



Πολυτεχνείο Κρήτης

Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

**ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ LDPE
ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

ΔΑΣΕΝΑΚΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ



ΧΑΝΙΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, 2019

«Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσα εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή 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

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ LDPE ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

ΔΑΣΕΝΑΚΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ

Τριμελής Επιτροπή :

Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Βενιέρη Δανάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Δρ. Ευδοκία Συρανίδου

«Το νερό και ο αέρας τα δύο ζωτικά ρευστά
από τα οποία εξαρτάται όλη η ζωή έχουν
γίνει παγκόσμιοι σκουπιδοτενεκέδες.»

Jacques-Yves Cousteau

«Αν υπάρξει μέλλον, θα είναι πράσινο»

Petra Kelly

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον κ. Νικόλαο Καλογεράκη, επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω πάνω σε αυτό το πολύ ενδιαφέρον θέμα, η διαδικασία του οποίου με βοήθησε ειλικρινά για τις μετέπειτα αποφάσεις μου. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να βρίσκομαι έστω και λίγο μέλος ενός σπουδαίου εργαστηρίου.

Επίσης να ευχαριστήσω θερμά την κ. Δανάη Βενιέρη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, η οποία αφιέρωσε τον χρόνο της για να διαβάσει και να αξιολογήσει την παρούσα διπλωματική.

Ένα ιδιαίτερο και μεγάλο ευχαριστώ στην Dr. Συρανίδου Ευδοκία, μέλος της τριμελούς επιτροπής, η οποία δέχτηκε να συνεργαστεί μαζί μου και έλυσε όλες μου τις απορίες με μεγάλη επιτυχία. Με βοήθησε να καταλάβω πολλά πράγματα για το εργαστήριο, το πως συμπεριφέρονται οι μικροοργανισμοί και γενικά με βοήθησε να συλλάβω με αρκετή παραστατικότητα και φαντασία, τον μικρόκοσμο. Η επικοινωνία μας ήταν άψογη και ήταν σχεδόν πάντα εκεί διαθέσιμη αν χρειαζόμουν κάτι.

Ένα ακόμα άτομο που ήταν πάντα εκεί και χρωστάω ένα τεράστιο ευχαριστώ είναι η υποψήφια Διδάκτωρ, Καρκανοραχάκη Αικατερίνη, η οποία με καθοδήγησε αρχικά στο εργαστήριο και με βοήθησε όποτε χρειάστηκα ένα δεύτερο χέρι ή οποτεδήποτε είχα μια μικρή απορία για το οτιδήποτε μέσα στο εργαστήριο αλλά και εκτός αυτού. Την ευχαριστώ για την υπομονή, την άμεση υποστήριξη που έδειξε σε μένα αλλά και για την παρέα που κάναμε.

Βέβαια δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, πιο συγκεκριμένα την Πετρούλα Σερίδου, η οποία κίολας βοήθησε να συντελεστεί ένα μέρος των μετρήσεων, την Γεωργία Χαραλάμπους και την Αργυρώ Λακιωτάκη για την ανοχή που έδειξαν στις ερωτήσεις μου μέχρι να μάθω που βρίσκεται τι μέσα στο εργαστήριο, και όχι μόνο, και την κ. Αριάδνη Παντίδου που φρόντιζε να μη μας λείπει τίποτα από το εργαστήριο. Σας ευχαριστώ όλους, εννοείται και για την παρέα που κάναμε τις δύσκολες και τις εύκολες μέρες.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην απόφοιτη πλέον πρώην συμφοιτήτριά μου και πολύ καλή μου φίλη, Αγιουτάντη Ροζαλία, η οποία με φιλοξένησε στο σπίτι της για ένα διάστημα που χρειαζόταν να είμαι στα Χανιά, για την συγγραφή. Χωρίς αυτήν την ησυχία και μοναχικότητα, η συγγραφή της διπλωματικής φάνταζε ακατόρθωτη.

Ένα τελευταίο πολύ μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στους γονείς μου, που παρόλες τις δυσκολίες τους ήταν πάντα εκεί για μένα και με στήριξαν καθ' όλη την διάρκεια όχι μόνο της διπλωματικής μου, αλλά και των φοιτητικών μου χρόνων. Τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την τεράστια υπομονή που έδειξαν στη διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής αλλά και για τα πράγματα που μου πρόσφεραν απλόχερα χωρίς ποτέ να ζητήσουν αντάλλαγμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πλαστική ρύπανση είναι το κύριο περιβαλλοντικό θέμα που μαστίζει τον πλανήτη Γη, εδώ και πολλά χρόνια, αφότου το πλαστικό εισχώρησε στην καθημερινότητα της ανθρωπότητας. Την τελευταία δεκαετία η πλαστική ρύπανση έχει γίνει ευρέως διαδεδομένη, καθώς πολύ συχνά θα παρατηρηθεί μια ανάρτηση, ή κάποιο άρθρο για αυτήν, στο διαδίκτυο. Το διαδίκτυο έχει βοηθήσει στην ενημέρωση και ευαισθητοποίηση περισσότερων ανθρώπων σχετικά με αυτή, και έχει συμβάλλει στο να πραγματοποιηθούν δράσεις τα τελευταία χρόνια για την καταπολέμηση της. Η ρύπανση εντοπίζεται κυρίως στους ωκεανούς, όπου δεν είναι εύκολα διακριτή λόγω της απεραντοσύνης, που τους χαρακτηρίζουν. Επομένως η ρύπανση, δεν εμφανίστηκε τα τελευταία χρόνια. Ήταν πάντα εκεί. Από την μαζική παραγωγή πλαστικών υλικών μετά το πέρας του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου, μέχρι σήμερα. Η ετήσια παραγωγή τους αυξάνεται εκθετικά με τον χρόνο, ως συνέπεια αυτού εκθετικά αυξάνονται και τα απορρίμματα τους. Μεγάλο μέρος αυτών καταλήγει στους ωκεανούς. Τα πλαστικά απορρίμματα που εισχωρούν στην θάλασσα ποικίλουν σε μέγεθος, και τύπο. Τα περισσότερα από αυτά αποτελούνται από πλαστικά μιας χρήσης καθώς έχουν, όπως είναι λογικό, μικρή διάρκεια κατανάλωσης (θα μπορούσαν δηλαδή να θεωρηθούν ως απορρίμματα την στιγμή που παρήχθησαν).

Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό αυτών των πλαστικών αποτελείται από χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (LDPE). Πέρα από τις αρνητικές επιπτώσεις που προκαλούν τα πλαστικά απορρίμματα, δεν μένουν στάσιμα, αλλάζουν μέγεθος. Λόγω της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας, της μηχανικής καταπόνησης (κύματα, αέρας, άμμος), των υψηλών θερμοκρασιών (κυρίως στις παραλίες) και της μικροβιακής δράσης, τα πλαστικά έχουν την τάση να θρυμματίζονται σε μικρότερα κομμάτια. Καθώς κάποιοι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί καταφέρνουν να διασπούν τον άνθρακα από το πλαστικό και να τρέφονται με αυτόν, τα πολύ μικρής κλίμακας κομμάτια που δημιουργούνται από την διαδικασία αυτή, μπορούν αν αποδειχτούν καταστροφικά για ολόκληρο το γήινο οικοσύστημα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σακούλες LDPE, στις οποίες ύστερα από 7 μήνες έκθεσης τους σε UV-A ακτινοβολία, ασκήθηκε ήπια μηχανική καταπόνηση με σκοπό να δημιουργηθούν δευτερογενή μικροπλαστικά (250μm – 2mm). Στη συνέχεια τα μικροπλαστικά μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες και εμβολιάστηκαν με δύο διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες, η μια από τον κόλπο του Αγίου Ονουφρίου και η άλλη από τον κόλπο της Σούδας, Χανίων. Το πείραμα διήρκεσε 4 μήνες. Κάθε μήνα πραγματοποιούνταν μετρήσεις βάρους, μικροβιακής ανάπτυξης, διασποράς διαμέτρου στο διηθούμενο υγρό, εξωκυτταρικών πολυμερών (EPS) και χημικής σύστασης της επιφάνειας των μικροπλαστικών. Σκοπός των μετρήσεων αυτών, είναι η μελέτη της επίδρασης των μικροβιακών κοινοτήτων στα δευτερογενή μικροπλαστικά σε θαλάσσιο προσομοιωμένο περιβάλλον, με μόνη πηγή άνθρακα το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE).

Οι μικροοργανισμοί κατάφεραν να αναπτυχθούν και να βιοαποδομήσουν την επιφάνεια των μικροπλαστικών. Στην φασματογραφία του 4^{ου} μήνα και των 2 μικροβιακών κοινοτήτων φαίνεται διακριτά η επίδραση που προκαλούν στους δεσμούς της επιφάνειας των μικροπλαστικών.

ABSTRACT

Plastic pollution has been the main environmental issue plaguing planet Earth for many years since plastic has entered humanity's everyday life. Plastic pollution has become widespread in the last decade, as a post, or article about it, will often be seen on the internet. The internet itself has helped to inform growing numbers of people and to raise awareness about plastic pollution, and has also helped to take action in recent years to combat it. Pollution, however, is found mainly in the oceans, where due to their vastness it is not easily distinguishable. Therefore, pollution is not a new phenomenon. It was always there. From the mass production of plastics after the end of World War II, to the present day. Their annual production increases exponentially with time and, as a result, their waste increases exponentially as well. Much of it ends up in the oceans. Plastic waste that enters the sea varies in size and type. Most waste consists of disposable plastics, obviously due to their short-term use (we could already consider them as waste at the time of their production).

A large proportion of these plastic comprises low density polyethylene (LDPE). In addition to the negative effects of plastic waste on marine and non-marine organisms, plastics do not remain stationary, but rather change in size. Due to UV radiation, mechanical stress (waves, wind, sand), high temperatures and microbial activity, plastics tend to break down into smaller pieces. As some marine micro-organisms manage to biodegrade plastic, the tiny particles created by this process could prove catastrophic for the entire global ecosystem.

In the following experiment, some low-density polyethylene (LDPE) bags were used. After 7 months of exposure to UV-A radiation, mild mechanical stress was applied to create secondary microplastics (250mm - 2mm). The microplastics were then divided into conical flasks and inoculated with two different microbial communities, one from the Bay of Agios Onoufrios and the other from the Gulf of Souda. Both areas are located in Chania, Crete. The experiment lasted 4 months. Weight changes, microbial growth, diameter dispersion in the filtered fluid, extracellular polymers (EPS) and the chemical composition of the microplastic surface were measured monthly. The purpose of these measurements is to study the effect of microbial communities on secondary microplastics in a marine simulated environment with low density polyethylene (LDPE) as a sole carbon source.

Microorganisms have been able to grow and biodegrade the surface of microplastics in these 4 months. The spectroscopy of the 4th month for both of microbial communities shows the effect they cause on the surface bonds of the microplastics.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1.	Πλαστικά	10
1.1.1.	Ιστορία πλαστικών	10
1.1.2.	Κατηγορίες πλαστικών	11
1.1.3.	Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών	12
1.1.4.	Χρήσεις πλαστικού και απορρίμματα	14
1.1.5.	Πλαστικά στη θάλασσα και επιπτώσεις	17
1.2.	Μικροπλαστικά	22
1.2.1.	Κατηγορίες μικροπλαστικών	22
1.2.2.	Πρωτογενή μικροπλαστικά	22
1.3.	Νανοπλαστικά	24
1.4.	Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE)	25
2.	ΣΚΟΠΟΣ	26
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1.	ΥΛΙΚΑ	26
3.2.	Μέθοδοι	27
3.3.	Προετοιμασία δειγμάτων	27
3.4.	Ανάπτυξη μικροοργανισμών	27
3.5.	Έναρξη πειράματος	31
3.5.1.	Δειγματοληψία	32
3.5.2.	Μετρήσεις Βάρους	32
3.5.3.	Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού	33
3.5.4.	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών	34
3.5.5.	Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων	36
3.5.6.	Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών	37
3.5.7.	Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)	38
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
4.1.	Μείωση βάρους LDPE	40
4.2.	Πληθυσμός μικροβιακών κοινοτήτων	41
4.3.	Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS)	42
4.3.1.	Υπολογισμός ολικών πρωτεϊνών	43
4.3.2.	Υπολογισμός υδατανθράκων	44
4.4.	Κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών	44
4.4.1.	Κατανομή μεγέθους για την κοινότητα “Agios”	45
4.4.2.	Διάγραμμα “Number”	45

4.4.3.	Διάγραμμα “Volume”	46
4.4.4.	Σχολιασμός αποτελεσμάτων	46
4.4.5.	Κατανομή μεγέθους για την κοινότητα “Souda”	47
4.4.6.	Διάγραμμα “Number”	47
4.4.7.	Διάγραμμα “Volume”	48
4.5.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)	49
4.5.1.	Κοινότητα “Agios”	50
4.5.2.	Κοινότητα “Souda”	53
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
6.1.	Διαδίκτυο	60

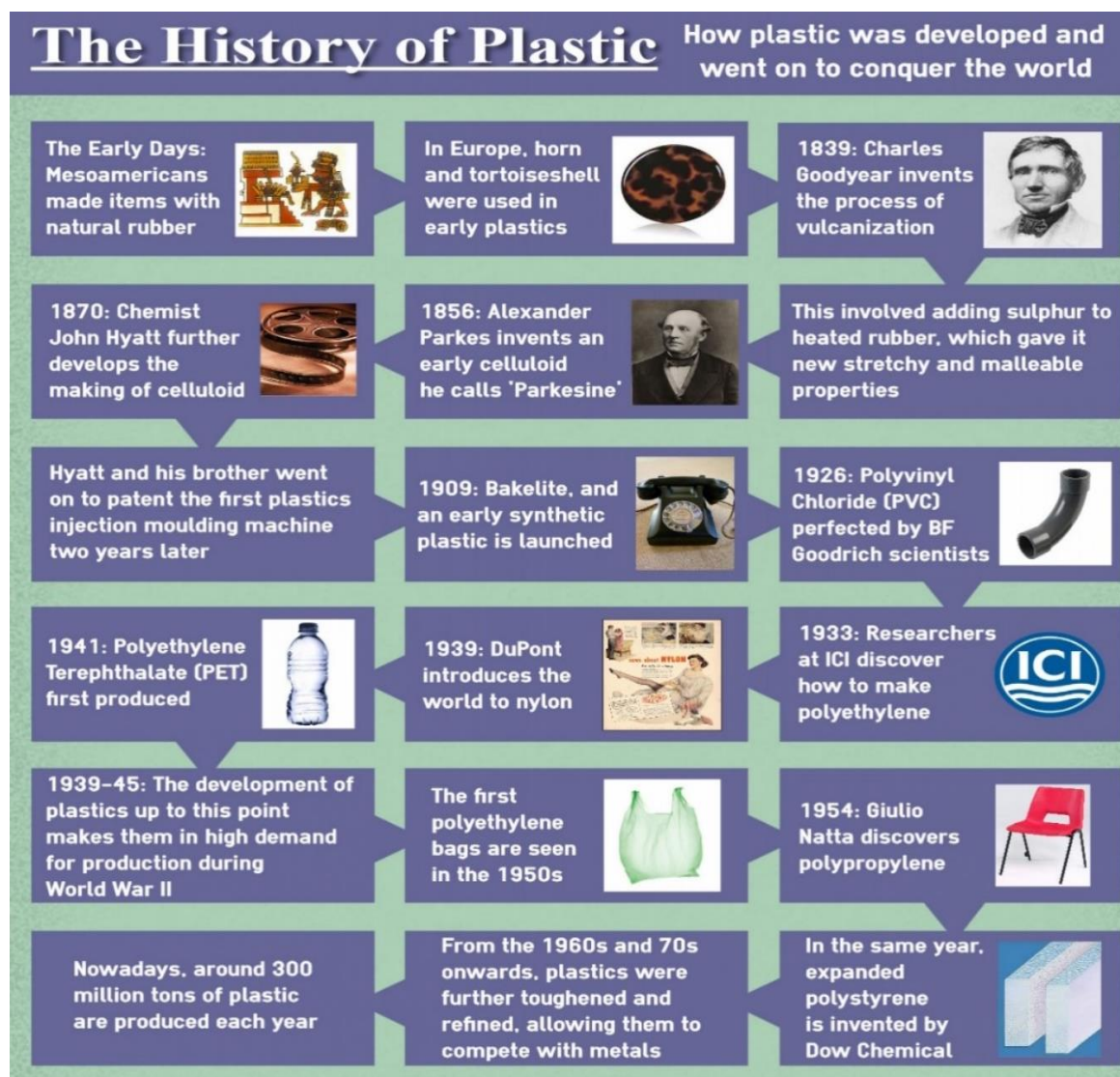
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Το πλαστικό προέρχεται από την ελληνική λέξη «πλάσσω» και σημαίνει «αυτός που μπορεί να διαμορφωθεί». Έτσι λόγω της πολυμορφικότητας και της ελαστικότητας του υλικού, ο όρος πλαστικό χρησιμοποιήθηκε ευρέως για να περιγράψει μια εκτενή ποικιλία συνθετικών ή μη συνθετικών στερέων υλικών (ρητίνες, πολυμερή) τα οποία χρησιμοποιούνται σε τεράστια και συνεχώς αναπτυσσόμενη εμβέλεια εφαρμογών. Όπου και να κοιτάξεις πλέον υπάρχει πλαστικό (PlasticsEurope 2019). Το πλαστικό είναι το υλικό που έχει ενσωματωθεί στην καθημερινότητα της ανθρωπότητας και αποτελεί βασικό υλικό για τις περισσότερες εφαρμογές που εκτελεί ο άνθρωπος.

