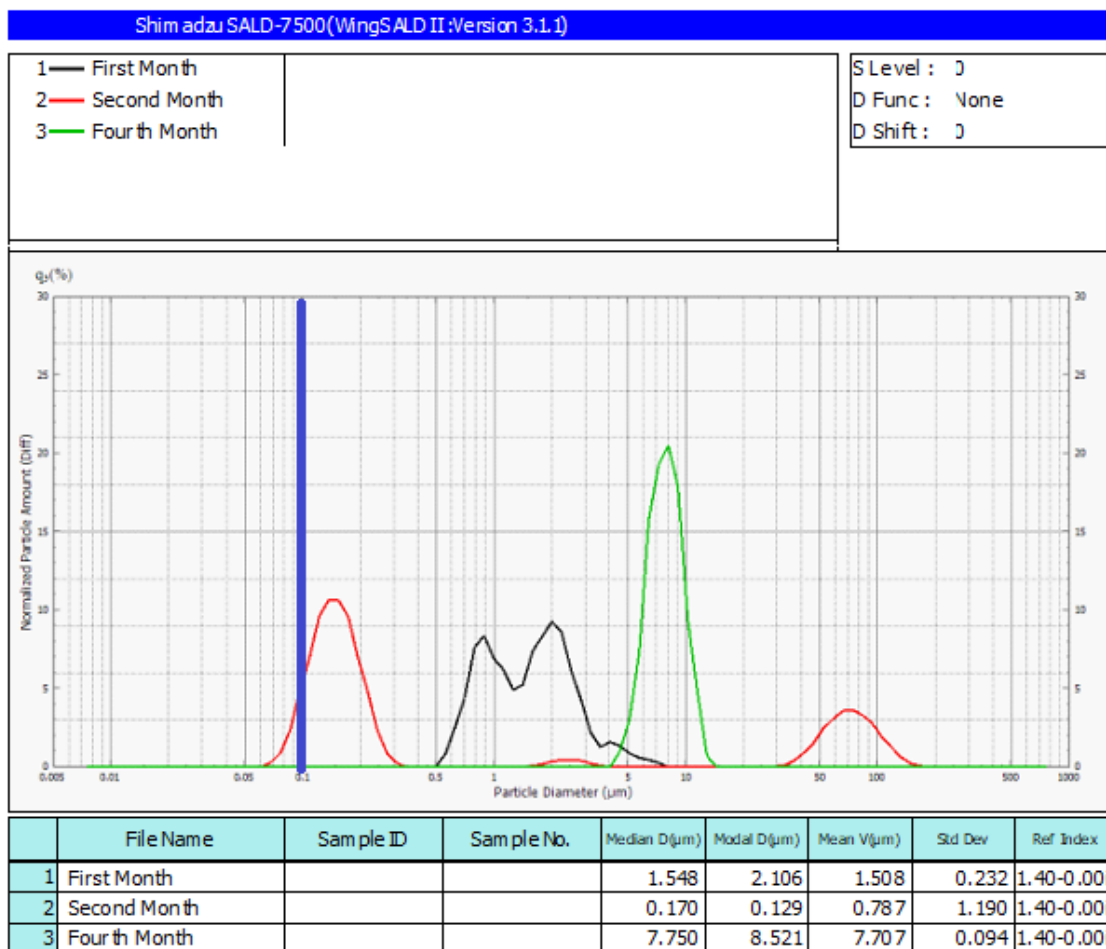
Στην περίπτωση αυτή, συγκριτικά με τον 1<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος φαίνεται να αυξάνεται. Όμως παρατηρώντας τα διαγράμματα 27 και 28, κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα της δειγματοληψίας εμφανίζονται σωματίδια με διάμετρο <0,1 μm, συνεπώς νανοπλαστικά. Αυτό, μπορεί να οφείλεται σε βιοαποδόμηση που έγινε από τους μικροοργανισμούς της θάλασσας στην περιοχή της Σούδας. Η διάμετρος των σωματιδίων κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα φαίνεται να αυξάνεται, αυτό μπορεί να οφείλεται στη πιθανή συσσώματωση των σωματιδίων μέχρι το διάστημα αυτό. Ο 2<sup>ος</sup> μήνας, δεν έδωσε καθόλου αποτελέσματα, γι' αυτό και δεν αναπαριστάται στα διαγράμματα.



## ΕΝΥΔΡΕΙΟ C



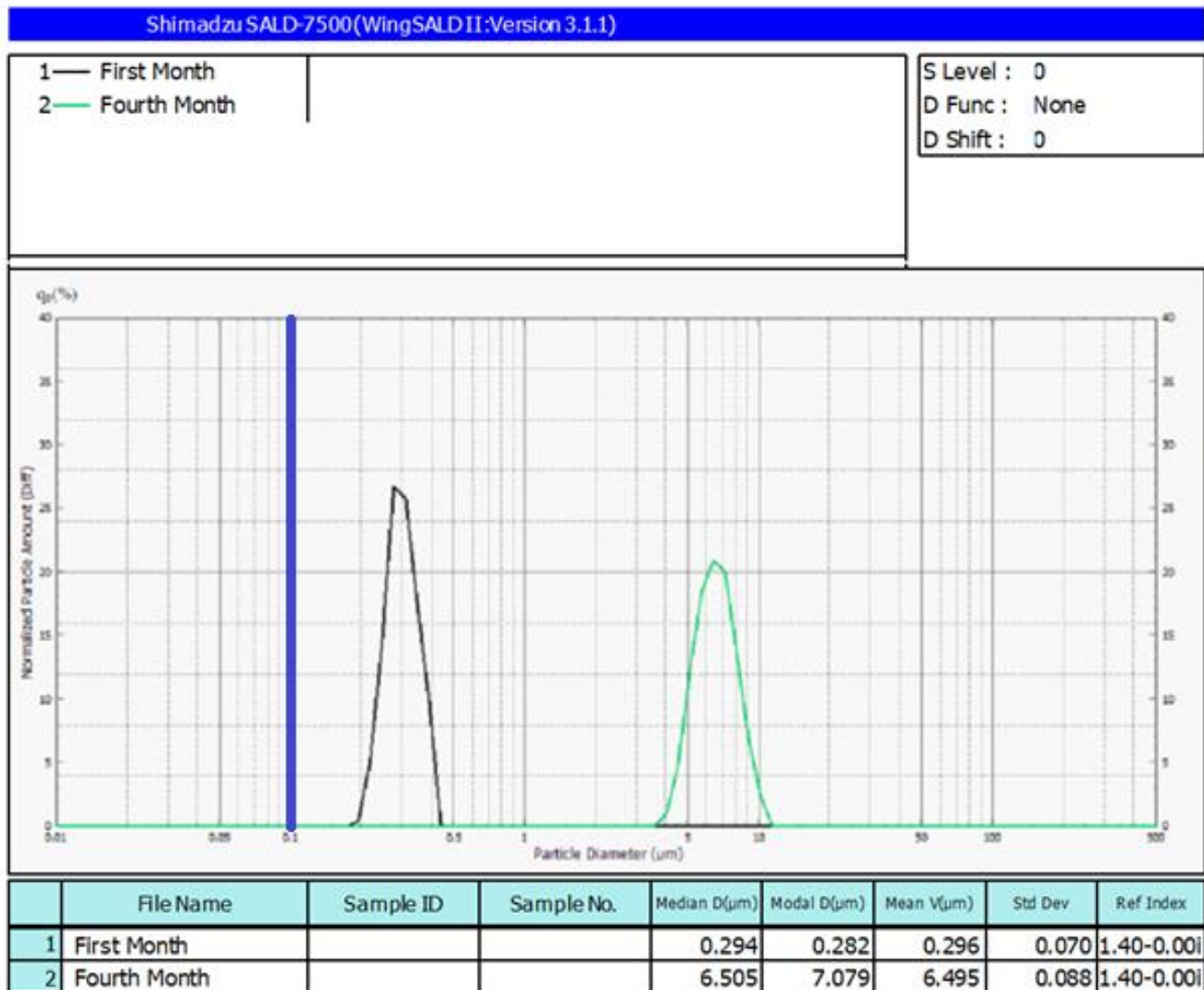
Διάγραμμα 29 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο C.