Από την εφεύρεση του έως τώρα χάρη στην πολυλειτουργικότητα και την πολυχρηστικότητα του, την μεγάλη ανθεκτικότητα του, το χαμηλό κόστος παραγωγής του και την ιδιότητα του να παίρνει οποιοδήποτε σχήμα έχει αλλάξει ριζικά την ανθρωπότητα, από την καθημερινότητα της έως τις βασικές της ανάγκες.

1.1.1. Ιστορία πλαστικών



Εικόνα 1: Ιστορία πλαστικού (Πηγή:visual.ly)








Καθώς παρατηρούμε την εξέλιξη του πλαστικού στην Εικόνα 1, διαπιστώνουμε ότι η πρώτη επαφή του ανθρώπου με τα πολυμερή ήταν διάμεσου του φυσικού καουτσούκ (India rubber). Οι πρώτες προσπάθειες για την ανακάλυψη του πολυμερές μας πάει πίσω στο 1856, όπου ο Alexander Parkes ανακαλύπτει την παρκεσίνη, το πρώτο υλικό κοντά στο κυτταρινοειδές (celluloid), για να έρθει το 1870 ο John Wesley Hyatt στην έρευνα του για ένα υποκατάστατο του ελεφαντόδοντου και να εξελίξει κι άλλο το κυτταρινοειδές (celluloid), το όπου χρησιμοποιήθηκε για μπάλες μπιλιάρδου και φωτογραφικό φιλμ.

Το πρώτο όμως συνθετικό πολυμερές που μοιάζει περισσότερο με το σημερινό πλαστικό είναι ο βακελίτης, ο οποίος εφευρέθηκε από τον Leo Baekeland το 1909. Ο βακελίτης έχει την ιδιότητα να παίρνει οποιοδήποτε σχήμα όταν τον θερμαίνεις και μετατρέπεται σε ένα σκληρό υλικό όταν κρυώνει. Χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευαστούν χερούλια, τηλέφωνα, εξαρτήματα αυτοκινήτων, έπιπλα ακόμα και κοσμήματα. Η εφεύρεση του βακελίτη οδήγησε σε πολλές άλλες εφευρέσεις με σχετικά παρόμοιες ιδιότητες και άνοιξε τον δρόμο για να ανακαλυφθούν οι σημερινοί τύποι πλαστικών.

Η χρήση των πλαστικών είχε περιοριστεί αρχικά για ανάγκες πολέμου και έτσι η εκμετάλλευση των πλεονεκτημάτων του υλικού ήταν μονόπλευρη. Αφού ο Β΄ Παγκόσμιος Πόλεμος έλαβε τέλος και οι ανάγκες αυτές με τη σειρά τους έλαβαν τέλος, με αποτέλεσμα το πλαστικό να υπερισχύσει απέναντι σε όλα τα άλλα «παραδοσιακά» έως τότε υλικά της αγοράς και να τα αντικαταστήσει (πχ. το ξύλο στα έπιπλα, το μέταλλο στα αμάξια, το χαρτί και το γυαλί στις συσκευασίες). Σιγά σιγά το πλαστικό άρχισε να διεισδύει στην καθημερινότητα της ανθρωπότητας, βελτιώνοντας την σε θέματα υγιεινής, υγείας, αθλητισμού, συντήρησης τροφίμων, τεχνολογικά και σε διάφορους άλλους τομείς κυρίως λόγω της ανθεκτικότητας, της πολυλειτουργικότητας και του χαμηλού κόστους παραγωγής του.

1.1.2. Κατηγορίες πλαστικών

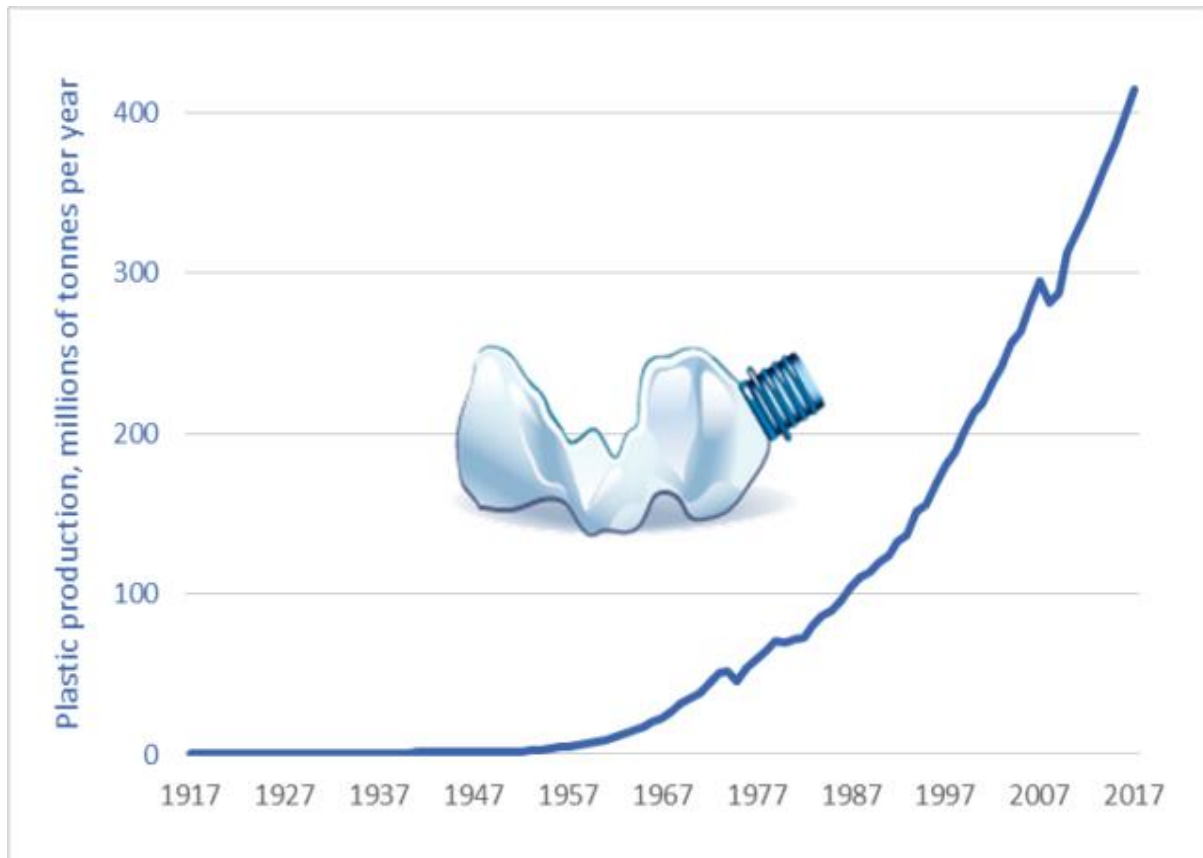
Τα πλαστικά χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες. Τα θερμοσκληρυνόμενα πλαστικά και τα θερμοπλαστικά. Τα θερμοσκληρυνόμενα πλαστικά έχουν την ιδιότητα αφού κρυώσουν και σκληρύνουν να κρατούν αυτή την μορφή και δεν μπορούν να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται σε εξαρτήματα αυτοκινήτων, αεροπλάνων και λάστιχων. Τα θερμοπλαστικά από την άλλη είναι λιγότερο άκαμπτα και αν ζεσταθούν παίρνουν την αρχική τους μορφή. Είναι τα πιο πολυπληθής και ευρέως γνωστά πλαστικά γιατί χρησιμοποιούνται κυρίως για συσκευασίες. Οι τύποι των θερμοπλαστικών φαίνονται στην Εικόνα 2.

1	2	3	4	5	6	7
PETE	HDPE	PVC	LDPE	PP	PS	OTHER
polyethylene terephthalate	high-density polyethylene	polyvinyl chloride	low-density polyethylene	polypropylene	polystyrene	other plastics, including acrylic, polycarbonate, polyactic fibers, nylon, fiberglass
soft drink bottles, mineral water, fruit juice containers and cooking oil	milk jugs, cleaning agents, laundry detergents, bleaching agents, shampoo bottles, washing and shower soaps	trays for sweets, fruit, plastic packing (bubble foil) and food foils to wrap the foodstuff	crushed bottles, shopping bags, highly-resistant sacks and most of the wrappings	furniture, consumers, luggage, toys as well as bumpers, lining and external borders of the cars	toys, hard packing, refrigerator trays, cosmetic bags, costume jewellery, audio cassettes, CD cases, vending cups	an example of one type is a polycarbonate used for CD production and baby feeding bottles
						

Εικόνα 2: Τύποι θερμοπλαστικών (Πηγή: polychem-usa.com).

1.1.3. Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών

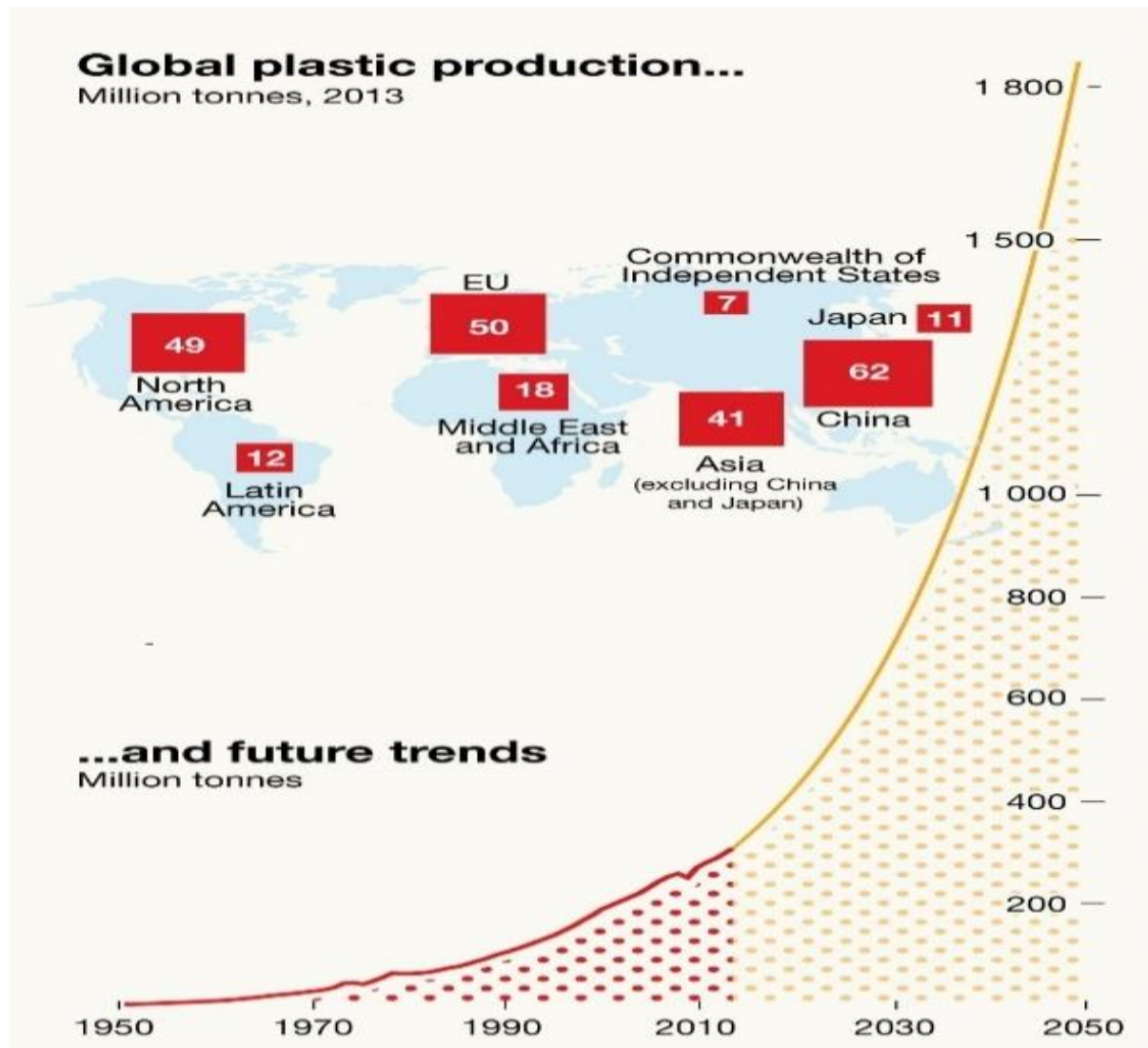
Μετά το τέλος του Β' Παγκοσμίου Πολέμου (1950), το πλαστικό όπως προαναφέρθηκε εισχώρησε την καθημερινότητα με αποτέλεσμα να αντικαταστήσει τα κοινά έως τότε υλικά και να αυξάνεται όλο ένα και περισσότερο η ανάγκη παραγωγής του. Στο διάγραμμα 1 φαίνεται η ραγδαία ετήσια αύξηση παραγωγής πλαστικού από το 1950 έως το 2017.



Διάγραμμα 1: Ετήσια παραγωγή πλαστικών (Πηγή: <https://www.darrinqualman.com>).

Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή ρητινών και ινών πλαστικού αυξήθηκε από 2 εκ. τόνους (1950), σε 380 εκ. τόνους (2015), ενώ η συνολική ποσότητα ρητινών και ινών πλαστικού που κατασκευάστηκαν από το 1950 έως το 2015 είναι 7,8 δις τόνοι, από το οποίο το μισό, δηλαδή 3,9 δις τόνοι παράχθηκαν τα τελευταία 13 χρόνια (Geyer, Jambeck, and Law 2017).

Στην Εικόνα 3 φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή ανά χώρα και η εκτίμηση της συνολικής ετήσιας αύξησης παραγωγής του πλαστικού μέχρι το 2050 σε εκατομμύρια τόνους.



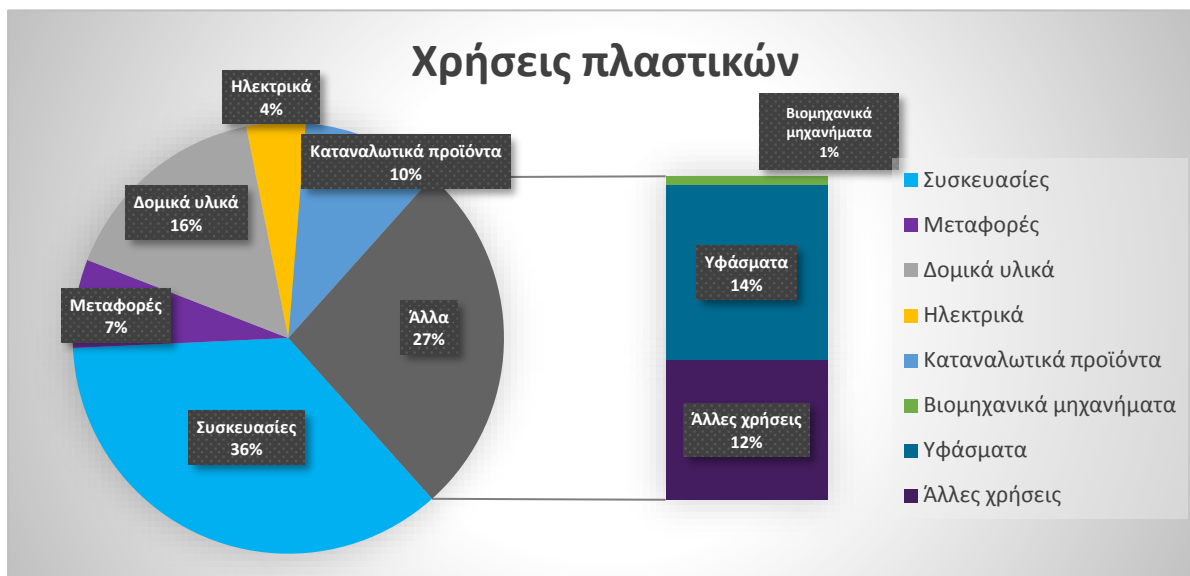
Εικόνα 3: Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών (Πηγή: grida.no).

Εκτιμάται, ότι μέχρι το 2025 η παραγωγή του αιθυλενίου και του προπυλενίου, δύο κύριοι πρόδρομοι για την παραγωγή πλαστικού θα αυξηθούν κατά 33-36%, δηλαδή περίπου 100 εκ. τόνοι ετησίως (Azoulay. et al. 2019).

Η Κίνα διαθέτει την μεγαλύτερη παραγωγή όπου φτάνει το 29.4% της συνολικής παραγωγής, ακολουθεί η Ευρώπη με 18,5% και NAFTA 17.7% (PlasticsEurope, 2018). Η παραγωγή του πλαστικού εν έτη 2019 ξεπερνάει τους 400 εκ. τόνους τον χρόνο. Από αυτά τα πλαστικά το 36% δηλαδή 144 εκ. τόνοι είναι παραγωγή πολυαιθυλενίου, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων είναι πλαστικό μιας χρήσης (Geyer, Jambeck, and Law 2017).

1.1.4. Χρήσεις πλαστικού και απορρίμματα

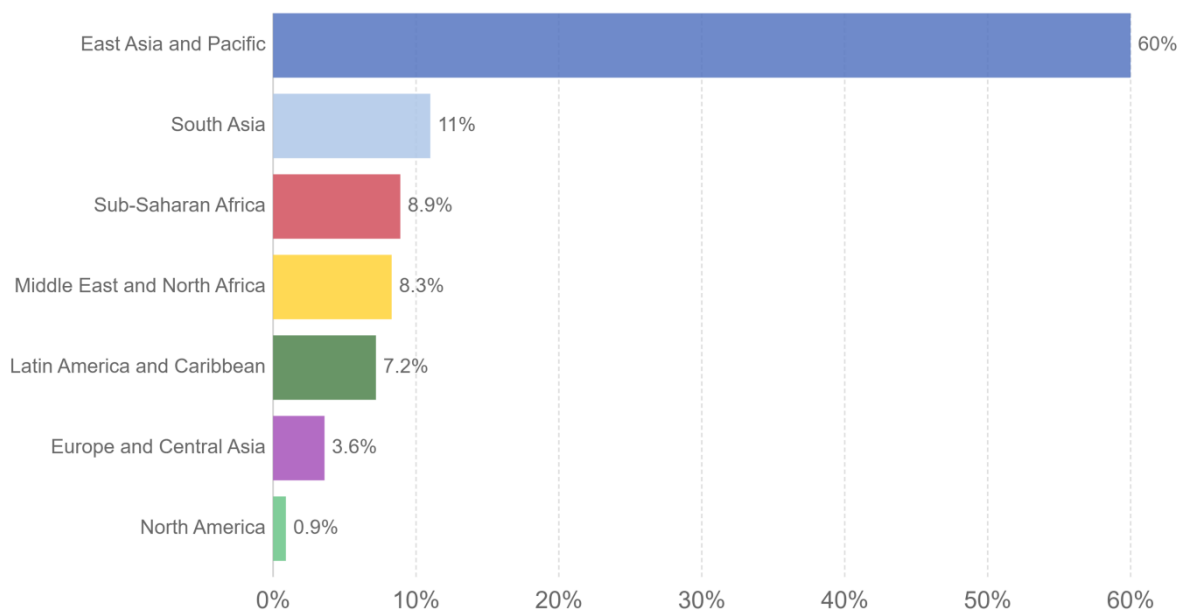
Η χρονική περίοδος η οποία διανύουμε χαρακτηρίζεται ως «Η εποχή του πλαστικού», καθώς το υλικό έχει εισβάλει στην καθημερινότητα. Οι χρήσεις του ποικίλουν και έχουν βελτιώσει διάφορες ανθρώπινες εφαρμογές όπως τις συσκευασίες (σακούλες, προστασία φαγητού και φαρμάκων), τις μεταφορές (εξαρτήματα αυτοκινήτων), τα δομικά υλικά (παράθυρα, τοίχος, πάτωμα), τα υφάσματα, τα αθλήματα, τα ηλεκτρονικά και άλλα.



Διάγραμμα 2: Χρήσεις πλαστικών (Πηγή δεδομένων: Geyer, Jambeck, and Law 2017).

Η μεγαλύτερη χρήση πλαστικών όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2 είναι στις συσκευασίες. Η περισσότερη παραγωγή κοινών ρητινών πλαστικού χρησιμοποιείται για συσκευασίες οι οποίες έχουν σχετικά μικρή χρονική διάρκεια ζωής (μιας χρήσης πλαστικά) και καταλήγουν άμεσα στα απορρίμματα (Andrady 2017), είτε στο σύστημα απορριμμάτων της κάθε χώρας, είτε συνηθέστερα κάπου στο περιβάλλον. Είναι λογικό λοιπόν να υπάρχουν τεράστιοι όγκοι διάθεσης πλαστικών απορριμμάτων. Εκτιμάται ότι το 60% από την συνολική παραγωγή πλαστικού, δηλαδή 4900 εκ. τόνοι έχουν απορριφθεί και βρίσκονται συσσωρευμένα σε ΧΥΤΑ ή στο φυσικό περιβάλλον (Geyer, Jambeck, and Law 2017).

Οι χώρες με μεγαλύτερη οικονομική ευχέρεια όπως είναι οι περισσότερες στην Ευρώπη, στην Βόρεια Αμερική, στην Αυστραλία, στη Νέα Ζηλανδία, στην Ιαπωνία και στη Νότια Κορέα, έχουν ένα αποτελεσματικό σύστημα διαχείρισης των απορριμμάτων τους σχετικά με τον υπόλοιπο κόσμο (ourworldindata.org). Ακόμα και τα πλαστικά που δεν καταφέρνουν να ανακυκλωθούν για διάφορους λόγους, αποθηκεύονται σε ασφαλή, κλειστό σύστημα χωματερών. Σε αυτές τις χώρες θεωρείται ότι είναι μικρό το ποσοστό των πλαστικών απορριμμάτων που δεν διαχειρίζονται επαρκώς (χωρίς να σημαίνει ότι δεν υπάρχει πάντα το ρίσκο να ρυπανθεί με πλαστικά απορρίμματα το φυσικό περιβάλλον). Τα πλαστικά απόβλητα θεωρούνται ρύπος όταν η διαχείριση τους είναι ελλιπής και μη ελεγχόμενη. Στην Στο Διάγραμμα 3, φαίνεται η παγκόσμια ελλιπής διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων το 2010 σε απόσταση 50 χιλιομέτρων από την ακτή, όπου υπάρχει τεράστιο ρίσκο να εισβάλουν τα πλαστικά στον ωκεανό μέσω φυσικών παραγόντων όπως είναι ο άνεμος, οι τυφώνες, η βροχή, οι πλημμύρες κ.α.



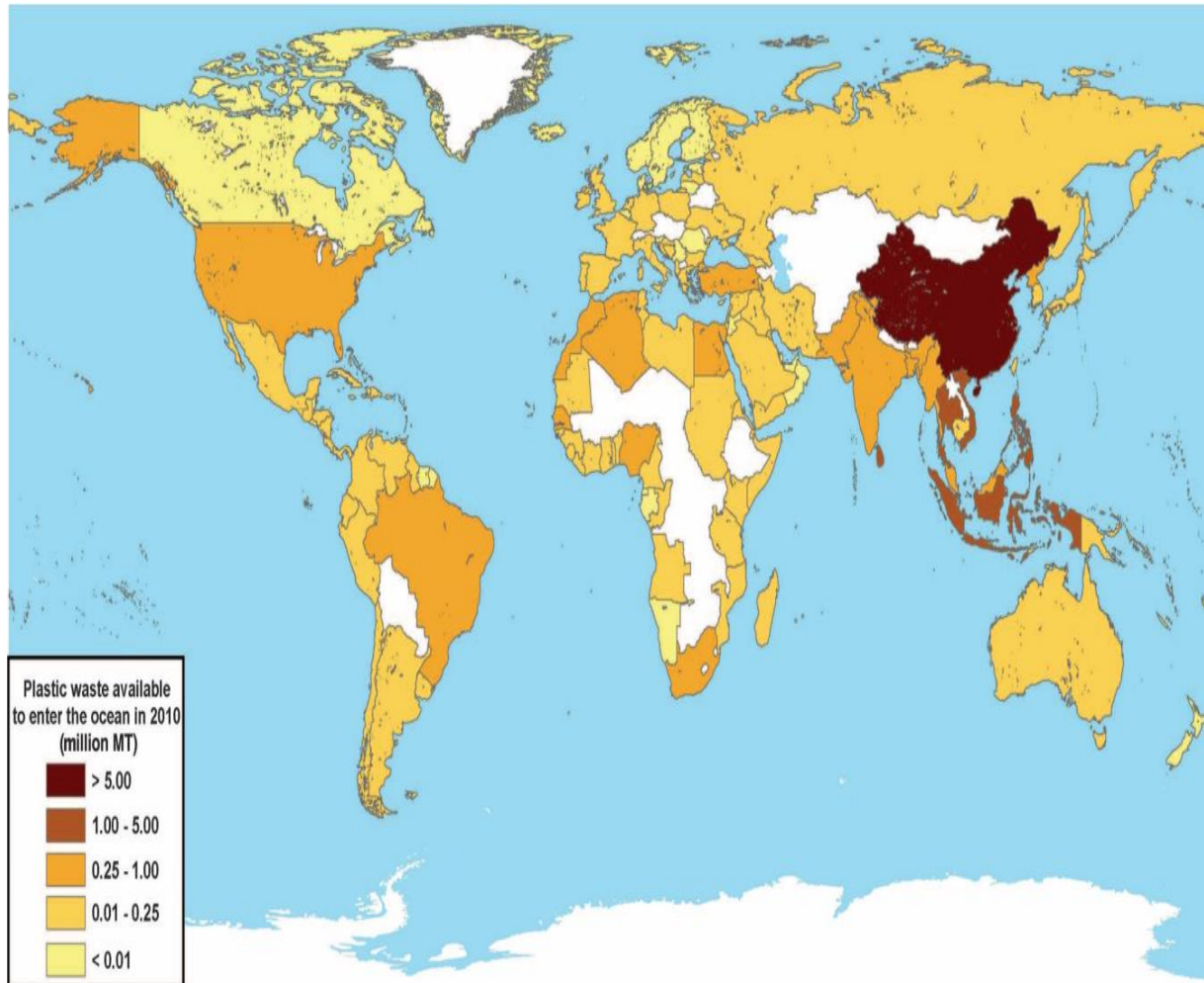
Διάγραμμα 3: Παγκόσμια έλλειψη διαχείρισης πλαστικών 50 χιλιομέτρα από την ακτή (2010)(Πηγή: ourworldindata.org).

Σύμφωνα με την έρευνα “Plastic waste inputs from land into the ocean” (Jambeck. et al. 2015), που είχε ως στόχο να εκτιμήσει την ποσότητα των πλαστικών που εισβάλλουν στη θάλασσα, οι 192 παράκτιες χώρες που μελετήθηκαν εκτιμήθηκε ότι παρήγαγαν 99,5 εκ. τόνους πλαστικού το 2010. Από αυτούς, οι 31.9 εκ. τόνοι χαρακτηρίστηκαν ως «έλλειψης διαχείρισεως», με αποτέλεσμα 4.8-12.7 εκ. τόνοι να εισβάλλουν στο θαλάσσιο περιβάλλον εκείνη την χρονιά. Οι περιοχές όπου η διαχείριση τους είναι ανύπαρκτη φαίνονται ξεκάθαρα στο Διάγραμμα 3. Ακόμα και οι χώρες που έχουν πολύ χαμηλό ποσοστό έλλειψης διαχείρισεως των αποβλήτων τους, λόγω του ότι το μέγεθος των αποβλήτων τους είναι μεγάλης κλίμακας, ο αριθμός των αποβλήτων που τελικά μένουν εκτεθειμένα στο περιβάλλον είναι μεγάλος.

Περίπου το 80% των πλαστικών κομματιών που βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον προέρχεται από χερσαίες πηγές και το υπόλοιπο 20% από θαλάσσιες πηγές (ναυσιπλοΐα και αλιεία) (Li, Tse, and Fok 2016). Τα πλαστικά μιας χρήσης (κυρίως συσκευασίες), όπως είναι το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), πολυεστυρένιο (PS), το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), και το PVC (βινύλιο), έχουν τεράστιες πιθανότητες να καταλήξουν στην θάλασσα μετά την χρήση τους (Andrady 2011) και η χρήση τους είναι συστηματική και αδιάκοπη, όπως και η παραγωγή τους.

Ένα εκατομμύριο πλαστικά μπουκάλια αγοράζονται κάθε λεπτό παγκοσμίως και τα νούμερα όλο και αυξάνονται (forbes.com), το 91% από τα οποία δεν οδηγούνται στην ανακύκλωση. Η μοίρα των μπουκαλιών αυτών στην καλύτερη περίπτωση αφού δεν ανακυκλωθούν, είναι να βρεθούν στο σύστημα απορριμμάτων της εκάστοτε χώρας, όπου θα αποθηκευτούν με ασφάλεια ώστε να μην απορριφθούν στο φυσικό περιβάλλον. Με γνώμονα ότι το 91% δεν ανακυκλώνονται, υποθέτουμε ότι καταλήγουν στο ασφαλές μέρος αποθήκευσης (συνήθως κάποιο ΧΥΤΑ). Μεγάλο ποσοστό όμως αυτών δεν καταλήγουν στο ΧΥΤΑ, είτε λόγω αμέλειας των πολιτών να το τοποθετήσουν στον κάδο απορριμμάτων, είτε κατά την μεταφορά του στο εκάστοτε ασφαλές μέρος. Όταν πλέον το πλαστικό απόρριμμα έχει φτάσει στον προορισμό του, αν ο προορισμός του είναι αρκετά ασφαλής και δεν

επηρεάζεται από φυσικές καταστροφές (πλημμύρες, τυφώνες), θα παραμείνει εκεί μέχρι να βιοδιασπαστεί, με την τελευταία να είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία. Εκτιμάται ότι ένα πλαστικό μπουκάλι χρειάζεται 450 χρόνια για να διασπαστεί πλήρως, αν και ο χρόνος βιοδιάσπασης του πλαστικού παραμένει επίσημα άγνωστος (Law 2017) . Υπολογίζεται ότι έως το 2050 το θαλάσσιο περιβάλλον θα περιέχει περισσότερο πλαστικό από ψάρια κατά βάρος (MacArthur 2014).



Εικόνα 4: Παγκόσμιος χάρτης πλαστικών αποβλήτων διαθέσιμων να εισβάλουν στον ωκεανό. (R. Jambeck, 2015)

1.1.5. Πλαστικά στη θάλασσα και επιπτώσεις



Εικόνα 5: Πλαστικά στην επιφάνεια της θάλασσας (Πηγή: AP Images/European Union-EP)

Η ρύπανση των πλαστικών είναι ευρέως διαδεδομένη στους ωκεανούς. Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και έχει υπολογιστεί προσεγγιστικά η ποσότητα των πλαστικών που υπάρχει μέσα στη θάλασσα. Μια ακριβής μέτρηση για την ποσότητα των πλαστικών στην επιφάνεια της θάλασσας φαντάζει ακατόρθωτη, χρονοβόρα και πολυδάπανη, πόσο μάλλον να εξερευνηθεί ο βυθός της που δεν έχει ποτέ εξερευνηθεί. Ωστόσο, τα πλαστικά δεν μένουν στην επιφάνεια της θάλασσας, πολλά από αυτά βυθίζονται, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Φωτογραφία από ντοκιμαντέρ, πλαστικά στα 1600μ βάθος (Πηγή: A Plastic Ocean (2016) film documentary (Craig Leeson))

Υπάρχουν 5.25 τρισεκατομμύρια κομμάτια πλαστικού που επιπλέουν στην επιφάνεια της θάλασσας αυτή την στιγμή, τα οποία ζυγίζουν 268.940 τόνους (Eriksen et al. 2014). Μεταξύ των εκτιμήσεων του μοντέλου και των πραγματικών μετρήσεων η απόκλιση ήταν πολύ μικρή, επομένως τα νούμερα δεν έχουν και πολύ μεγάλη απόκλιση από τα πραγματικά.

Συγκρίνοντας τις εκτιμώμενες τιμές κατά βάρος των πλαστικών που εισχωρήσαν στο θαλάσσιο περιβάλλον μόνο το 2010, με τις τιμές κατά βάρος των πλαστικών που βρίσκονται στην επιφάνεια της θάλασσας, γίνεται ξεκάθαρο ότι μεγάλες ποσότητες πλαστικού δεν ξέρουμε που βρίσκονται, αλλά ξέρουμε ότι έχουν εισχωρήσει στη θάλασσα. Τρία είναι τα βασικά σενάρια: είτε έχουν βυθιστεί στον βυθό των ωκεανών, είτε έχουν διασπαστεί εξαιτίας της ακτινοβολίας UV και της μηχανικής καταπόνησης σε πολύ μικρά κομμάτια για να ανιχνευτούν και να εκτιμηθούν οι ποσότητες τους, είτε έχουν προσληφθεί από τα ψάρια και από τους μικροοργανισμούς καθώς έχει προηγηθεί η διάσπαση τους σε μικρότερα κομμάτια (Thompson et al. 2004).

Τα μεγάλα πλαστικά κομμάτια γνωστά και ως «μακροπλαστικά», είναι κύριο θέμα περιβαλλοντικής κρίσης εδώ και χρόνια (Cole et al. 2011). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται δύο νέοι όροι για να περιγράψουν νέες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Οι όροι αυτοί είναι τα «μικροπλαστικά» και τα «νανοπλαστικά». Τα μικροπλαστικά είναι ουσιαστικά πολύ μικρότερα κομμάτια πλαστικού τα οποία έχουν μέγεθος από 1 nm έως 5 mm. Τα νανοπλαστικά είναι ακόμα μικρότερα πλαστικά της τάξεως 10^{-9} m.

Οι επιπτώσεις των πλαστικών με ποικίλα μεγέθη που υπάρχουν στη θάλασσα, εκτείνονται στη θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα, στην υγεία, στην οικονομία και στο κλίμα.