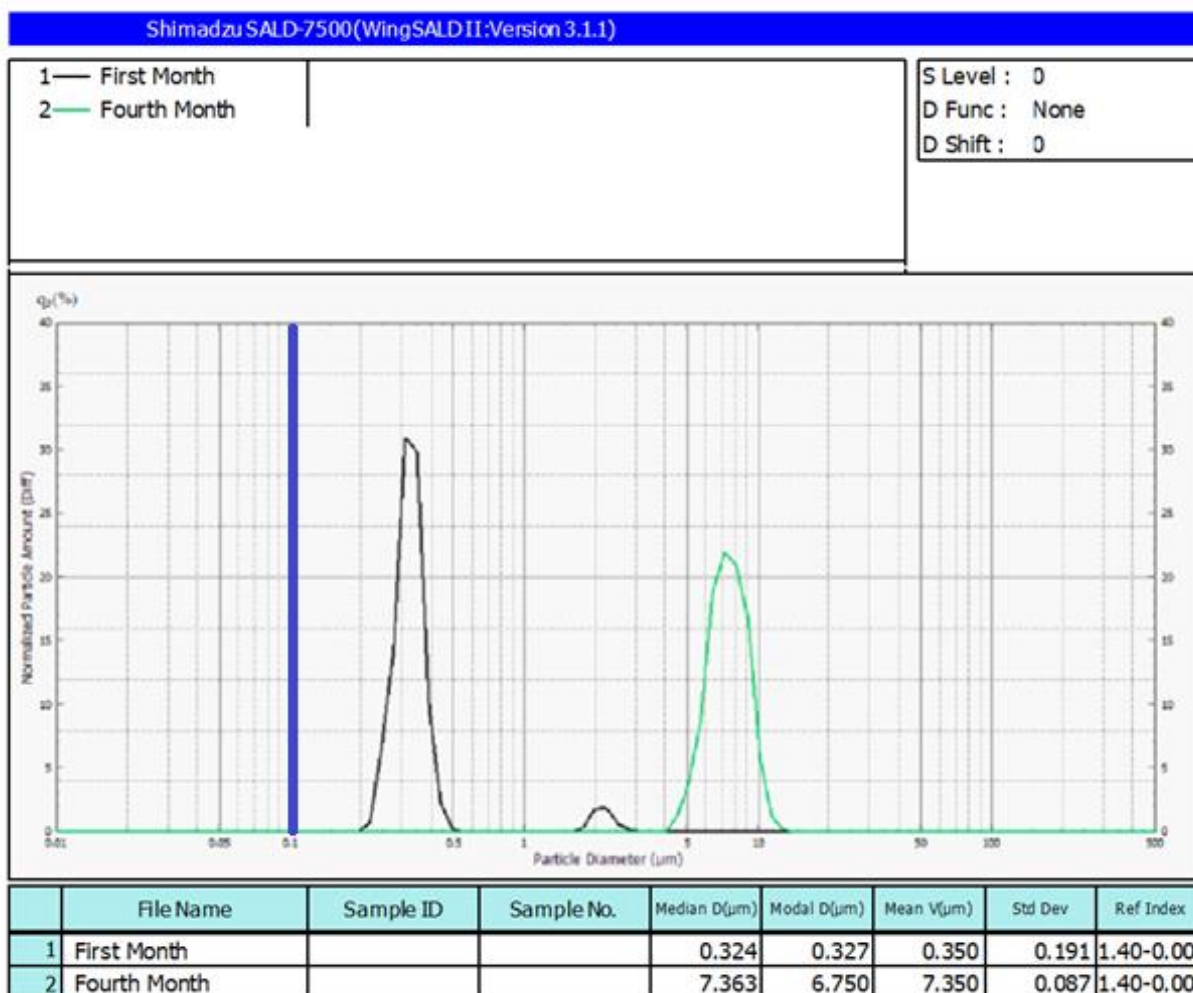
Διάγραμμα 30 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 3, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο C.

Το C ενυδρείο, φαίνεται να ακολουθεί ένα παρόμοιο μοτίβο με αυτό του ενυδρείου B καθώς από την τιμή του 1<sup>ου</sup> μήνα η μέση διάμετρος μειώθηκε τον 2<sup>ο</sup> και έπειτα ξανά αυξήθηκε σημαντικά τον 4<sup>ο</sup> μήνα. Συγκεκριμένα για το διάγραμμα κατανομής του αριθμού, από 0,708 μm σκαρφάλωσε σε 7,079 μm, ενώ στο διάγραμμα κατανομής του όγκου από 2,106 μm βρέθηκε τελική τιμή στον 4<sup>ο</sup> μήνα 8,521 μm. Παρόλα αυτά κατά τον 2<sup>ο</sup> μήνα παρατηρούνται νανοπλαστικά, που μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι LDPE καθώς το μήνα αυτό όπως φάνηκε στην ενότητα της μικροβιακής αυτή για το PS ήταν μηδενική ενώ για το LDPE ήταν  $2 \cdot 10^4$  CFU/ml. Επομένως, τα νανοπλαστικά αυτά οφείλονται είτε στην φωτοαποδόμηση ή και στους μικροοργανισμούς που εμβολιάστηκαν στο ενυδρείο..