Η κατάποση μικρών κομματιών πλαστικού από ψάρια και πουλιά είναι ένα από τα κύρια προβλήματα. Πολλά ζώα μπερδεύουν τα κομμάτια πλαστικού με φαγητό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πλαστικά να κολλήσουν στον λαιμό τους με κίνδυνο τον πνιγμό τους, είτε αν δεν κολλήσουν να νομίζουν ότι έχουν τραφεί καθώς θα έχουν γεμάτο στομάχι (γιατί το πλαστικό δεν διασπάται). Και οι δύο περιπτώσεις μπορούν να αποδειχτούν θανάσιμες για αυτά (Sheavly and Register 2007). Άλλο μεγάλο πρόβλημα είναι η παγίδευση των ζώων σε κομμάτια πλαστικού (Εικόνα 8) ή η εισχώρηση πλαστικών κομματιών και πλαστικών μιας χρήσης σε βλαβερά για τα ζώα σημεία του σώματος τους, περιορίζοντας τα να αναπτυχθούν, να κινηθούν ή άλλες φορές ακόμα και να αναπνεύσουν (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Πλαστικό καλαμάκι αφαιρείται από την μύτη χελώνας (Πηγή: Φωτογραφία από βίντεο που ανήκει στην Christine Figgenger)



Εικόνα 8: Παρεμπόδιση ανάπτυξης χελώνας λόγω πλαστικού (Πηγή: 5 Gyres Institute)

Παρόμοιο πρόβλημα παγίδευσης θαλάσσιων πανίδας ανιχνεύεται στα απορριφθέντα στον ωκεανό πλαστικά δίκτυα, το αποκαλούμενο “ghost fishing”, όπου τα ψάρια και οι χελώνες παγιδεύονται και πεθαίνουν (Thompson et al. 2009).

Τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται για να κατασκευαστούν τα πλαστικά ώστε να είναι ανθεκτικά στην θερμότητα, στην οξείδωση και στη μικροβιακή αποδόμηση τους, είναι περιβαλλοντικά επικίνδυνα καθώς εκτός του ότι παρατείνουν την ζωή των πλαστικών, υπάρχει ο κίνδυνος τα πρόσθετα να εκχυλίσουν και να διαρρεύσουν στο περιβάλλον προκαλώντας πιθανές καταστροφικές επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς (ενδοκρινική αναστάτωση, επιπτώσεις στη κινητικότητα, καρκινογένεση), αλλά και μετέπειτα στον άνθρωπο (Barnes et al. 2009).

Τα μικροπλαστικά, λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους, μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό ενός ευρέος φάσματος θαλάσσιων οργανισμών όπως είναι τα αμφίποδα, σκουλήκια, θυσανόποδα, μύδια, δεκάποδα, θαλάσσια πουλιά και ψάρια. Μπορούν να παρεμποδίσουν τη σωστή λειτουργία του εντερικού συστήματος και του συστήματος θρέψης των οργανισμών αυτών ή και να περιορίσουν την τροφή που λαμβάνουν και εν τέλη να τα οδηγήσει στον θάνατο τους (Cole et al. 2013). Επίσης έχοντας τις ίδιες ιδιότητες του πλαστικού, καθώς είναι πλαστικό απλά σε μια πιο μικρή μορφή, μπορούν κάλλιστα να διαρρεύσουν τα πρόσθετα του πλαστικού μέσα στον οργανισμό, τα οποία όπως προαναφέρθηκε είναι τοξικά. Τα μικροπλαστικά επιπλέον, είναι ευαίσθητα στο να προσροφούν στην μεγάλη για τον όγκο τους επιφάνεια, οργανικούς ρύπους (POPs), οι οποίοι θεωρούνται τοξικοί για τους οργανισμούς και για τον άνθρωπο (PCBs, PAHs, DDT) (Li, Tse, and Fok 2016). Τα κομμάτια αυτά μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο και να προκαλέσουν πιθανές επιπτώσεις σε αυτόν μέσω της τροφικής αλυσίδας, αφού τα ψάρια τα έχουν καταπιεί είτε καταλάθος είτε μπερδεύοντας τα για τροφή, χωρίς κάποιες από τις επιπτώσεις αυτές να έχουν καταγραφεί επίσημα. (Cole et al. 2011).

1.1.6. Επιπτώσεις στην Κοινωνία – Οικονομία

Από τα πιο ξεκάθαρα προβλήματα που δημιουργούν τα πλαστικά στη θάλασσα είναι στον τομέα της αισθητικής. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, το πρόβλημα δεν έγκειται μόνο στην αισθητική, αλλά ακόμα και στην δυνατότητα για κολύμβηση στην συγκεκριμένη ακτή, καθώς με την ποσότητα των πλαστικών που έχει συσσωρευτεί, πιθανότερο είναι το περπάτημα πάνω στο πλαστικό παρά η κολύμβηση.



Εικόνα 9: Πλαστικά απορρίμματα στη θάλασσα. (Πηγή: soundingsonline.com)

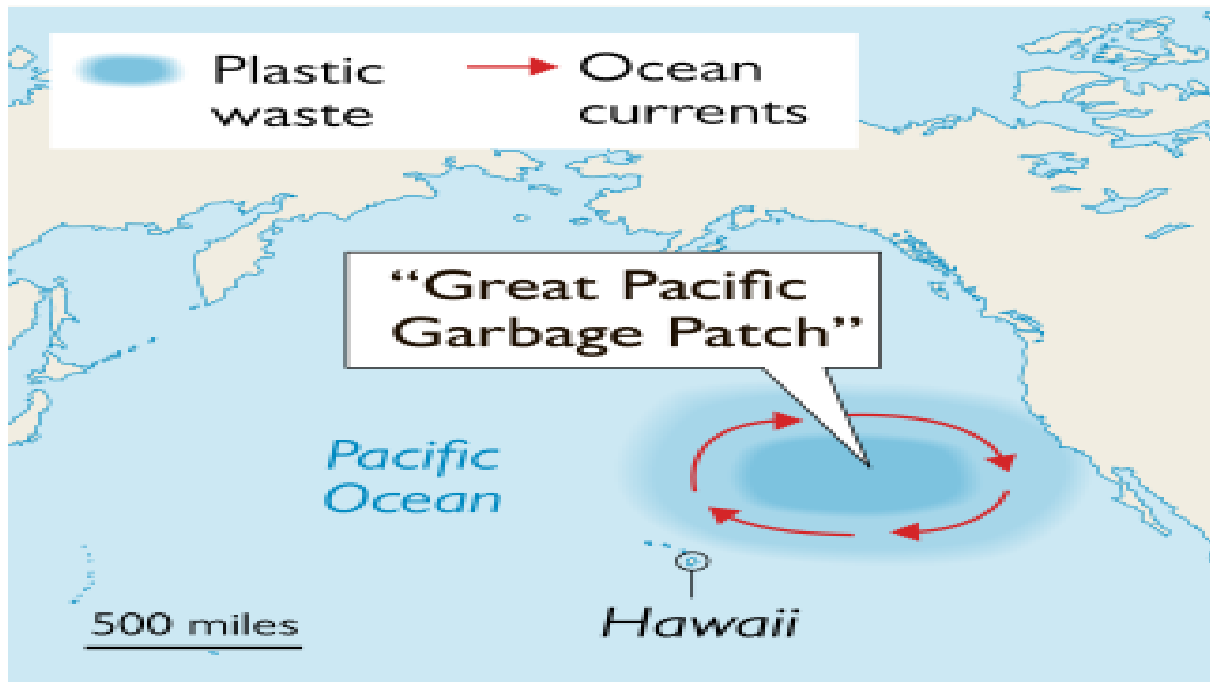
Αντίκτυπό αυτού του φαινομένου βλέπουμε στον τομέα της οικονομίας, με τον τουρισμό να μειώνεται αισθητά σε οποιοδήποτε μέρος υπάρχει μόλυνση με πλαστικά, καθώς η αισθητική αυτή υποβάθμιση των παράκτιων περιοχών μαζί με όλα τα αρνητικά που επιφέρουν τα πλαστικά, αποτρέπουν το κόσμο να ξοδέψουν εκεί τα χρήματά τους με αποτέλεσμα να στρέφονται σε πιο καθαρές περιοχές.

Επιπτώσεις βλέπει κανείς και στο ψάρεμα, συνεπώς και στην οικονομία, αφού ο κόσμος θα επιλέξει να μην καταναλώσει ένα ψάρι που ξέρει ότι ζει σε θάλασσες ρυπασμένες από πλαστικό, με αποτέλεσμα να αποτρέπονται και οι ίδιοι οι ψαράδες από το να ψαρεύουν.

Για να αντιμετωπιστούν όλα τα παραπάνω σε έναν ρυπασμένο από πλαστικό περιβάλλον, πρέπει να απομακρυνθούν όλα τα απορρίμματα και να καθαριστούν οι παραλίες και οι θάλασσες. Ο καθαρισμός όμως των παραλιών και ειδικότερα της θάλασσας είναι δαπανηρός με αποτέλεσμα τα πλαστικά απορρίμματα (και όχι μόνο), να δημιουργούν άλλο ένα πλήγμα στην οικονομία της εκάστοτε χώρας ή δήμου ή και σε παγκόσμια κλίμακα.

Ένα τρανταχτό παράδειγμα, στο οποίο φαντάζει αδύνατο να καθαριστεί και πολύ δαπανηρό είναι το GPGP (Great Pacific Garbage Patch). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10 και 11, το θαλάσσιο αυτό ρεύμα εκτείνεται κατά μήκος της επιφάνειας του Βόρειου

Ειρηνικού Ωκεανού σε μια έκταση ίση με 1.6 εκατομμύρια km² μόνο με πλαστικά απορρίμματα. Τα πλαστικά αυτά απορρίμματα περιέχουν σύμφωνα με την έρευνα των (Lebreton et al. 2018), 42 χιλιάδες τόνους μεγάλα πλαστικά κομμάτια (κυρίως δίχτυα ψαρέματος), 20 χιλιάδες τόνους μακροπλαστικά (πλαστικά μπουκάλια, κιβώτια), 10 χιλιάδες τόνους μεσοπλαστικά (καπάκια, καλαμάκια) και 6.4 χιλιάδες τόνους μικροπλαστικά (θρυμματισμένο πλαστικό από δίχτυα, σκοινιά ή άλλα αντικείμενα).



Εικόνα 10: Τοποθεσία και έκταση του GPGP. (Πηγή: thetimes.co.uk)



Εικόνα 11: Great Pacific Garbage Patch (Πηγή: phys.org)

1.2. ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Ως μικροπλαστικά, όπως ήδη έχει προαναφερθεί παραπάνω, ορίζονται τα κομμάτια πλαστικών τα οποία είναι μικρότερα από 5mm και τα οποία είναι διακριτά με δυσκολία και σε προσαρμοσμένο σε αυτά μάτι (Andrady 2011).

1.2.1. Κατηγορίες μικροπλαστικών

Τα μικροπλαστικά χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες αποκαλύπτουν την προέλευση τους και τον τρόπο που δημιουργήθηκαν. Οι κατηγορίες αυτές είναι τα πρωτογενή και τα δευτερογενή μικροπλαστικά.

1.2.2. Πρωτογενή μικροπλαστικά

Τα πλαστικά τα οποία κατασκευάζονται σε μικροσκοπικό μέγεθος χαρακτηρίζονται ως πρωτογενή μικροπλαστικά. Αυτά τα μικροπλαστικά παράγονται σε διάφορα μεγέθη (κάτω από 5mm) και χρησιμοποιούνται κυρίως σε προσωπικής υγιεινής προϊόντα (οδοντόκρεμα, κρέμες απολέπισης, σαμπουάν) ως απολεπιστικό (Andrady 2017). Πρωτογενή μικροπλαστικά επίσης μπορούν να θεωρηθούν τα μικροσφαιρίδια (pellets), τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη παραγωγής των πλαστικών και για τα οποία είναι πολύ πιθανή η διαφυγή και η διασκόρπιση τους στο περιβάλλον λόγω του μικρού τους μεγέθους, είτε από το σημείο παραγωγής τους, είτε κατά τη μεταφορά τους. Για την αφαίρεση σκουριάς ή μπογιάς επίσης χρησιμοποιούνται μικροπλαστικά, τα οποία εκτοξεύονται με μεγάλες πιέσεις αέρα, γνωστό ως πλαστικοβολή (αντίστοιχη της αμμοβολής) (Cole et al. 2011).



Εικόνα 12: Μικροπλαστικά σε οδοντόκρεμα (Πηγή:laquilaactive.com/) (αριστερά), Εικόνα 13: πλαστικά Pellets (Πηγή: wikipedia.org/) (δεξιά).

Λόγω του μικρού τους μεγέθους παραγωγής τα πρωτογενή μικροπλαστικά διαπερνούν τα φίλτρα των βιολογικών καθαρισμών με ευκολία και καταλήγουν στην θάλασσα είτε άμεσα, είτε μέσω μεταφοράς τους με την βοήθεια των καιρικών συνθηκών (άνεμος, βροχή).

1.2.3. Δευτερογενή μικροπλαστικά

Τα περισσότερα όμως μικροπλαστικά που βρίσκονται στους ωκεανούς και στις ακτές είναι τα δευτερογενή μικροπλαστικά. Τα δευτερογενή μικροπλαστικά είναι μικρά κομμάτια πλαστικών (<5mm), τα οποία προέρχονται από τον κατακερματισμό των μεγάλων πλαστικών αποβλήτων σε μικρότερα κομμάτια (Ryan et al. 2009). Καθώς τα πλαστικά είναι εκτεθειμένα σε συνθήκες περιβάλλοντος, είτε στο υδάτινο, είτε στο εδαφικό χώρο, εκτελούνται μια σειρά από διεργασίες (φυσικές, βιολογικές, χημικές), οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως γήρανση (degradation). Οι διεργασίες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της δομικής ακεραιότητας του πλαστικού και εν τέλει λόγω της μηχανικής καταπόνησης του (κυματική δράση, τριβή, αναταραχή λόγω ρευμάτων), στον κατακερματισμό του (Barnes et al. 2009; Browne, Galloway, and Thompson 2007). Η έκθεση του πλαστικού στην υπεριώδη ακτινοβολία του ηλιακού φωτός, προκαλεί την οξείδωση της αλυσίδας του πολυμερούς, με αποτέλεσμα την διάσπαση του δεσμού του, την δημιουργία ρηγμάτων και τις αλλαγές του χρώματος του (κιτρινωπό χρώμα) (Andrady 2011; Barnes et al. 2009; Cole et al. 2011). Ταυτόχρονα, οι χαμηλές θερμοκρασίες που υπάρχουν στο θαλάσσιο περιβάλλον στέκονται εμπόδιο στην οξείδωση του πολυμερούς (γήρανση), γι' αυτό και κυρίως στις ακτές η διεργασία της οξείδωσης λόγω γήρανσης γίνεται σε πιο γρήγορους ρυθμούς, αλλά επίσης και λόγω απευθείας έκθεσης του στην ηλιακή ακτινοβολία και της μεγάλης διαθεσιμότητας οξυγόνου.



Εικόνα 13: Διάφορα μεγέθη κατακερματισμένου πλαστικού αλλά σε μέγεθος μικροπλαστικού και άλλα λίγο μεγαλύτερα (Πηγή: blogs.sch.gr)



Εικόνα 14: Δευτερογενή μικροπλαστικά σακούλας LDPE, κατακερματισμένα στο εργαστήριο .

1.3. ΝΑΝΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Η έννοια του νανοπλαστικού αποτελεί ένα πρόσφατο τομέα της περιβαλλοντικής επιστήμης και δεν έχει οριστεί κάτι απόλυτο σχετικά με τα όρια μεγέθους που κυμαίνεται. Για τα υλικά νάνο έχει οριστεί μια κλίμακα, η οποία ισχυρίζεται ότι ένα πλαστικό κομμάτι θεωρείται κλίμακας νάνο εφόσον μια από τις διαστάσεις είναι κάτω από 100nm (Klaine et al. 2012). Άλλες έρευνες ορίζουν ως νανοπλαστικό, ότι βρίσκεται κάτω από 1 μm (Andrady 2017). Οι πληροφορίες που έχουν συγκεντρωθεί από τους ερευνητές είναι απειροελάχιστες σχετικά με την ποσότητα και τις επιπτώσεις των νανοπλαστικών, καθώς οι μέθοδοι για τον εντοπισμό τους είναι σε αρχικά και δαπανηρά ακόμα επίπεδα. Έχουν γίνει κάποιες έρευνες σχετικά, αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συστηματική αξιολόγηση των επιπτώσεων σχετικά με τα θαλάσσια είδη, πόσο μάλλον σε επίπεδα κοινότητας ή οικοσυστήματος (Koelmans Albert A., Besseling Ellen, and Shim Won J. 2015). Παρ' όλα αυτά, τα νανοπλαστικά λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους θα μπορούσαν να αποδειχτούν καταστροφικά για το περιβάλλον και για τον άνθρωπο, κάτι σαν αόρατος εχθρός, εφόσον δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι, ούτε εντοπίζονται εύκολα. Οι επιπτώσεις αυτών θα μπορούσε να είναι παρόμοιες με τις επιπτώσεις των πλαστικών (εκτός βέβαια από κάποιες επιπτώσεις για τις οποίες ευθύνεται το μέγεθος), αφού αποτελούνται από το ίδιο υλικό.

Κύρια πηγή απελευθέρωσης νανοπλαστικών θα μπορούσε να είναι προϊόντα και εφαρμογές όπου χρησιμοποιούνται ή σχηματίζονται νανοπλαστικά (παλτά, βίο-ιατρικά προϊόντα, διανομή φαρμάκων, ηλεκτρονικά). Μια δεύτερη υποθετική, αλλά πολύ πιθανή πηγή νανοπλαστικών είναι ο κατακερματισμός των μικροπλαστικών που τελικά φτάνουν σε νάνο κλίμακα, μέσω της φωτο-γήρανσης και της επίδρασης των θαλάσσιων μικροοργανισμών της επιφάνειας των μικροπλαστικών (Andrady 2011). Η συγκεκριμένη διεργασία είναι πολύ πιθανή για να δημιουργηθούν μικροπλαστικά, αλλά για να

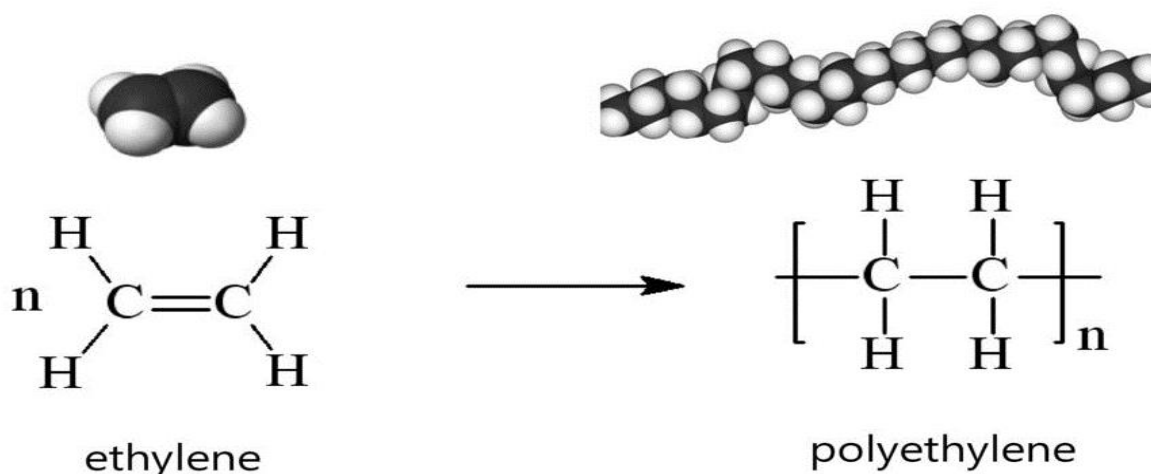
δημιουργηθούν νανοπλαστικά χρειάζεται αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα κυρίως λόγω έλλειψης μικροοργανισμών και ηλιακού φωτός στην θάλασσα (Koelmans Albert A., Besseling Ellen, and Shim Won J. 2015).

Στο παρών πείραμα, εφόσον το μέγεθος των νανοπλαστικών δεν έχει οριστεί επίσημα και υπάρχουν διάφορες απόψεις για αυτό, ορίζουμε ότι είναι κάτω από 1 μm ως νανοπλαστικό (Andrady 2017).

1.4. ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (LDPE)

Όπως έχει προαναφερθεί το πολυαιθυλένιο (PE) είναι το πιο κοινό πλαστικό γιατί χρησιμοποιείται κυρίως στις συσκευασίες (πλαστικές σακούλες, μεμβράνες, γεωμεμβράνες, σωλήνες, φιάλες κ.α.). Είναι πολυμερές, γι' αυτό και αποτελείται από μεγάλες αλυσίδες υδρογονανθράκων και ανήκει στην ομάδα των θερμοπλαστικών. Οι περισσότερες του ποιότητες, μέσα σε αυτές και το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE), έχουν εξαιρετική χημική αντίσταση, πράγμα που σημαίνει ότι προστατεύονται από ισχυρές βάσεις και οξέα. Επιπρόσθετα, αντιστέκονται σε ήπια οξειδωτικά και αναγωγικά. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών του πολυαιθυλενίου (PE), επομένως και του χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (LDPE) που εξετάζεται σε αυτό το πείραμα, το καθιστούν δύσκολα βιοαποικοδομήσιμο χωρίς την επίδραση αβιοτικών παραγόντων. Κάποιες από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του είναι (Wikipedia.org, microfabricator.com) :

- Το σημείο τήξης του κυμαίνεται από 105°C έως 115 °C.
- Το χρώμα του είναι διαφανές.
- Η πυκνότητα του κυμαίνεται από 0,910–0,940 g/cm³.
- Υψηλός βαθμός μικρών και μεγάλων αλυσίδων διακλαδώσεων.
- Οι αλυσίδες δεν συσκευάζονται στην κρυσταλλική δομή του.
- Λιγότερο ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις σχετικά με άλλου τύπος πολυαιθυλενίου.
- Δημιουργείται με πολυμερισμό ελεύθερων ριζών.
- Χρησιμοποιείται για δύσκαμπτους περιεκτές, για εφαρμογές πλαστικής μεμβράνης και αναδίπλωση μεμβράνης συσκευασίας, σωληνώσεις, λόγω της αντοχής του στον εφελκυσμό και την αυξημένη ολκιμότητά του.
- Έχει υψηλή ευφλεκτότητα.



2. ΣΚΟΠΟΣ

Στο συγκεκριμένο πείραμα που διεξήχθη στα πλαίσια διπλωματικής εργασίας, δημιουργήθηκαν από σακούλα χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (LDPE) δευτερογενή πλαστικά, ύστερα από επτάμηνη έκθεσής τους σε UV-A ακτινοβολία και μηχανικής καταπόνησης. Τα δευτερογενή αυτά μικροπλαστικά, δημιουργήθηκαν με σκοπό την μελέτη της επίδρασης των θαλάσσιων μικροοργανισμών πάνω τους, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον (θαλασσινό νερό, ανάδευση), με μοναδική πηγή άνθρακα τα μικροπλαστικά.

Τα μικροπλαστικά ποίκιλαν σε μέγεθος εύρους 250μm έως 2mm, χωρίστηκαν σε ίσα μέρη και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες, όπου και εμβολιάστηκαν με τις μικροβιακές κοινότητες από τον κόλπο της Σούδας και του Αγίου Ονουφρίου, Χανίων. Μετρήσεις για την αλλαγή βάρους, για την μικροβιακή ανάπτυξη, την διασπορά των μεγεθών των μικροσωματιδίων στο διηθούμενο υγρό και για την χημική σύσταση της επιφάνειας των μικροπλαστικών πραγματοποιούνταν κάθε μήνα, για 4 μήνες. Η παρατήρηση των μετρήσεων αυτών, συντέλεσε ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των αυτόχthonων θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων σε δευτερογενή πλαστικά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

Πλαστικές σακούλες χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (LDPE) μετατράπηκαν σε φιλμ μήκους περίπου 10 cm, πλάτους 1 cm και πάχους 0.1 mm περίπου, με σκοπό την ομοιομορφία έκθεσης τους σε UV-A ακτινοβολία. Τοποθετήθηκαν σε κλειστά σιδερένια δοχεία με άμμο όπου εκτίθηκαν σε UV-A ακτινοβολία (φωτο-οξείδωση), για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα 7 μηνών το οποίο έχει υπολογιστεί ότι είναι αρκετό για να διασπάσει τα πολυμερή του πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και εκτελέστηκε σε δύο φάσεις.

Με την βοήθεια του καταγραφέα HOBO Temperature Light 3500 DP Logger, μετρήθηκαν οι τιμές της θερμοκρασίας και της ακτινοβολίας μέσα στα σιδερένια δοχεία. Το συγκεκριμένο καταγραφικό έχει εύρος τιμών από -20°C μέχρι 70 °C για την θερμοκρασία και από 0-320.000 lux (0-30.000 lumen), για την ακτινοβολία. Στα παρακάτω δύο διαγράμματα φαίνεται η ακτινοβολία και η θερμοκρασία με το πέρασμα των 7 μηνών:



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα συνολικής ακτινοβολίας 7 μηνών που υπέστησαν τα φιλμ LDPE.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα καταγραφής θερμοκρασίας μέσα στο κουτί ακτινοβολήσης.

3.2. Μέθοδοι

3.3. Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά τα ήδη εκτεθειμένα για 7 μήνες φιλμ στην UV-A ακτινοβολία, θρυμματίστηκαν με ήπια μηχανική καταπόνηση με τη βοήθεια δύο κόσκινων με διάμετρο πόρου 2mm και 250μm. Ο θρυμματισμός των φιλμ ήταν σχετικά εύκολη διαδικασία και αυτό οφείλεται στην έκθεση των φιλμ στην ακτινοβολία η οποία βοήθησε στην μείωση της ελαστικότητας του υλικού καθιστώντας τα σε ένα σχετικά μη ελαστικό υλικό και εύκολα διαχειρίσιμο όσων αναφορά τον θρυμματισμό του.

Ακολούθησε ο καθαρισμός των θραυσμάτων με νερό για να καθαρίσει το υλικό από τυχών υπολείμματα άμμου. Στη συνέχεια τα θραύσματα ξηράθηκαν στους 37 °C για τρεις μέρες για να φύγει εντελώς υγρασία από τον καθαρισμό.

Έπειτα τα θραύσματα χωρίστηκαν σε ποσότητες των $80\mu\text{g} \pm 2\mu\text{g}$ με σκοπό να τοποθετηθούν σε 24 κωνικές φλάσκες. Επομένως μετρήθηκαν και χωρίστηκαν σε 24 + 4 μέρη με τα 4 μέρη να λειτουργούν ως εφεδρικά. Η ζύγιση πραγματοποιήθηκε με ζυγαριά ακρίβειας 5 δεκαδικών ψηφίων και η απολύμανση των μικροπλαστικών (θραυσμάτων) έγινε με τον ψεκασμό αιθανόλης 70%.

3.4. Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Για την διεκπεραίωση του πειράματος συλλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν 2 θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες. Η πρώτη συλλέχθηκε από τον κόλπο της Σούδας Χανίων και η δεύτερη από τον κόλπο του Αγίου Ονουφρίου Χανίων, και ονομάστηκαν “Souda” και “Agios” αντίστοιχα.

Αρχικά για την πρώτη μικροβιακή κοινότητα (Souda), συλλέχθηκαν 250mL θαλασσινού νερού. Στη συνέχεια στο εργαστήριο το θαλασσινό φιλτραρίστηκε ώστε να απομακρυνθούν οι ζωοπλαγκτονικοί μικροοργανισμοί και διάφορα άλλα μικρά σκουπίδια που βρίσκονται στο θαλασσινό νερό και θα μπορούσαν να προκαλέσουν δυσλειτουργία στην εκτέλεση του πειράματος. Το φίλτρο είχε άνοιγμα πόρων ίσο με 200μm.

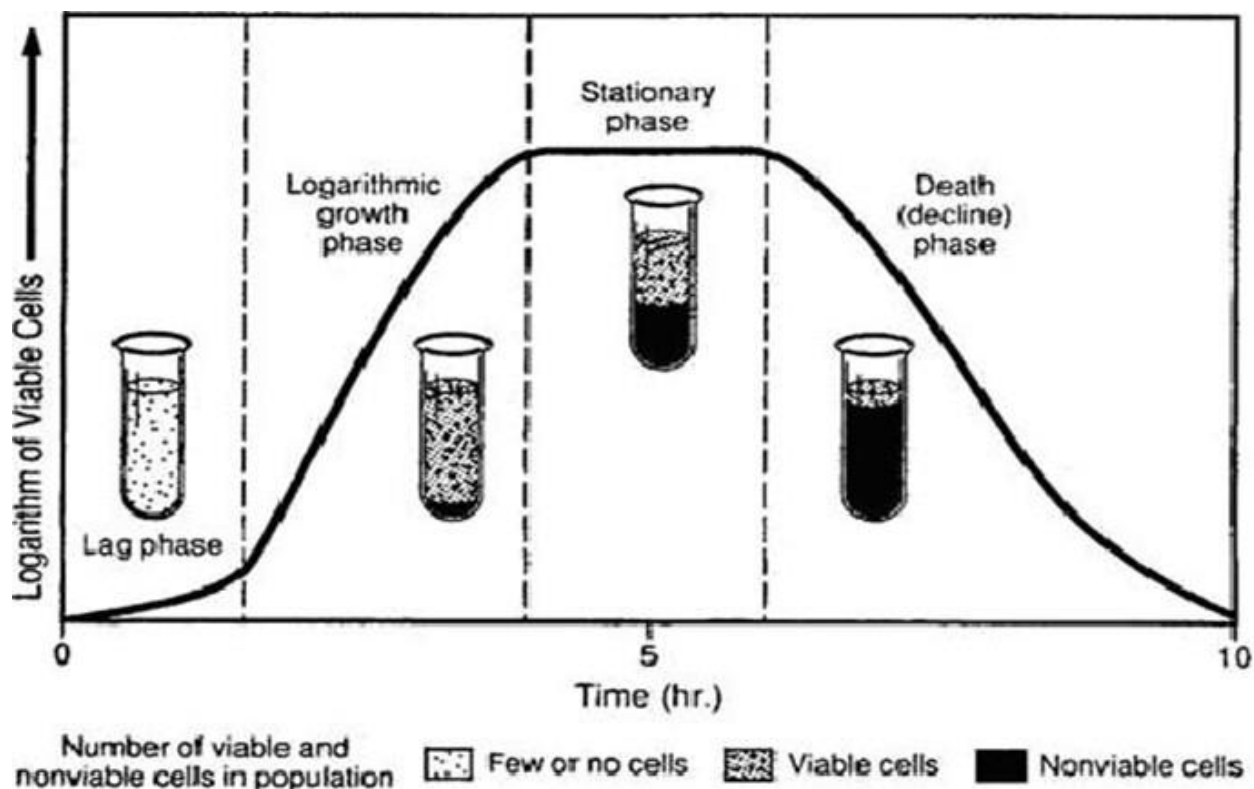
Στη συνέχεια επωάστηκαν με 80mg κομματιών πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και προσθήκη 0.5 mL θρεπτικού διαλύματος DSMZ 453 για 7 ημέρες στους 25 °C με ανάδευση 120 rpm. Μετά το πέρας των 7 ημερών, 50 mL από την παραπάνω κοινότητα φυγοκεντρίθηκαν με ταχύτητα στροφών 3500 rpm για 20 λεπτά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και το στερεό υπόλειμμα τοποθετήθηκε σε καινούρια αποστειρωμένη κωνική φιάλη η οποία περιείχε 200 mL υγρού DSZM 453 ούτως ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη ανάπτυξης της κοινότητας.

Η δεύτερη μικροβιακή θαλάσσια κοινότητα (Agios) 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. Η μικροβιακή αυτή κοινότητα είχε αρχικά συλλεχθεί από την θαλάσσια ζώνη του Αγίου Ονουφρίου και εγκλιματίστηκε για 6 μήνες σε περιβάλλον με μοναδική πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου.

Για την παρακολούθηση της αύξησης του πληθυσμού των 2 μικροβιακών κοινοτήτων είναι σημαντικό να κατασκευαστεί η καμπύλη ανάπτυξης για κάθε καλλιέργεια.

Η καμπύλη ανάπτυξης χωρίζεται σε 4 κύριες φάσεις:

- 1) Φάση προσαρμογής (Lag Phase): Τα κύτταρα σε αυτή τη φάση δεν διαιρούνται, επομένως δεν υπάρχει καθαρή αύξηση του πληθυσμού της καλλιέργειας, αλλά συνθέτουν νέα συστατικά (σύνθεση RNA, ένζυμα).
- 2) Φάση εκθετικής ανάπτυξης (exponential phase): Στη φάση αυτή τα κύτταρα αναπτύσσονται με τον μέγιστο (σταθερό) ρυθμό τους.
- 3) Φάση στασιμότητας (Stationary phase): Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σταματά, και παρατηρείται εξισορρόπηση του ρυθμού ανάπτυξης με τον ρυθμό θανάτου. Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων η έλλειψη οξυγόνου, η συσσώρευση τοξικών και άλλα οδηγούν στην πτώση του ρυθμού ανάπτυξης.
- 4) Φάση θανάτου (Death phase): Η παράγοντες αυτοί οδηγούν σιγά σιγά τον ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας στο μηδέν ωθώντας την καλλιέργεια στον θάνατο της, αφού πλέον ο ρυθμός θανάτου ξεπερνάει τον ρυθμό ανάπτυξης.



Εικόνα 16: Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας (Πηγή: Wikipedia.org)

Για να κατασκευαστεί λοιπόν η καμπύλη ανάπτυξης για τις δύο κοινότητες αναμίχθηκαν 200 mL υγρού θρεπτικού υλικού 453 και 0.5 mL από κάθε κοινότητα αντίστοιχα. Οι δύο καλλιέργειες παρέμειναν σε τράπεζα ανάδευσης, η οποία λειτουργούσε στις 120 rpm και 25 °C. Πραγματοποιήθηκαν κάθε 30 min επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας των 2 κοινοτήτων έως ότου φτάσουν στην φάση θανάτου για να προσδιοριστεί η καμπύλη ανάπτυξης τους. Οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία.



Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS (Πηγή: Shimadzu.com)

Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ήταν:

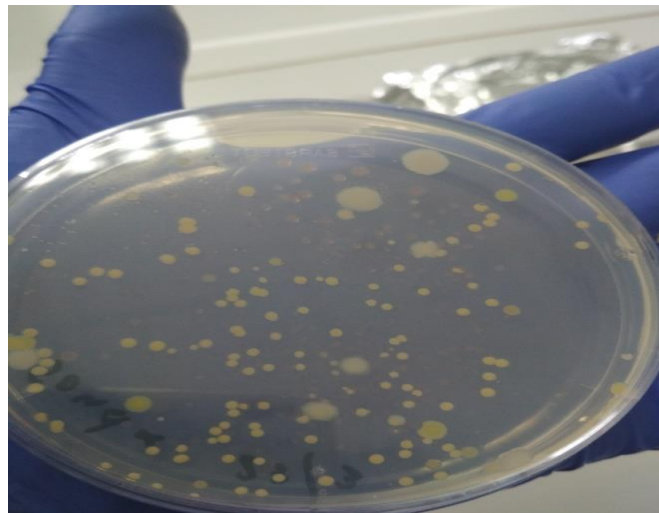
- Peptone from meat 7.8 g
- Peptone from caseine 7.8 g
- Yeast extract 2.8 g
- NaCl 5.6 g
- D(+)-Glucose 1.0 g
- Distilled water 1000.0 ml

Καθώς γίνονταν οι μετρήσεις για κάθε απορρόφηση, παράλληλα για κάθε συγκεκριμένη τιμή απορρόφησης υπολογίσθηκε ο αριθμός αποικιών (CFU). Έγιναν οι αραιώσεις 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} για κάθε μέτρηση και εμβολιάστηκαν τα τρυβλία (Petri) με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης πάνω σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Τελικά οι κατάλληλες τιμές απορρόφησης για την εκθετική φάση για τις 2 κοινότητες είναι:

- Souda $\rightarrow 0.7$
- Agios $\rightarrow 0.8$
- Στην εκθετική φάση και οι δύο κοινότητες είχαν περίπου $4 \cdot 10^7$ CFU/ml.

Επομένως όταν η απορρόφηση έφτασε στις παραπάνω τιμές, οι δυο υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρίθηκαν στις 4500 rpm για 13 λεπτά. Στα τοιχώματα του φάλκον δημιουργήθηκε ένα μικρό σφαιρίδιο στο οποίο υπήρχαν οι μικροοργανισμοί συσσωρευμένοι. Αυτό διαλύθηκε σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και επαναφυγοκεντρίθηκε άλλες δυο φορές για να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού.



Εικόνα 18: Αποικίες μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια του πειράματος

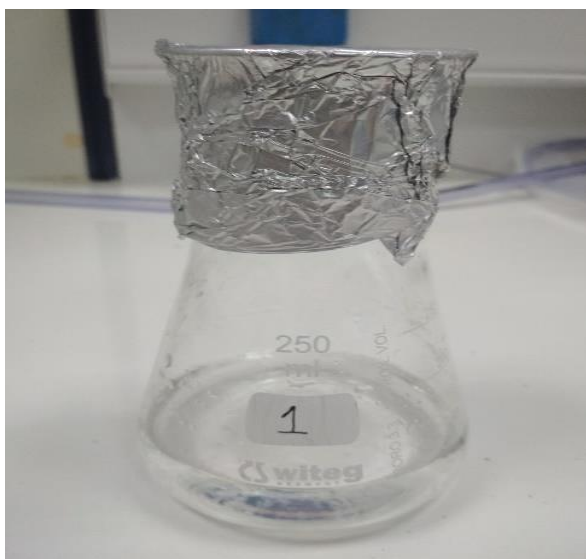
Η τιμή που μας ενδιαφέρει για να ξεκινήσει το πείραμα, είναι $10^5 \frac{CFU}{ml}$. Επομένως, σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης υπολογίζεται ότι πρέπει να προσθέσουμε 0.25 ml από την αρχική ποσότητα της φυγοκεντρημένης υγρής καλλιέργειας.

$$\begin{aligned} C_1 * V_1 &= C_2 * V_2 \\ 10^5 \frac{CFU}{ml} * 100ml &= 4 * 10^7 * V_2 \\ V_2 &= 0.25 ml \end{aligned}$$

3.5. Έναρξη πειράματος

Για να ξεκινήσει το πείραμα συλλέχθηκαν 24 κωνικές φλάσκες των 250mL και αποστειρώθηκαν. Μέσα σε αυτές τις φλάσκες τοποθετήθηκε 100 mL θαλασσινό νερό το οποίο είχε ήδη φιλτρανθεί και αποστειρωθεί, καθώς και οι ζυγισμένες ποσότητες των αποστειρωμένων μικροπλαστικών χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου. Οι πρώτες 12 φλάσκες εμβολιάστηκαν με τους μικροοργανισμούς από την μικροβιακή κοινότητα “Souda” και οι υπόλοιπες 12 από την μικροβιακή κοινότητα “Agios”.

Αφού εμβολιάστηκαν μεταφέρθηκαν σε ένα δωμάτιο θερμοκρασίας 25 °C, πάνω σε τράπεζα ανάδευσης (120 rpm), με σκοπό την συνεχή ανάδευση των κοινοτήτων για να εξασφαλισθεί η επαρκής οξυγόνωση τους (αερόβιες συνθήκες). Κάθε μήνα 3 φλάσκες από κάθε κοινότητα απομακρύνονταν για να γίνουν αναλύσεις και μετρήσεις, έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η πορεία της κάθε κοινότητας με τον χρόνο. Το πείραμα διήρκεσε 4 μήνες.



Εικόνα 19: Φλάσκα νούμερο 1 με την οποία ξεκίνησε το πείραμα.



Εικόνα 20: Οι κωνικές φιάλες εμβολιασμένες με τις μικροβιακές κοινότητες είναι έτοιμες να τεθούν σε ανάδευση για να ξεκινήσει το πείραμα επίσημα.

3.5.1. Δειγματοληψία

Όπως προαναφέρθηκε γινόταν δειγματοληψία κάθε μήνα. Η δειγματοληψία γινόταν για να εκτιμηθούν τα εξής:

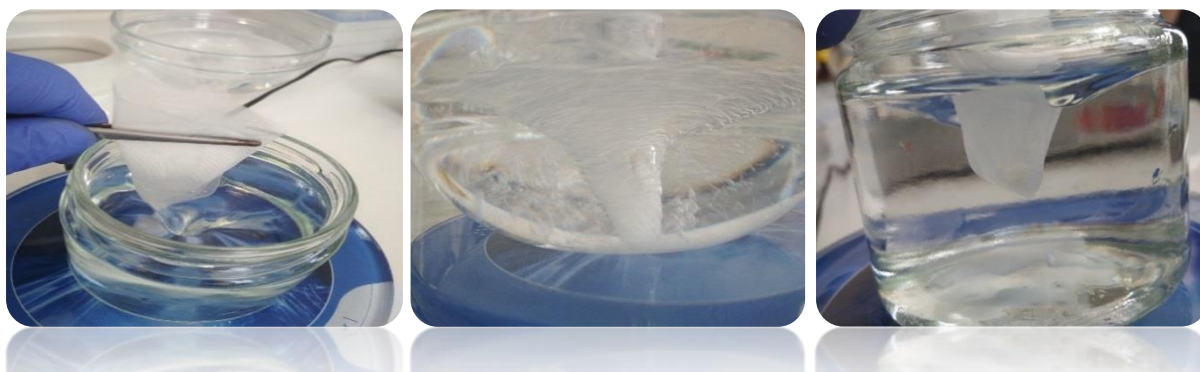
1. Μεταβολές βάρους των μικροπλαστικών
2. Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού
3. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών
4. Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων
5. Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών
6. Ανάλυση FTIR

3.5.2. Μετρήσεις Βάρους

Η μέτρηση του βάρους των μικροπλαστικών ήταν μια ιδιαίτερη διαδικασία καθώς τα μικροπλαστικά έπρεπε να υποστούν μια είδους πλύσης έτσι ώστε να αποκολληθεί από πάνω τους το βιοφίλμ το οποίο καθώς τα μεγέθη μάζας είναι της τάξεως μικρογραμμαρίων (μg), επηρέαζε φανερά το βάρος των μικροπλαστικών εμποδίζοντας έτσι την διαδικασία μέτρησης της μεταβολής του βάρους.

Αρχικά απομακρύνονταν το νερό που βρισκόταν μέσα στη φλάσκα μαζί με τους μικροοργανισμούς και τα μικροπλαστικά. Καθώς η φλάσκα άδειαζε το μίγμα περνούσε μέσα από ένα διχτάκι μεγέθους πόρου 250 μm, το οποίο συγκρατούσε τα μικροπλαστικά, τα οποία χρειαζόμασταν για να γίνουν οι μετρήσεις. Έγινε αποθήκευση μιας ποσότητας υγρού για να υποστεί περαιτέρω ανάλυση για τυχόν μικρότερων μεγεθών μικροπλαστικών τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα καθώς διαπερνούν το διχτάκι. Η φλάσκα καθαριζόταν 2-3 φορές αφού άδειαζε με απιονισμένο νερό ώστε να συλλεχθούν όλα τα μικροπλαστικά.

Το διχτάκι τοποθετούνταν μέσα στο μπολ το οποίο βρισκόταν πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα. Ο αναδευτήρας προκαλούσε έναν μικρό υδροστρόβιλο μέσα στον οποίο τοποθετούνταν το διχτάκι για να πετύχουμε την μέγιστη ανάδευση. Η ανάδευση αυτή μαζί με την ανάμιξη 2-3 σταγόνων Tween 80 ανά 100 mL απιονισμένου νερού, αποκολλούσε και απομάκρυνε το βιοφίλμ πάνω από την επιφάνεια των μικροπλαστικών. Η πλύση των μικροπλαστικών με το Tween 80 διαρκούσε 5 λεπτά. Ύστερα γινόταν η ίδια ακριβώς διαδικασία αλλά μόνο με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να ξεπλυθούν τελείως τα μικροπλαστικά από το tween 80 και να απομακρυνθεί και τυχόν βιοφίλμ που έχει ξεμείνει. Η διαδικασία φαίνεται παρακάτω στις φωτογραφίες.

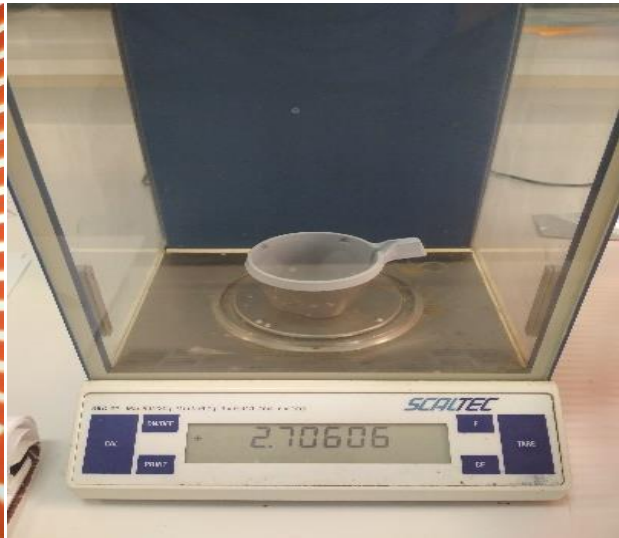


Εικόνα 21, 23, 24: Στις παραπάνω 3 εικόνες απεικονίζεται ένα μέρος της διαδικασίας της πλύσης των μικροπλαστικών ώστε να απομακρυνθεί το βιοφίλμ με tween 80.

Αφού η πλύση είχε πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια αιθανόλης απομακρύνονταν τα μικροπλαστικά από το διχτάκι και αποθηκεύονταν σε μικρά ήδη ζυγισμένα κύπελλα. Τα κύπελλα αυτά παρέμεναν στον φούρνο για 1-2 μέρες ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη και να μπορούν πλέον να ζυγιστούν.



Εικόνα 25 (αριστερά): Τα μικροπλαστικά αφού απομακρύνθηκαν από τον φούρνο που είχαν τοποθετηθεί για να φύγει η περαιτέρω υγρασία και να ζυγιστούν.



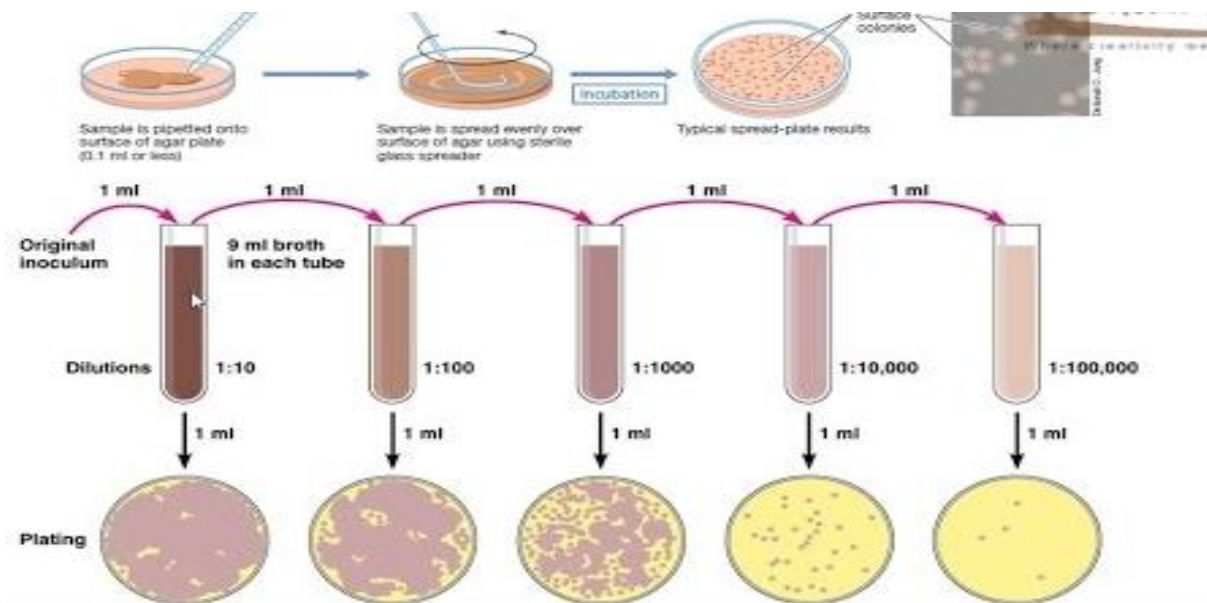
Εικόνα 26 (δεξιά): Ζύγιση μικροπλαστικών σε ζυγαριά ακριβείας.

Το Tween 80 είναι μία μη-ιονική τασιενεργός ουσία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως γαλακτωματοποιητής σε κοσμήματα, φαρμακευτικά και τροφικά προϊόντα. Χρησιμοποιήθηκε ως πρώτος μηχανισμός απομάκρυνσης του βιοφίλμ στο συγκεκριμένο πείραμα και ήταν αποτελεσματικό σε μεγάλο ποσοστό. Σε κάποιες από τις πλύσεις το tween80 δεν ήταν αποτελεσματικό διότι το βάρος ύστερα από την ξήρανση των μικροπλαστικών ήταν μεγαλύτερο από το αρχικό, πράγμα που μας υποδεικνύει ότι το βιοφίλμ δεν απομακρύνθηκε. Οι πλύσεις αυτές επαναλήφθηκαν και έφεραν καλύτερα αποτελέσματα.

Το διηθούμενο υγρό, στο οποίο βρίσκονταν μέσα τα μικροπλαστικά και οι μικροοργανισμοί, συλλέχθηκε για να πραγματοποιηθούν όλες οι επόμενες μετρήσεις της δειγματοληψίας.

3.5.3. Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την μέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού ήταν οι διαδοχικές αραιώσεις. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο ότι κάθε ζωντανό μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσει θυγατρικές αποικίες σε κατάλληλες συνθήκες (Άγαρ). Όπως φαίνεται και στην παρακάτω φωτογραφία 1 mL από την υγρή καλλιέργεια προστέθηκε σε 9 mL φιλτραρισμένου και αποστειρωμένου θαλασσινού νερού, και διαδοχικά ύστερα από ανάδευση της κάθε αραιώσης δημιουργούσαμε την αραιώση που ήταν η επιθυμητή. Οι αραιώσεις που θέλαμε να μετρήσουμε ήταν ανάλογες με τον πληθυσμό της κάθε κοινότητας. Επομένως μετρήθηκαν 4 αραιώσεις από κάθε κοινότητα 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} και 10^{-8} .



Εικόνα 27: Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού με την μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων (Πηγή: mediasrv.aua.gr)

Αφού οι αραιώσεις είχαν πραγματοποιηθεί με ιδιαίτερη προσοχή μέσα στον απαγωγό για να αποφευχθεί επιμόλυνση, γινόταν επίστρωση της επιθυμητής αραιώσης πάνω σε τρυβλία με Άγαρ, με σκοπό να αναπτυχθούν οι αποικίες. Η ποσότητα επίστρωσης ήταν 0.1 mL, και η επίστρωση γινόταν με τη βοήθεια ενός γυάλινου εργαλείου όπως διακρίνεται και στην Εικόνα 27.