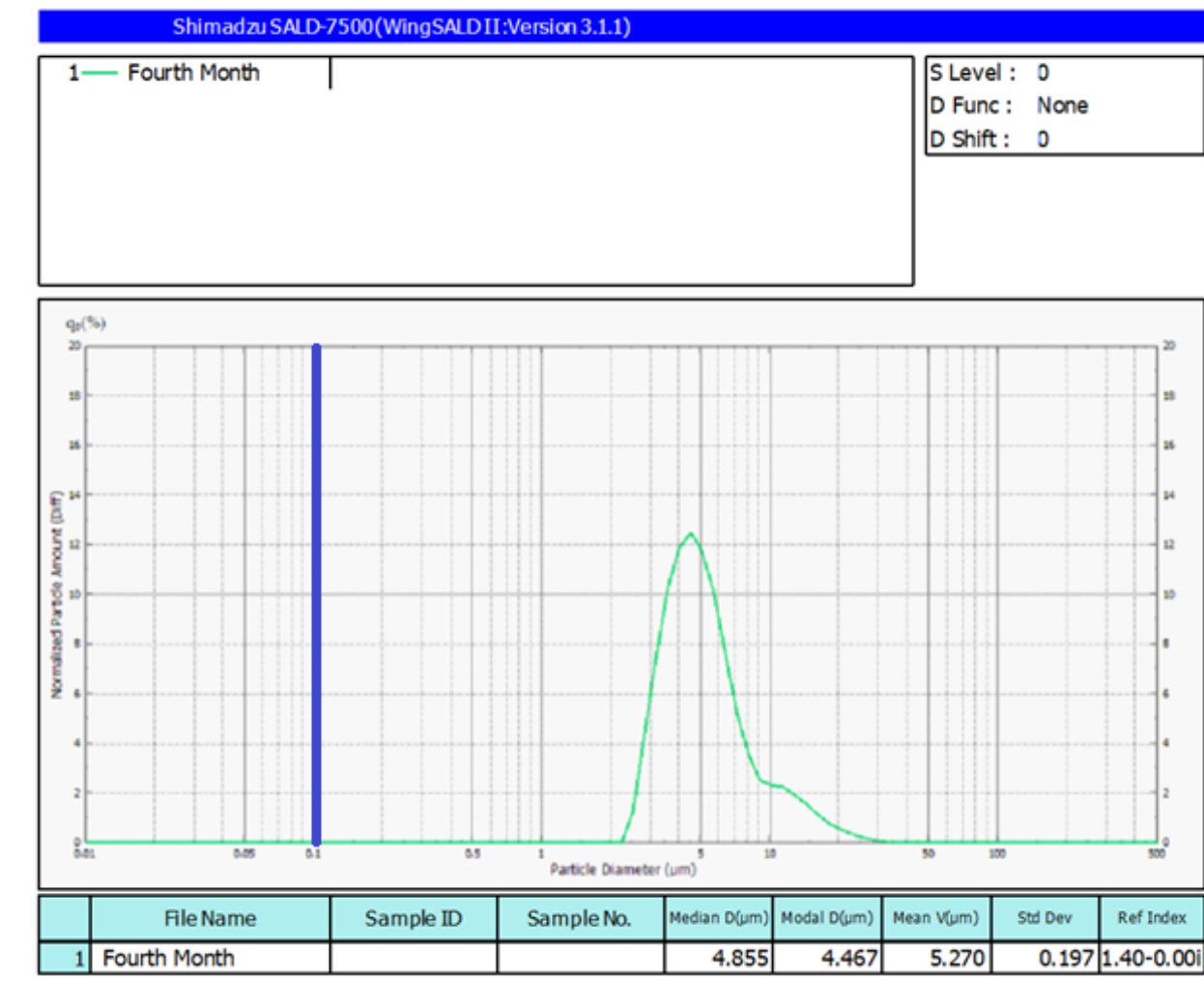
Διάγραμμα 31 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο C.



Διάγραμμα 32 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του όγκου τους (Volume), ενυδρείο C.

Σε ό,τι αφορά το πλαστικό LDPE, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της μέσης διαμέτρου από τον 1<sup>ο</sup> μέχρι τον τελευταίο μήνα, αντίστοιχα η μικροβιακή ανάπτυξη παρουσίαζε μια καθοδική πορεία. Και όπως επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα 31 και 32 δεν εντοπίστηκαν σωματίδια με διάμετρο <0,1 μm. Και σε αυτή την περίπτωση ο 2<sup>ος</sup> μήνας δεν απέδωσε αποτελέσματα γι'αυτό και δεν εμφανίζεται στα διαγράμματα αυτά που αφορούν την κατανομή του μεγέθους μικροπλαστικών στο σημείο 1 της δειγματοληψίας.

## ΕΝΥΔΡΕΙΟ D



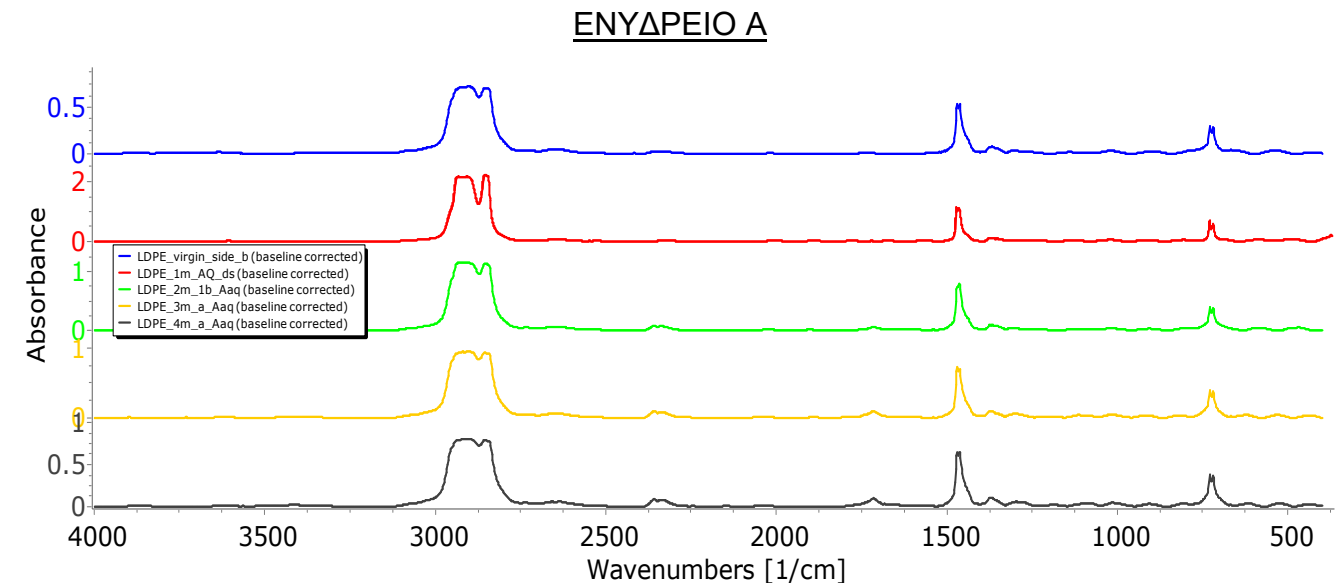
*Διάγραμμα 33 : Διάγραμμα κατανομής διαμέτρου σωματιδίων που αντιστοιχεί στο σημείο 1, βάση του αριθμού τους (Number), ενυδρείο D.*

Για το ενυδρείο D, η κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών μπόρεσε να μετρηθεί μόνο το μήνα 4<sup>ο</sup>. Η μέση διάμετρος των μικροπλαστικών το μήνα αυτό είναι 4,467 μm. Αυτό, συμφώνει με το διάγραμμα μείωσης βάρους για το ενυδρείο D καθώς παρατηρούνται μικρά ποσοστά μείωσης του βάρους για τα δύο πλαστικά συγκριτικά με τα υπόλοιπα ενυδρεία, ενώ παράλληλα τον 4<sup>ο</sup> μήνα της δειγματοληψίας το ποσοστό μείωση βάρους του LDPE ήταν πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τους προηγούμενους μήνες. Η διαφορά σε συμπεριφορά σε σχέση με το B πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός του φιλτραρίσματος του νερού που τοποθετήθηκε σε αυτό.

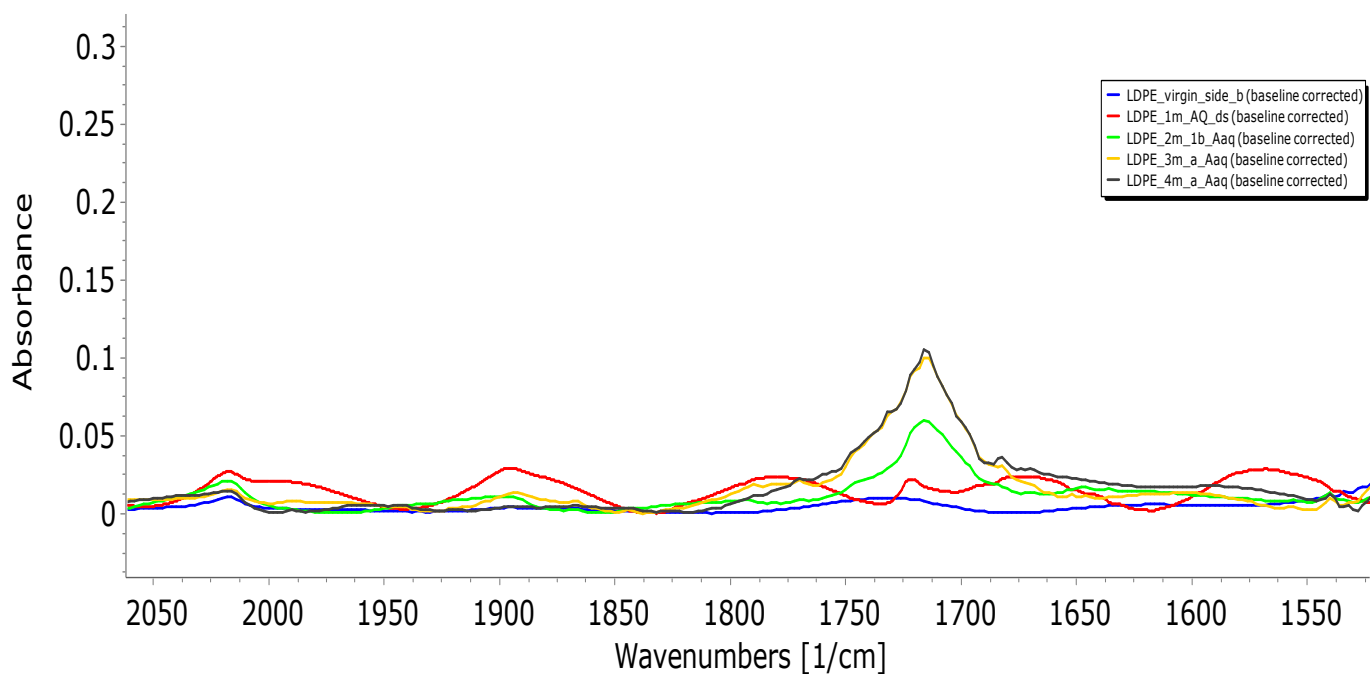
### 3.8. ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER (FTIR)

Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι η φωτο-αποδόμηση διαδραματίζεται στα πρώτα 100 μικρόμετρα ( $\mu\text{m}$ ) της επιφάνειας (Ter Halle et al. 2016), λόγω του τυχαίου προσανατολισμού των υμενίων, προσδιορίστηκε η χημική δομή της επιφάνειας και από τις 2 πλευρές του φιλμ.

Τα παρακάτω φάσματα παριστάνουν 5 διαφορετικές περιπτώσεις που αντιστοιχούν στις 5 διαφορετικές χρονικές στιγμές που λήφθηκαν ανά 30 μέρες, πρώτα στη γενική τους μορφή και κατόπιν εστιασμένα στην περιοχή των 1700  $\text{nm}$ .