3.5.4. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν οι ολικές πρωτεΐνες ήταν η μέθοδος “Lowry Assay: Protein by Folin Reaction” (LOWRY et al. 1951), η οποία είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος εκτίμησης πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την αντίδραση των ιόντων χαλκού (Cu^+) με τους πεπτιδικούς δεσμούς σε αλκοολικό περιβάλλον και την μείωση του Folin από την οξείδωση των υπολειμματικών αρωματικών οξέων με καταλυτικό παράγοντα το χαλκό. Το τελικό χρώμα από την μείωση του Folin δίνει ένα σκούρο μπλε χρώμα. Όση μεγαλύτερη η μείωση του Folin τόσο περισσότερες είναι οι πρωτεΐνες στο δείγμα και τόσο πιο σκούρο γίνεται το χρώμα.

Folin: phosphotungstic acid + phosphomolybdic acid

Για την διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο δημιουργήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα Α (αλκαλικό) (500mL): 2.8598 g NaOH + 14.3084 g Na_2CO_3

Διάλυμα Β (100mL): 1.4232 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$

Διάλυμα Γ (100mL): 2.85299g $\text{Na}_2\text{Tartrate} \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$

Διάλυμα Lowry: Διάλυμα Α + Διάλυμα Β + Διάλυμα Γ (100:1:1)

Διάλυμα Folin (φωτοευαίσθητο): 5mL Folin + 6mL απιονισμένο νερό

Αφού είχαν ετοιμαστεί όλα τα παραπάνω, ετοιμάστηκαν τα πρότυπα δείγματα αλβουμίνης βοδιού (Bovine Serum Albumin) για να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης. Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι αναγκαία για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση πρωτεΐνης ενός άγνωστου δείγματος με βάση την απορρόφηση του.

Τα πρότυπα που κατασκευάστηκαν μαζί με τις συγκεντρώσεις τους σε πρωτεΐνη φαίνονται παρακάτω:

Διάλυμα **B** (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 10 mL H_2O + 5 mg albumin

Διάλυμα **C** (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 2,5 mL H_2O + 2,5 mL B

Διάλυμα **D** (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 3 mL H_2O + 2 mL B

Διάλυμα **E** (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 3,5 mL H_2O + 1,5 mL B

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

Διάλυμα **G** (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 4 mL H_2O + 1 mL B

Διάλυμα **H** (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 2,5 mL H_2O + 2,5 mL E

Διάλυμα **I** (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 2,5 mL H_2O + 2,5 mL G

Διάλυμα **J** (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 2,5 mL H_2O + 2,5 mL I

Διάλυμα **X** (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 5 mL H_2O

Η διαδικασία ακολουθήθηκε βάση πρωτοκόλλου και έχει ως εξής:

- Προσθέσαμε 0.5 mL από όλα τα δείγματα (πρότυπα [BSA], Souda, Agios) σε μικρά γυάλινα φιαλίδια.
- 0.7 mL *Διάλυμα Lowry* σε όλα τα φιαλίδια (η διαδικασία προϋποθέτει ακρίβεια χρόνου, επομένως και ακολουθήσαμε καταγραφή του χρόνου που μπήκε το *Διάλυμα Lowry* σε κάθε φιαλίδιο)
- Αναμίξαμε καλά όλα τα φιαλίδια και τα αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά.
- 15 λεπτά μετά φτιάξαμε το *Διάλυμα Folin*
- Αμέσως μετά το πέρας των 20 λεπτών και με μεγάλη χρονική ακρίβεια για το κάθε δείγμα τοποθετήσαμε 0.1 mL *Διάλυμα Folin* και τα τοποθετήσαμε στο σκοτάδι για 30 min.
- Τοποθετήσαμε τα δείγματα σε κυβέτες και χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο μετρήσαμε την απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 750 nm ξεκινώντας με τα πρότυπα για να κατασκευάσουμε την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αφού έγιναν όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του εξοπλισμού που χρησιμοποιήσαμε και έγινε προσεκτική προσωρινή αποθήκευση των χημικών επικίνδυνων αποβλήτων.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε 2 φορές για να μετρηθούν τα δείγματα της καλλιέργειας της “Souda” και “Agios”, επομένως έγιναν 2 καμπύλες βαθμονόμησης με ευθείες παλινδρόμησης:

$$y = 0.0063x + 0.0292 \text{ (Souda)}$$

$$y = 0.006x + 0.0327 \text{ (Agios)}$$

όπου προστέθηκαν οι αντίστοιχες απορροφήσεις στο y για να βρεθούν οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.

3.5.5. Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων

Για τον υπολογισμό των υδατανθράκων όλα τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στις 12.000 rpm για 20 λεπτά για να αντικατασταθεί το θαλασσινό νερό με απιονισμένο.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των υδατανθράκων ήταν η μέθοδος της ανθρόνης. Η μέθοδος αυτή είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος με σχετική αναισθησία στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Το πρώτο βήμα στην εκτίμηση ολικών υδατανθράκων είναι η υδρόλυση των πολυσακχαριτών και η αφυδάτωση των μονομερών (προσθήκη θειικού οξέος και θερμότητας). Οι πεντόζες και οι εξόζες μετατρέπονται σε φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουραλη, αντίστοιχα. Ύστερα η ανθρόνη (αρωματική ένωση), αντιδρά με τα παραπάνω προϊόντα πέψης και δίνει μια έγχρωμη ένωση.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως πρότυπο διάλυμα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αραιώσεις και τα διαλύματα που ήταν αναγκαίο να δημιουργήσουμε για την εκτέλεση της διαδικασίας:

Διάλυμα **A** (20 mg/ml): 8 ml H_2O + 2 ml stock

Διάλυμα **B** (15 mg/mL): 8.5 mL H_2O + 1,5 mL stock

Διάλυμα **C** (10 mg/mL): 9 mL H_2O + 1 mL stock

Διάλυμα **D** (8 mg/mL): 9,2 mL H_2O + 0.8 mL stock

Διάλυμα **E** (5 mg/mL): 5 mL H_2O + 5 mL C

Διάλυμα **F** (1 mg/mL): 9 mL H_2O + 1 mL C

Διάλυμα **G** (0.5 mg/mL): 5 mL H_2O + 5 mL F

Διάλυμα **H** (0.1 mg/mL): 8 mL H_2O + 2 mL G

Διάλυμα **X** (0 mg/mL): 10 mL H_2O

Διάλυμα **75% H_2SO_4** (το οποίο ετοιμάστηκε 1 μέρα πριν)

Διάλυμα ανθρακενόνης: 0.5gr ανθρακενόνης διαλύθηκαν σε 5 mL καθαρής αιθανόλης (EtOH). Αφού διαλύθηκαν με την βοήθεια μιας μικρής αποστειρωμένης ράβδου, αναμίχθηκαν με 250 mL Διαλύματος **75% H_2SO_4** .

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Τοποθετήσαμε το διάλυμα της ανθρακενόνης και το διάλυμα 75% H_2SO_4 σε πάγο για να παγώσουν.
- Προσθέσαμε 1 mL δείγματος σε καθαρά γυάλινα φιαλίδια.
- Προσθέσαμε 2 mL διαλύματος 75% H_2SO_4 μέσα στα φιαλίδια με μεγάλη προσοχή γιατί το διάλυμα είναι ισχυρό οξύ, και αναμίξαμε.
- Προσθέσαμε 4 mL διαλύματος ανθρακενόνης και αναμίξαμε καλά.
- Τοποθετήσαμε όλα τα φιαλίδια στους 100°C για 15 λεπτά.
- Αφού κρύωσαν φωτομετρήθηκαν στα 578 nm.
- Τα χημικά απόβλητα αποθηκεύτηκαν προσεκτικά και προσωρινά μέχρι να διατεθούν σε ειδικές υπηρεσίες επικίνδυνων χημικών αποβλήτων.

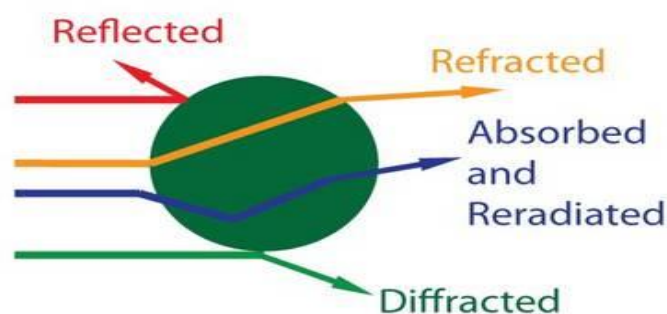
3.5.6. Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών

Όπως προαναφέρθηκε το πείραμα διήρκησε για 4 μήνες. Με τη βοήθεια του μηχανήματος SALD-7500 nano μετρήθηκε κάθε μέγεθος σωματιδίου και η ποσότητα αυτών. Οι μετρήσεις έγιναν στο διηθούμενο υγρό το οποίο συλλέχτηκε αμέσως μετά από τις πλύσεις των μικροπλαστικών, το οποίο υπενθυμίζεται ότι είχε φιλτρανθεί διαμέσου φίλτρου 250 μm για να μπορέσουν να συλλεχτούν τα μικροπλαστικά. Το συγκεκριμένο μηχάνημα παρέχει μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία στην μέτρηση των νάνο και μικρό σωματιδίων χαμηλής συγκέντρωσης κάτω από 1 ppm.



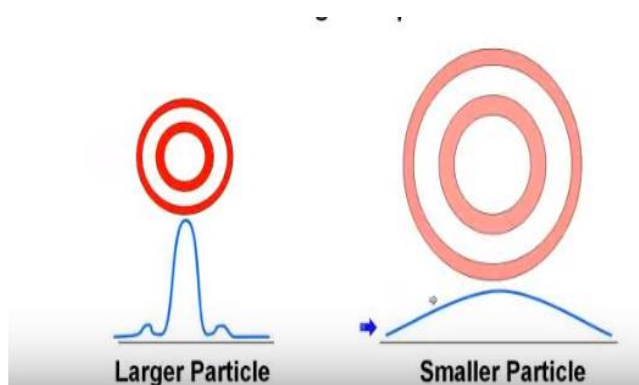
Εικόνα 28: Αναπαράσταση του SALD-7500nano

Αρχικά μηδενίζαμε το όργανο με την εισαγωγή 5 mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού και ύστερα εισαγάγαμε 5 mL από κάθε δείγμα για να ανάλυση. Τα αποτελέσματα εμφανίζονταν σε διαγράμματα κατανομής μεγέθους των μικροπλαστικών κατά όγκο και ποσότητα. Το μηχάνημα ακτινοβολεί μια δέσμη λέιζερ, η οποία συγκρούεται με κάθε σωματίδιο που υπάρχει μέσα στο δείγμα. Το σωματίδιο εκπέμπει φως προς κάθε κατεύθυνση. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 29, το φως είτε θα ανακλαστεί προς διάφορες κατευθύνσεις (reflected), είτε θα απορροφηθεί από το σωματίδιο (Absorbed), είτε θα υποστεί διάθλαση (refracted), είτε θα υποστεί περίθλαση (diffracted).

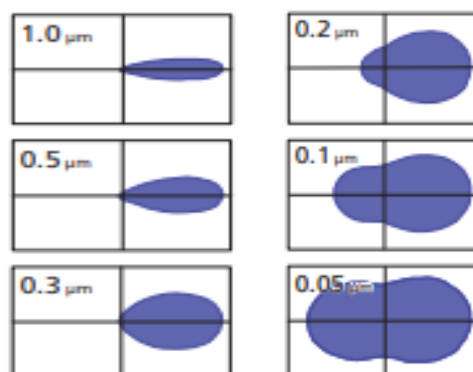


Εικόνα 29: Συμπεριφορά φωτός όταν προσκρούσει στην επιφάνεια ενός σωματιδίου

Οι 2 συνέπειες που μας ενδιαφέρουν είναι η διάθλαση και η περίθλαση καθώς δημιουργούν ένα ξεχωριστό μοτίβο για κάθε μέγεθος σωματιδίου. Αν η διάμετρος του σωματιδίου είναι μεγάλη, η ένταση της ακτίνας διάθλασης θα είναι μεγάλη και η γωνία της ακτίνας περίθλασης μικρή, επομένως το σκεδαζόμενο φως που εκπέμπεται θα συγκεντρώνεται στην μπροστινή κατεύθυνση. Αντιθέτως σε μικρότερα σωματίδια η ακτίνα διάθλασης γίνεται λιγότερο έντονη και η γωνία της ακτίνας περίθλασης μεγαλύτερη επομένως και η έκταση του μοτίβου μεγαλώνει, αλλά είναι λιγότερο έντονο (Εικόνες 30,31).



Εικόνα 30: Αποτύπωμα σωματιδίου.



Εικόνα 31: Μοτίβο αναγνώρισης μεγέθους σωματιδίων.

3.5.7. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία είναι μια μελέτη που βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη και εξετάζει την μεταβολή της ενεργειακής κατάστασης της ύλης, δηλαδή τη σύσταση, τη δομή και άλλες ιδιότητες της, αναλύοντας το φως σε επιμέρους συχνότητες.

Για να προσδιορίσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε τη χημική δομή της επιφάνειας του υλικού χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού τύπου Fourier (Frontier FT-IR spectrometer), και το λογισμικό Spectragryph v1.2.12. Ο βασικός σκοπός που χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο ήταν να παρατηρήσουμε τις αλλαγές στο χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο, ύστερα από τη βιοδιάσπαση από τους μικροοργανισμούς καθ' όλη την διάρκεια των 4 μηνών.

Το φάσμα απορρόφησης το οποίο έγιναν οι μετρήσεις ήταν $4000-400\text{ cm}^{-1}$ και η ανάλυση σάρωσης ορίστηκε στο 1 cm^{-1} . Παρακάτω φαίνονται οι χαρακτηριστικές ομάδες και σε ποιο μήκος κύματος παρατηρούνται:

Κετόνη ($-\text{CO}-$) @ 1715 cm^{-1}

Εστέρας ($-\text{COO}-$) @ 1740 cm^{-1}

Μεθύλιο ($-\text{CH}_3-$) @ 1465 cm^{-1}

Ενώσεις βινυλίου ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}-$) @ 1640 cm^{-1}

Διπλός δεσμός ($-\text{CH}=\text{CH}-$) @ 908 cm^{-1}

Υδροξύλιο ($-\text{OH}$) @ 3340 cm^{-1}

Ο βαθμός κρυσταλλικότητας εκφράζει το ποσοστό του κρυσταλλικού υλικού επί του συνόλου. Το πολυμερές αποτελείται από κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές. Όταν αποδομείται το υλικό, στην συγκεκριμένη περίπτωση το πλαστικό, δημιουργούνται άμορφες περιοχές στο πολυμερές, γι' αυτό και είναι μια ένδειξη βιοαποδόμησης. Επομένως, το ποσοστό της κρυσταλλικότητας της επιφάνειας για το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) προκύπτει από την ποσοτική αξιολόγηση των άμορφων έναντι των κρυσταλλικών περιοχών, και υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Zerbi et al. 1989) :

$$\% \text{ crystallinity} = 100 - \left[\frac{1 - (I_a/1.233I_b)}{1 + (I_a/I_b)} \right] 100,$$

Εικόνα 32: Τύπος κρυσταλλικότητας (Sudhakar et al. 2008)

Όπου I_a και I_b είναι η απορρόφηση στα 730 και στα 720 μήκη κύματος (cm^{-1}), αντίστοιχα.

Για να μετρηθούν τα δείγματα μας λόγω της ιδιαίτερης μορφής που είχαν, ήταν αναγκαίο να κατασκευαστούν δισκία KBr. Τοποθετούνταν $15\text{ }\mu\text{g}$ από το κάθε δείγμα στο γουδί, μαζί με $0,15\text{ g}$ βρωμιούχο κάλιο (KBr), το οποίο έχει μηδενική απορρόφηση από το μηχάνημα του FTIR, για να αναμιχθούν και να γίνουν ένα ομοιόμορφο μίγμα. Ύστερα τοποθετούνταν το μίγμα ανάμεσα από 2 μεταλλικούς κυλίνδρους για να οδηγηθεί στην αντλιόπρεσα. Στην αντλιόπρεσα τοποθετείται το κυλινδρικό το οποίο περιέχει μέσα το μίγμα και ασκείται υπό κενό πίεση ίση με 10 τόνους με την βοήθεια ενός μοχλού για 1 λεπτό. Το τελικό αποτέλεσμα δίνει ένα ημιδιαφανές δισκίο (το διαφανές μέρος του δισκίου είναι το KBr και το άσπρο τα μικροπλαστικά), το οποίο τοποθετείται για ανάλυση στο FTIR.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα δείγματα από κάθε φλάσκα τα οποία συντέλεσαν για να πραγματοποιηθούν οι παρακάτω μετρήσεις, εκτός από τον μετασχηματισμό Fourier, συλλέχτηκαν από το υγρό το οποίο βρισκόταν μέσα στις φλάσκες. Το βιοφίλμ ήταν αδύνατο να συλλεχθεί και να μετρηθεί, κυρίως λόγω των πολύ μικρών κομματιών πλαστικού.

4.1. Μείωση βάρους LDPE

Η συνεχής μείωση του βάρους του πλαστικού με το χρόνο είναι μια από τις φανερές ενδείξεις ότι οι μικροοργανισμοί μέσα στις φλάσκες είναι ενεργοί και αποδομούν τα μικροπλαστικά. Είναι από τις πιο πρακτικές και εύκολες μεθόδους για να διαπιστωθεί ότι η αποδόμηση του πλαστικού λαμβάνει χώρα (Kumar Sen and Raut 2015).