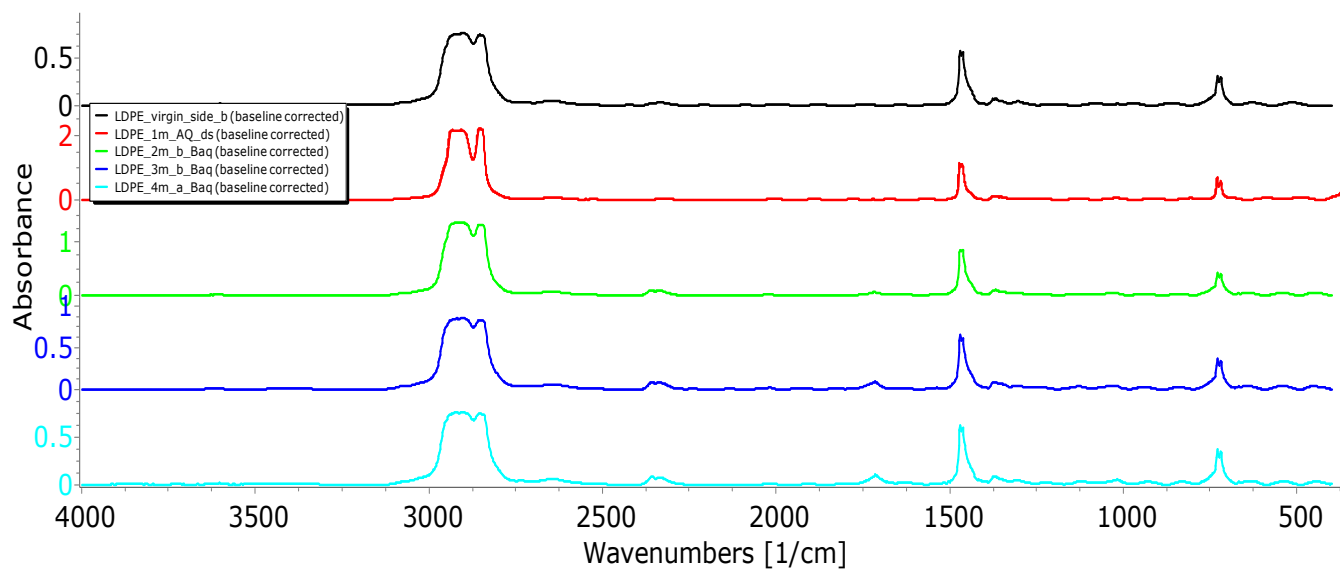


Διάγραμμα 34 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου Α

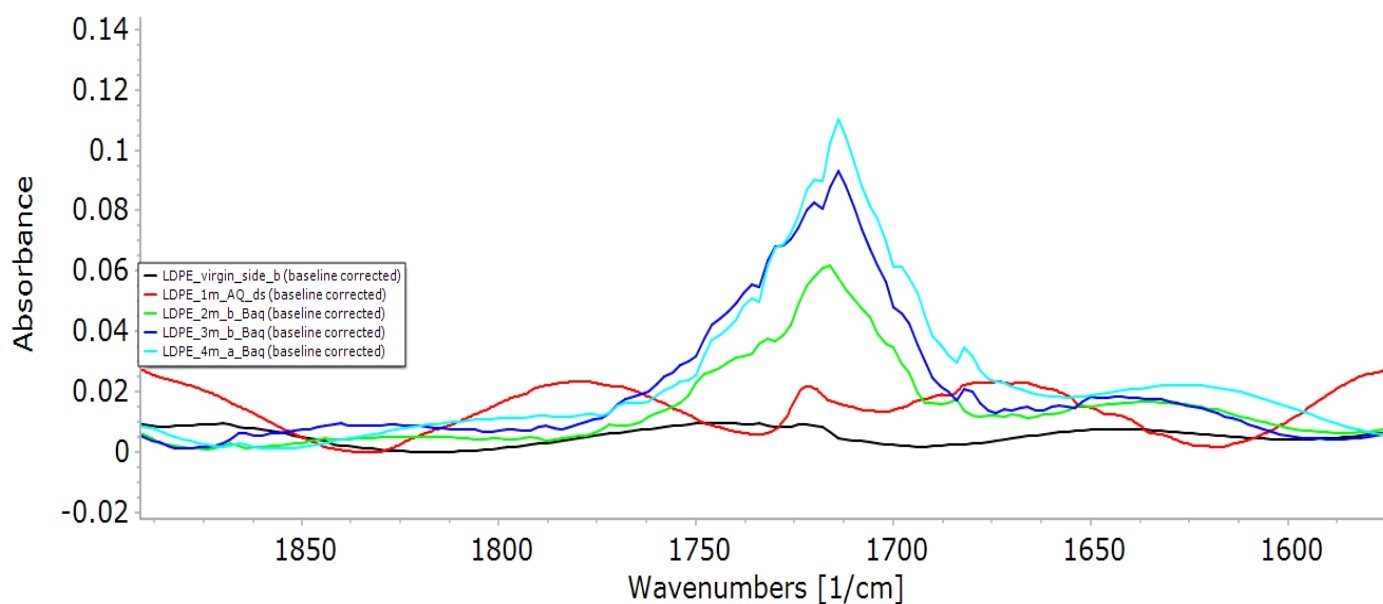


Διάγραμμα 35 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου Α

### ΕΝΥΔΡΕΙΟ Β

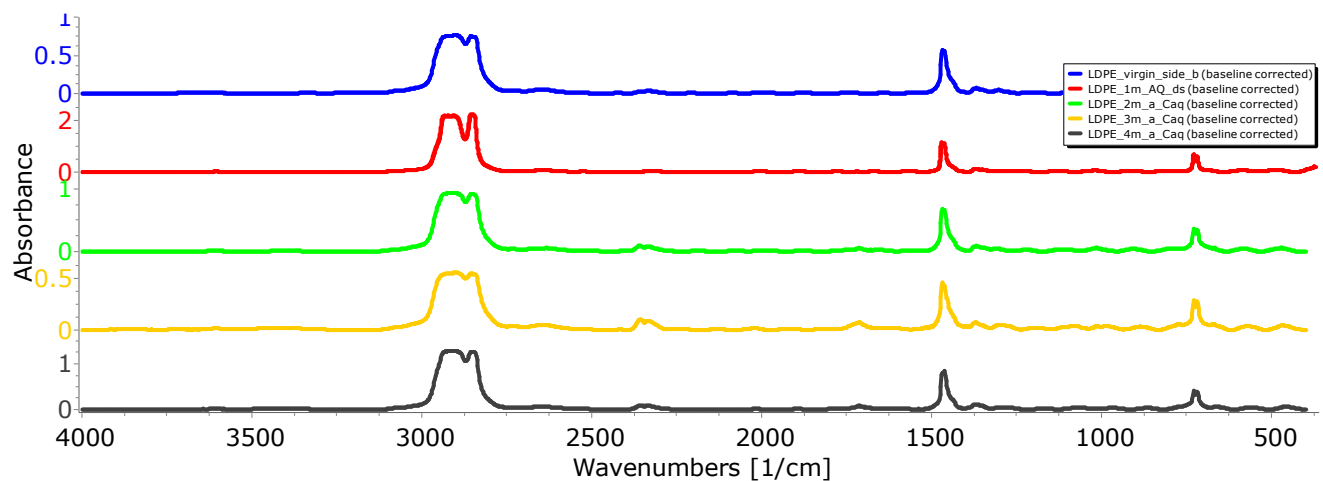


Διάγραμμα 36: Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου Β.

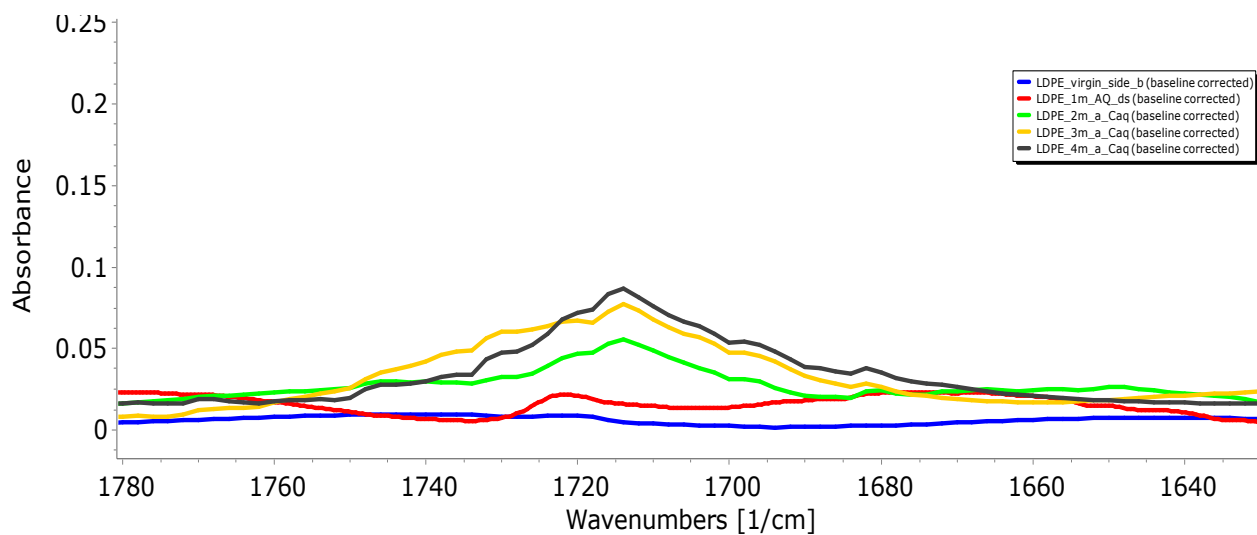


Διάγραμμα 37 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου B

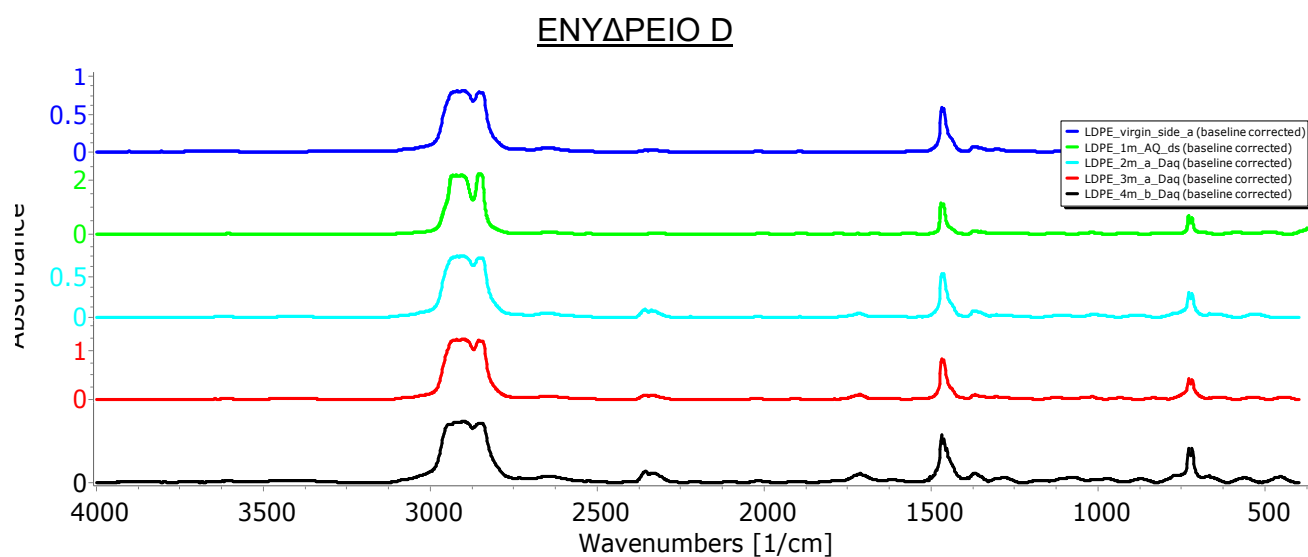
### ΕΝΥΔΡΕΙΟ C



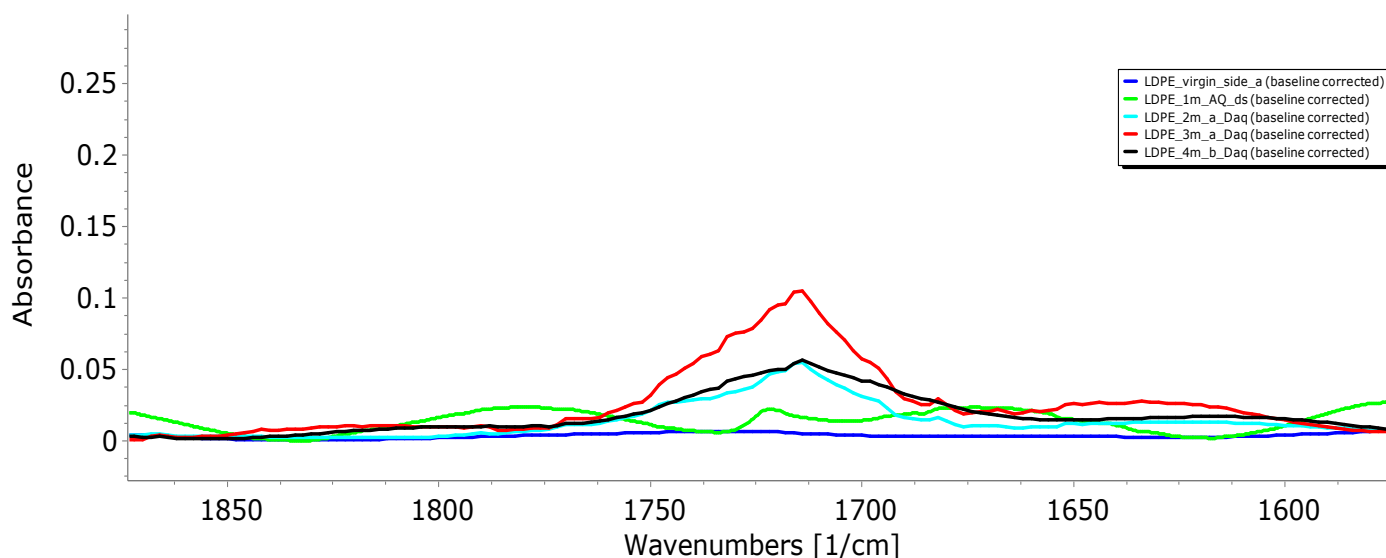
Διάγραμμα 38 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου C.



Διάγραμμα 39 : Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου C.



Διάγραμμα 40 : Φάσμα FTIR LDPE πειραματικής διάταξης ενυδρείου D.



Διάγραμμα 41: Φάσμα FTIR LDPE στην περιοχή  $1700\text{ cm}^{-1}$  πειραματικής διάταξης ενυδρείου D.

Με τη φωτοξείδωση, η οποία συμβαίνει λόγω της συνδυασμένης δράσης του υπεριώδους φωτός και του οξυγόνου, επέρχεται σταδιακή μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων του πλαστικού. Ο τύπος αυτός της γήρανσης οδηγεί σε χημικές μεταβολές των πολυμερικών αλυσίδων και αυτό συμβαίνει κυρίως στο επιφάνεια του φιλμ. Η συνάρτηση της πρόοδου της οξείδωσης μέσω του πάχους της μεμβράνης είναι φθίνουσα, δεδομένου ότι εξαρτάται από την ικανότητα απορρόφησης οξυγόνου του υλικού (περιοριστικός παράγοντας) (Douminge, 2010).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε και αφορούσε τις επιπτώσεις της ηλιακής ακτινοβολίας στις φυσικοχημικές ιδιότητες του πολυαιθυλενίου (PE), παρατηρήθηκε έντονη κορυφή στα  $1712\text{ cm}^{-1}$ . Αυτή, δείχνει ότι τα καρβονύλια είναι τα κυριότερα φωτοπροϊόντα που σχηματίζονται κατά τις φωτοχημικές αντιδράσεις (Halim, & All, 2000). Ο κύριος λόγος είναι ίσως το γεγονός ότι το PE καθίσταται πολύ ευαίσθητο σε δεδομένα μήκη κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας (Lacoste, & All, 1991).

Η κορυφή στα  $1712\text{ cm}^{-1}$  υποδεικνύει ότι τα κύρια προϊόντα οξειδώσεως που σχηματίζονται κατά την γήρανση είναι καρβοξυλικά οξέα (Lin, Argon, 1994). Αυτά είναι τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης φωτός και οξυγόνου που αντιδρούν με τα δομικά ελαττώματα καθώς και στη δράση των μικροοργανισμών του βιοφίλμ στην επιφάνεια των πλαστικών του LDPE. Στα διαγράμματα για το κάθε ένα ενυδρείο στην περιοχή αυτή παρουσιάζεται η τιμή της απορρόφησης για κάθε μήνα.

Όλα τα ενυδρεία παρουσιάζουν μια αυξητική τάση πετυχαίνοντας τον τελευταίο μήνα μέγιστη απορρόφηση με εξαίρεση το ενυδρείο D, το οποίο στον 4<sup>ο</sup> μήνα μειώθηκε συγκριτικά με τον 3<sup>ο</sup>.





*Εικόνα 34 : Βιοφίλμ στην επιφάνεια του LDPE τον 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα*

Είναι φανερό από την εικόνα 34, πως το βιοφίλμ έχει σχηματίσει μία παχιά στρώση στην επιφάνεια του LDPE κατά τον 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα. Αυτό, «μπλόκαρε» την ηλιακή ακτινοβολία κατά τους μήνες αυτούς οπότε τα αποτελέσματα στα διαγράμματα φανερώνουν πως η αποδόμηση τους μήνες αυτούς είναι βιοαποδόμηση και όχι φωτοαποδόμηση.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την έρευνά μας φάνηκε πως οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί των δειγμάτων, μπορούν να ευδοκιμήσουν και να αναπτυχθούν επιτυχώς σε περιβάλλον όπου η μοναδική πηγή άνθρακα είναι τα πλαστικά PS και LDPE.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα κάθε ενυδρείου παρατηρούμε ότι το ενυδρείο Β, δίνει καλύτερα αποτελέσματα αφού

- Παρατηρήθηκε έντονη φωτοαποδόμηση,
- Η ταχύτητα καθίζησης είχε ισχυρά ανοδική πορεία

Απο τα διαγράμματα μείωσης του βάρους, παρατηρούμε ότι το LDPE έχει μεγαλύτερης μείωση βάρους σε σχέση με το PS. Αντίστοιχες ενδείξεις δίνει και η μικροβιακή ανάπτυξη. Βρέθηκαν νανοπλαστικά που πιθανόν να είναι από το θρυμματισμό του LDPE για το ενυδρείο C, αφού το PS το 2<sup>ο</sup> μήνα δεν παρουσίασε ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Στο διάστημα 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα παρατηρήθηκε μείωση των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών EPS και συγκεκριμένα των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων σε σχέση με τη σχετική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια των πλαστικών. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται επίσης από την αύξηση του ρυθμού της μικροβιακής ανάπτυξης και των EPS τον 4ο μήνα.

Η βιοαποδόμηση των μικροσφαιριδίων από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς αποδεικνύεται από την αύξηση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, σε συνδυασμό με την μέγιστη μικροβιακή ανάπτυξη και την μέγιστη απώλεια βάρους κατά τον 4ο μήνα.

Είναι γεγονός ότι η βιοαποδόμηση των πλαστικών στο φυσικό περιβάλλον είναι μια πολύ αργή διαδικασία. Σε συνδυασμό με την αύξηση των πολυμερών ουσιών και την μικροβιακή ανάπτυξη από τον 4<sup>ο</sup> μήνα και μετά, διαπιστώνεται ότι οι 4 μήνες είναι ελάχιστος χρόνος για την πλήρη αποδόμηση των πλαστικών.

## 5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Το πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος από πλαστικά απορρίμματα παίρνει πλέον ανησυχητικές διαστάσεις και έτσι ένας σημαντικός αριθμός ερευνών πραγματοποιούνται για τη μελέτη των συνθηκών της βιοαποδόμησης του πολυστυρενίου και του πολυπροπυλενίου από μικροοργανισμούς, τόσο της θάλασσας όσο και του εδάφους.

Με αυτό το δεδομένο, ίσως είναι σημαντικό (αν όχι απαραίτητο) να ενταθούν οι προσπάθειες προς την κατεύθυνση αυτή.

Σας συνέχεια των παραπάνω, θα μπορούσε να οργανωθεί έρευνα όπου θα συνδυαστούν και άλλοι παράγοντες π.χ. θερμοκρασία και πίεση. Επειδή κάποιες από τις διεργασίες αυτές που μελετήθηκαν σε φυσικό περιβάλλον γίνονται σε κάποιο βάθος, θα μπορούσαν να προσομοιωθούν συνθήκες διαφορετικής πίεσης-θερμοκρασίας και να μελετηθεί η αντίστοιχη συμπεριφορά.

Η θερμοκρασία στις προσομοιωμένες συνθήκες του εργαστηρίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια ημέρας-νύχτας, ενώ η θερμοκρασία της θάλασσας επειδή, αλλάζει με πολύ αργούς ρυθμούς, μπορεί να θεωρηθεί περίπου σταθερή στα χρονικά διαστήματα που διεξάγεται η έρευνα.

Η υδροστατική πίεση επίσης στο εργαστήριο είναι ελάχιστη. Δηλαδή τα δείγματά μας βρίσκονται σε πίεση όση και η ατμοσφαιρική (1 ατμόσφαιρα). Σε κάποιο όμως βάθος αυτή αυξάνεται. ( $1 \text{ Atm} = 760 \text{ χιλιοστά στήλης υδραργύρου} = 760 \text{ mm Hg}$ , πυκνότητα  $\text{Hg } 13,6 \text{ gcm}^{-3}$ ) δηλαδή κάθε 13,6m βάθος η πίεση αυξάνεται κατά 1 atm.

Θα είναι λοιπόν ενδιαφέρον να προσομοιωθούν πειραματικά διαφορετικές συνθήκες και να μελετηθεί έτσι η συμπεριφορά μικροοργανισμών που αποδομούν πλαστικό σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Βέβαια, αυτό αφορά μόνο το πλαστικό PS καθώς το LDPE δεν βυθίζεται.

Επίσης θα ήταν ακόμα ενδιαφέρον να δούμε τη συμπεριφορά των πλαστικών αυτών αν πρώτα γηρανθούν με ακτινοβολήση, για κάποιο χρονικό διάστημα, και έπειτα τοποθετηθούν στο ενυδρείο με τις ίδιες συνθήκες.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Έκθεση Ευρωπαϊκής Επιτροπής 2018, *Ευρωπαϊκή στρατηγική για τις πλαστικές ύλες σε μια κυκλική οικονομία*, Στρασβούργο [http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0262\\_EL.html](http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0262_EL.html)

Οδηγία 2015/720 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, *“Μείωση της κατανάλωσης λεπτών πλαστικών σακουλών μεταφοράς”*, Publications Office of the EU  
<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/58d93aee-f3bc-11e4-a3bf-01aa75ed71a1/language-el>

ACC 2011, *“Q & A on the Safety of Polystyrene Foodservice Products”*. American Chemistry Council. (ACC) 2010–2011. Retrieved 2011.

ACC 2012, *“Common Plastic Resins Used in Packaging. Introduction to Plastics Science Teaching Resources.”* American Chemistry Council, Inc. Retrieved 24 December 2012.

Adelhafidil A. Babaghayou M. Chabira F. Sebaa M. *Impact of Solar Radiation Effects on the Physicochemical Properties of Polyethylene (PE) Plastic Film* *Procedia - Social and Behavioral Sciences* Volume 195, 3 July 2015, Pages 2210-2217  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877042815037817>

Anthony A. and Neal M. 2009 *“Applications and societal benefits of plastics”* The Royal Society Λονδίνο Ιούλιος 2009

Arthur, C., Baker J. and Bamford H.. 2009. *“Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic”*, National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum, Tacoma, USA

Balasubramanian V, Natarajan K, Hemambika B, Ramesh N, Sumathi CS, Rajesh Kannan 2010, *“High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India”*, NCBI The National Center for Biotechnology Information

Bandyopadhyay, A.; Basak, G. Chandra (2013). *“Studies on photocatalytic degradation of polystyrene”*. *Materials Science and Technology*. 23 (3): 307–314. doi:10.1179/174328407X158640.

Barnes, D., Galgani F., Thompson R., Barlaz M.,. 2009. *“Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments.”* *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, London 2010 .

Biello D. 2006. *“Bacteria Turn Styrofoam into Biodegradable Plastic”*. *Scientific American*

Cohen JT, Carlson G, Charnley G, Coggon D, Delzell E, Graham JD, Greim H, Krewski D, Medinsky M, Monson R, Paustenbach D, Petersen B, Rappaport S, Rhomberg L, Ryan PB, Thompson K (2011). *“A comprehensive evaluation of the potential health risks associated with occupational and environmental exposure to styrene”*. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*. 5 (1–2): 1–265. doi:10.1080/10937400252972162. PMID 12012775. Lay summary – The McLaughlin Centre for Population Health Risk Assessment.

- D. Hadad S. Geresh A. Sivan "Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*", έκδοση πανεπιστημίου Beer Sheva 2005 Ισραήλ
- Davis D. Monroe D. 2007 "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" *PLoS Biology*
- Derraik J. 2002, "The pollution of the marine environment by plastic debris: a review", *Marine pollution bulletin* 2002
- Douminge, P. 2010 "Etude du comportement du polyéthylène haute densité sous irradiation ultraviolette ou sollicitation mécanique par spectroscopie de fluorescence" (thesis) (2010), pp. 90-105
- Duddu M, Tripura K, Guntuku G, Divya D. " Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by a new biosurfactant-producing thermophilic *Streptomyces coelicoflavus*" *NBRC African J Biotech* 2015, S. Africa
- Eccleston and Hart 2016, " *Recycling and the Environment*", Retrieved 21 London
- Entine, J. 2011, "Styrene in the Crosshairs: Competing Standards Confuse Public, Regulators". American Enterprise Institute.[unreliable source?]
- EPA 2018, "Global Warming Potentials of ODS Substitutes", United States Environmental Protection Agency EPA.gov
- EPA, 2017. "Overview of Greenhouse Gases", United States Environmental Protection Agency
- EPNOE, "Etymology of main polysaccharide names", The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) Wien.
- EPS "recycling". Eccleston & Hart Polystyrene. Retrieved 21 July 2016. European Parliament Research Service
- F. Gugumus 1990 "Mechanisms of photooxidation of polyolefins" *Die Makromolekulare Chemie* Volume176, Issue1, Weinheim, Germany  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/apmc.1990.051760102>
- FDA 2014 "Sec. 177.1640 Polystyrene and rubber-modified polystyrene". *Code of Federal Regulations, Title 21—Food and Drugs, Subchapter B—Food for Human Consumption. U.S. Food and Drug Administration FDA*. Retrieved 4 April 2014
- Flemming H., Thomas R., Wozniak D., 2007 "The EPS Matrix: The House of Biofilm Cells", περιοδικό *Journal of Bacteriology*, τεύχος 189 Germany
- Fong J, Yildiz F 2015 "Biofilm Matrix Proteins", περιοδικό *Microbiology Spectrum* California, US
- Gardiner H., 2011. "Government Says 2 Common Materials Pose Risk of Cancer". *New York Times*. Retrieved 11 June 2011.
- GESAMP, 2015 "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment", INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, London

- Gilan et al., Irit Gilan, Alex Sivan 2004 "Colonization, biofilm formation and biodegradation of Polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*" Περιοδικό Applied Microbiology and Biotechnology τεύχος 65, σελ. 97-104
- Grbic-Galic D. 1991, "Anaerobic Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons, Developments in Petroleum Science" Volume 31, Pages 145-161
- Halle T, Ladirat L, Gendre X, Goudouneche D, Pusineri C, Routaboul C, Tenailleau C, Duployer B, Perez E. 2016. "Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris." Environmental Science and Technology 50 (11): 5668–75. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00594>.
- Herron Zamora, Jim (28 June 2006). "Styrofoam food packaging banned in Oakland". San Francisco Chronicle. Retrieved 23 December 2012.
- Hevesi, D. 1990, "Ban on Plastics in Suffolk Is Overturned". The New York Times. Retrieved 23 December 2012.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. 2012 "Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification", Environmental Science & Technology, California US
- Hofer, Tobias N. (2008). "Marine pollution: new research. " New York: Nova Science Publishers. p. 59. ISBN 978-1-60456-242-2.
- Jambeck J. R., R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, K. L. Law, 2015, "Plastic waste inputs from land into the ocean" Science 347, 768–771
- Kalogerakis N., Karkanorachaki K., Kalogerakis C., Triantafyllidi E, Gotsis A, Partsinevelos P., Fava F. 2017. "Microplastics Generation : Onset of Fragmentation of Polyethylene Films in Marine Environment Mesocosms" 4 (March): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00084>
- Kumar Harshvardhanab, Bhavanath Jha, "Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea" περιοδικό "Marine Pollution Bulletin", τεύχος 77, December 2013 India <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13006462?via%3Dihub>
- Kwon BG, Saido K, Koizumi K, Sato H, Ogawa N, Chung SY, Kusui T, Koderia Y, Kogure K, et al. (May 2014). "Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii". Environmental Pollution. 188: 45–9. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.019. PMID 24553245.
- Kyaw BM, Champakalakshmi R, Sakharkar MK, Lim CS, Sakharkar KR. "Biodegradation of low-density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species". J Microbiol 2012 India
- Lacoste J. Carlsson D.J. Wiles D.M. 1991 "Polyethylene hydroperoxide decomposition products, Polymer Degradation and Stability" Volume 34, Issues 1–3, , Pages 309-323 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014139109190125B>
- Leszek U., Charles W., 2003 "Polymer Blends Handbook, Springer Science & Business Media", Dordrecht, Holland <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-94-007-6064-6%2F1.pdf>

- Li W., Tse F., and Fok L. 2016. "Plastic Waste in the Marine Environment: A Review of Sources, Occurrence and Effects." *Science of the Total Environment* 566–567: 333–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084>
- Lin L. Argon S. 1994 "Structure and plastic deformation of polyethylene *Journal of Materials Science*, Volume 29, Issue 2, pp 294–323 <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01162485>
- Maier, Raina M. 2009. "Bacterial Growth." *Environmental Microbiology*: 37–54
- Maul, J.; Frushour, B. G.; Kontoff, J. R.; Eichenauer, H.; Ott, K.-H. and Schade, C. (2007) "Polystyrene and Styrene Copolymers" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim Germany
- Mills J., 2011, "Polyester & Cotton: Unequal Competitors," Tecnon OrbiChem presentation at Association Française Cotonnière (AFCOT), Deauville, France.
- Morohoshi T., Xie X., Ikeda T., 2018 "N-Acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing regulates biofilm structure", *Περιοδικό , τεύχος 83*, Japan
- National Toxicology Program 2011. "12th Report on Carcinogens". National Toxicology Program. Archived from the original on 12 June 2011. Retrieved 11 June 2011.
- Newman S., Watkins e., Farmer A., Brink P., Schweitzer J.P. 2015. "The Economics of Marine Litter." Springer International Publishing. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16510-3\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16510-3_14)
- PlasticsEurope, Plastics – "the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data for 2017 in Europe" (PlasticsEurope publications, 2017)
- PlasticsEurope, Plastics—"The Facts 2015: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data" (PlasticsEurope publications, 2015).
- PPC, " Polystyrene Recycling". Polystyrene Packaging Council PPC Retrieved 6 March 2009.
- Roberts J., Caserio M. 1977, "Basic principles of organic chemistry", W. A. Benjamin, Inc , California USA
- Rochman C. Tahir A., Williams S, Baxa D., Lam R, Miller J, The F., Werorilangi S, Teh S. "Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption", *Scientific Reports* volume 5, Article number: 14340 (2015)
- Roi Mor και Alex Sivan, 2008, "Biodegradation", Springer Nature, Ελβετία  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-008-9188-0>
- Ryan PG, Moore CJ, van Franeker JA, Moloney CL (2009). *Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment*, The Royal society publishing, London
- Scheirs J. Priddy D. 2003 "Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers". John Wiley & Sons. p. 3. ISBN 978-0-471-49752-3.
- Scheirs J; Priddy D 2003. "Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers". John Wiley & Sons. Australia

Schnurr, Riley E.J.; Alboiu, Vanessa; Chaudhary, Meenakshi; Corbett, Roan A.; Quanz, Meaghan E.; Sankar, Karthikeshwar; Srain, Harveer S.; Thavarajah, Venukasan; Xanthos, Dirk; Walker, Tony R. (2018). *"Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A review"*. Marine Pollution Bulletin. 137: 157–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.10.001.

Stoodley H., Costerton JW, Stoodley P. 2004 *"Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases"*, Nat Rev Microbiol, Montana, USA.

Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AW, McGonigle D, Russell AE 2004. *"Lost at Sea: Where Is All the Plastic?"* Science

Tidjani A., Arnaud R., 1993 *"Gamma-oxidation of linear low density polyethylenes"*, Journal: Polymer Science Part A Polymer Chemistry 31:603 – 609  
[https://www.researchgate.net/publication/230486837\\_Gamma-oxidation\\_of\\_linear\\_low\\_density\\_polyethylenes\\_Ethylene-butene\\_and\\_ethylene-hexene\\_copolymers](https://www.researchgate.net/publication/230486837_Gamma-oxidation_of_linear_low_density_polyethylenes_Ethylene-butene_and_ethylene-hexene_copolymers)

Tribedi P., Alok K. Sil, 2012 *"Low-density polyethylene degradation by Pseudomonassp. AKS2 biofilm"*, περιοδικό Environmental Science and Pollution Research, Ελβετία

Whitchurch C., Tolker-Nielsen T, Ragas P., Mattick J. 2002 *"Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation"*, περιοδικό Science, US

Won B., Saido K, Koizumi K, Sato H, Ogawa N, Chung SY, Kusui T, Kodera Y, Kogure K, et al. (May 2014). *"Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii"*. Environmental Pollution. 188: 45–9. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.019. PMID 24553245.

Wunsch, J.R. (2000). *"Polystyrene – Synthesis, Production and Applications"*. Smithers Rapra Publishing. p. 15. ISBN 978-1-85957-191-0. Retrieved 25 July 2012.

WWF αναφορά 2018,<http://www.wwf.gr/images/pdfs/med-plastic-report.pdf>