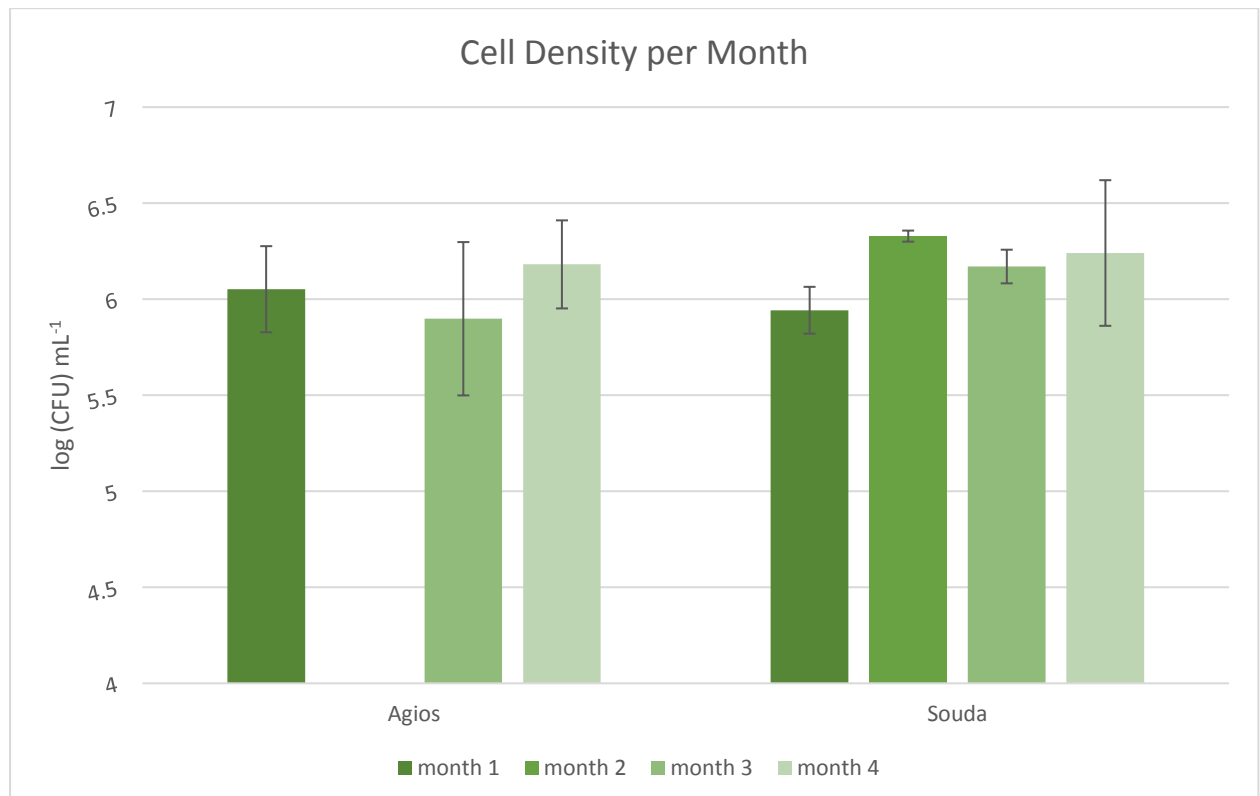
Ο 1^{ος} μήνας αφαιρέθηκε από το διάγραμμα καθώς οι μετρήσεις του ήταν αρκετά αναξιόπιστες και με μεγάλο σφάλμα, ειδικά για την καλλιέργεια του “Agios”. Όπως έχει προαναφερθεί (παράγραφο 3.2.4.1), οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται στην επιφάνεια των μικροπλαστικών δημιουργώντας μια κολλώδης αποικία γνωστή ως βιοφίλμ. Το βιοφίλμ, λόγω της πολύ μικρής κλίμακας βάρους των μικροπλαστικών, επηρεάζει τις μετρήσεις βάρους, αυξάνοντας το. Για να αποκολληθεί και να απομακρυνθεί το βιοφίλμ από το μικροπλαστικό, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με ειδικό για απομάκρυνση του βιοφίλμ υγρό, το Tween 80. Στον πρώτο μήνα οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν 2-3 φορές χωρίς να επιφέρουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, οπότε και δεν συμπεριλαμβάνονται στο διάγραμμα μείωσης βάρους. Επιπρόσθετα, θεωρούνται πλέον ως αναξιόπιστες μετρήσεις καθώς σε κάθε πλύση είναι πιθανό να χαθούν κάποια κομμάτια μικροπλαστικών, παρόλη την μεγάλη προσοχή και συγκέντρωση που δόθηκε κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πλύσεων, είναι δύσκολο να πει κανείς με σιγουριά ότι δεν χάθηκε κάποιο κομμάτι μικροπλαστικού.

Στον 2^ο μήνα η μείωση βάρους αγγίζει το 3.5 % και για την “Souda” και την “Agios”. Στον 3^ο μήνα, έχουμε μείωση περίπου στο 3% και για τις δύο καλλιέργειες, όσο είναι και περίπου το ποσοστό μείωσης για LDPE (αναμιγμένο με άμυλο) το οποίο εκτίθηκε σε 2 συγκεκριμένους θαλάσσιους μικροοργανισμούς (Sudhakar et al. 2008). Τον 4^ο μήνα, και οι δύο οι τιμές φαίνεται να ακολουθούν ένα άλλο μοτίβο, με την μείωση βάρους στην καλλιέργεια “Souda” να αυξάνεται ελάχιστα και στην καλλιέργεια “Agios” να μειώνεται κατακόρυφα. Αυτό για την περίπτωση της “Agios”, μπορεί να σημαίνει το προφανές, δηλαδή ότι η αποδόμηση του πλαστικού σιγά σιγά σταματάει και ότι οι μικροοργανισμοί οδεύουν προς τον θάνατο τους γιατί δεν μπορούν πλέον να τραφούν από το πλαστικό για οποιοδήποτε λόγο. Υπάρχει όμως και η πιο πιθανή περίπτωση το βιοφίλμ να γίνεται πιο παχύ με αποτέλεσμα να προσκολλώνται περισσότεροι μικροοργανισμοί στο μικροπλαστικό (πράγμα που σημαίνει αύξηση βάρους), και πιο ανθεκτικό προς το tween 80, επομένως να μην απομακρύνει αποτελεσματικά και ολοκληρωτικά το βιοφίλμ, και να επηρεάζει τις μετρήσεις. Οι τιμές φαίνεται να είναι αναξιόπιστες, διότι δεν ακολουθούν ένα μοτίβο και επίσης δεν συμφωνούν με τις υπόλοιπες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, όσον αναφορά την βιοαποδόμηση του πλαστικού. Σε συνδυασμό με τις άλλες μετρήσεις

μπορούν ίσως να βγάλουν κάποιο αποτέλεσμα. Το διάγραμμα μείωσης βάρους έχει τοποθετηθεί στο παράρτημα.

4.2. Πληθυσμός μικροβιακών κοινοτήτων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο μικροβιακός πληθυσμών των δύο κοινοτήτων ήταν αυτή των διαδοχικών αραιώσεων. Παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν οι μικρές κυκλικές αποικίες που δημιουργήθηκαν, όπου ποικίλαν σε αριθμό κυρίως ανάλογα με την αραιώση την οποία βρισκόμασταν, για να εκτιμηθεί ο πληθυσμός των κοινοτήτων. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ο πληθυσμός για κάθε μήνα.



Διάγραμμα 6: Μικροβιακός πληθυσμός κοινοτήτων “Souda” και “Agios” σε λογαριθμική κλίμακα.

Ο 2^{ος} μήνας της κοινότητας “Agios” δεν συμπεριλαμβάνεται στο Διάγραμμα 6 λόγω εργαστηριακού σφάλματος.

Και οι δύο κοινότητες τον 1^ο μήνα, όπως διακρίνεται από το Διάγραμμα 6, ότι είναι περίπου στο 10⁶ CFU/mL, πράγμα που σημαίνει ότι ξεπέρασαν την αρχική συγκέντρωση με την οποία εμβολιάστηκαν που ήταν 10⁵ CFU/mL. Στην κοινότητα “Agios”, διακρίνεται μια μείωση του πληθυσμού στον 3^ο μήνα και μια αύξηση του ιδίου τον 4^ο μήνα που ξεπερνάει τον 1^ο μήνα. Στην κοινότητα “Souda” παρατηρείται μια αύξηση του πληθυσμού από τον 1^ο στον 2^ο μήνα, με τον 2^ο μήνα να έχει μια αύξηση σχεδόν μια τάξης. Τον 3^ο μήνα παρατηρείται μια μικρή μείωση του πληθυσμού, αλλά τον 4^ο μήνα αυξάνεται ξανά.

Δεν διακρίνεται κάποιο μοτίβο σε καμία από τις 2 καλλιέργειες. Θα μπορούσε να παρατηρηθεί ότι υπάρχει και στις 2 κοινότητες μια αύξηση πληθυσμού από τον 3^ο στο 4^ο μήνα. Αν υπήρχε και ο 2^{ος} μήνας της “Agios”, και παρατηρούνταν το ίδιο μοτίβο και στις 2

καλλιέργειες θα μπορούσε να βγει ένα κοινό συμπέρασμα. Θα μπορούσε όμως και πάλι να ήταν απλά τυχαίο.

Το αξιοσημείωτο από το παραπάνω διάγραμμα είναι ότι ο πληθυσμός αρχικά ξεπέρασε την συγκέντρωση εμβολιασμού και δεν μειώθηκε ξανά σε αυτά τα επίπεδα, και το ότι υπάρχουν αυξητικές τάσεις σημαίνει ότι η κοινότητα μπορεί να επιβιώνει και να αναπτύσσεται με μόνη πηγή άνθρακα τα δευτερογενή μικροπλαστικά.

Για να διασπάσουν όμως τα μικροπλαστικά οι μικροοργανισμοί, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, προσκολλούνται πάνω στην επιφάνειά του και δημιουργούν το βιοφίλμ. Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν υπολογίστηκαν οι μικροοργανισμοί που προσκολλούνται πάνω στην επιφάνεια του μικροπλαστικού διότι το δείγμα για τις μετρήσεις ήταν το διηθούμενο θαλασσινό νερό που υπήρχε μέσα στις φλάσκες, όπως έχει προαναφερθεί. Επομένως η προσωρινή μείωση του πληθυσμού θα μπορούσε να αποδοθεί εκεί.

4.3. Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS)

Υπάρχουν 4 πιθανοί λόγοι για τους οποίους οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν βιοφίλμ (Jefferson 2004):

- Αμυντικός μηχανισμός: μέσω του βιοφίλμ οι μικροοργανισμοί δημιουργούν μια ασπίδα προστασίας, η οποία δεν έχει εξηγηθεί πλήρως γιατί είναι τόσο άτρωτη ακόμα. Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή. Η ασπίδα αυτή προσφέρει προστασία από στέρηση θρεπτικών, αλλαγές pH, ρίζες οξυγόνου, αντιβιοτικά και απολυμαντικά.
- Αποικισμός: οι μικροοργανισμοί αποικούν σε μια επιφάνεια όπου οι συνθήκες για αυτούς είναι ευνοϊκές (θερμοκρασία, pH, πηγή θρεπτικών, πηγή υγρασίας και οξυγόνου). Γι' αυτό και συχνά αποικίζουν στο ανθρώπινο σώμα (πλάκα στα δόντια).
- Κοινότητα: δημιουργούν κοινότητες για να επωφεληθούν από τα πλεονεκτήματα μιας συνεργατικής κοινότητας (με μια αλτρουιστική συμπεριφορά τα βακτήρια συμβιώνουν αυξάνοντας έτσι την συνολική ανάπτυξη), λειτουργώντας ως ένας πολυκύτταρος οργανισμός.
- Βιοφίλμ ως βασική λειτουργία ανάπτυξης: η συγκεκριμένη ενδεχόμενη θεωρία υποστηρίζει ότι το βιοφίλμ είναι, τουλάχιστον για κάποια είδη βακτηρίων, ο κύριος μηχανισμός ανάπτυξης τους.

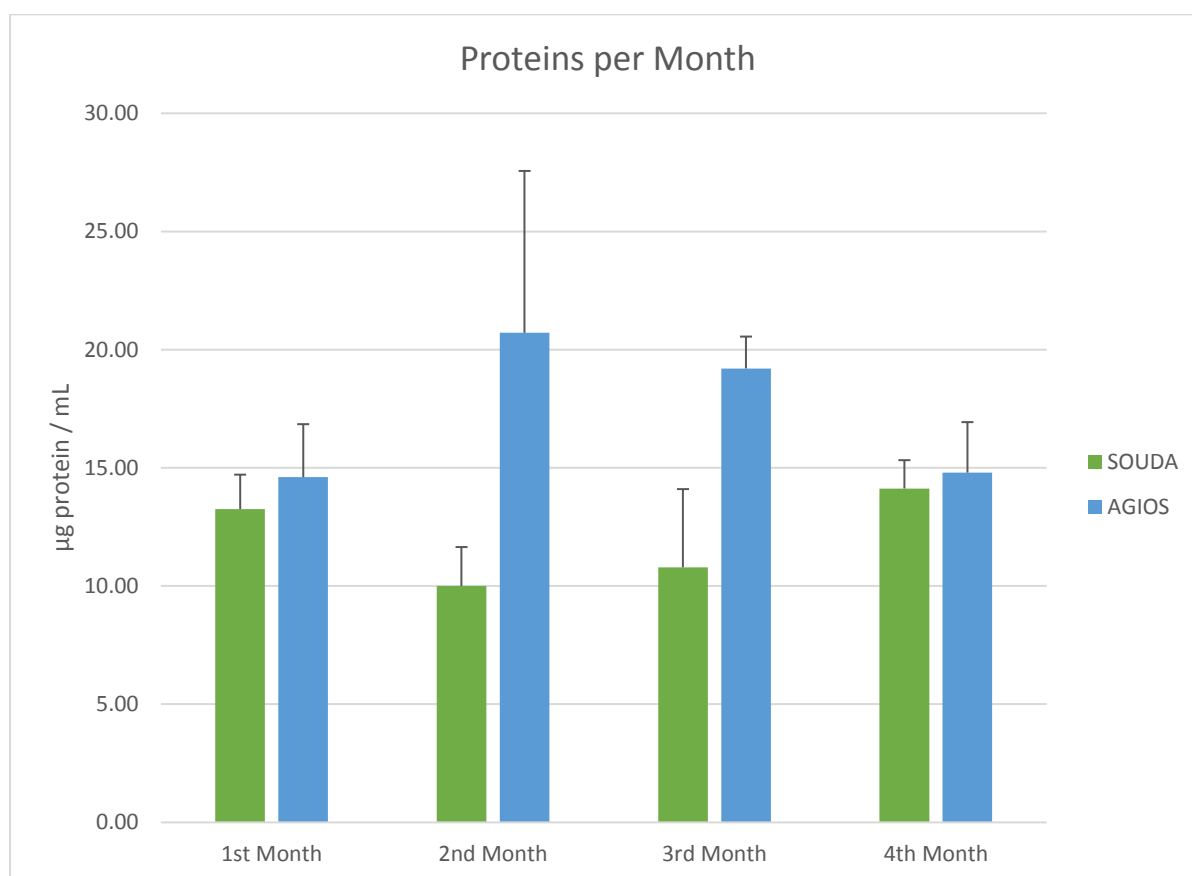
Τα βιοφίλμ εκτός από τους μικροοργανισμούς, τα πολυσθενή κατιόντα, τα βιογενή και ανόργανα σωματίδια, περιλαμβάνουν και τις εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPS). Τα "EPS", που τυπικά είναι ένα πολυμερές συσσωμάτωμα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA, είναι υπεύθυνα για την δομική και λειτουργική ακεραιότητα του βιοφίλμ. Τα βακτήρια για να διασπάσουν το πλαστικό, όπως έχει προαναφερθεί, σχηματίζουν βιοφίλμ πάνω στην επιφάνεια του μικροπλαστικού (Gilan, Hadar, and Sivan 2004). Επομένως οι μετρήσεις των EPS είναι ένας καλός δείκτης για την βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών στις φλάσκες μας. Στο συγκεκριμένο πείραμα μετρήσαμε τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες.

4.3.1. Υπολογισμός ολικών πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αποτελούν ίσως το σημαντικότερο συστατικό των κυττάρων, καθώς οι βασικές διεργασίες των οργανισμών όπως είναι η θρέψη, η κίνηση, η αναπαραγωγή και η αναπνοή δεν εκτελούνται χωρίς αυτές. Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια (μακρομόρια), τα οποία αποτελούνται από πολλά ενωμένα με πεπτιδικούς δεσμούς αμινοξέα (Wikipedia).

Οι πρωτεΐνες ποικίλουν ανάλογα με την ιδιότητα και την λειτουργία που εξυπηρετούν. Εκτός από της ζωτικής για το κύτταρο σημασίας, οι πρωτεΐνες περιέχονται στα EPS και διαδραματίζουν μεγάλο ρόλο ως δομικές, ενζυμικές πρωτεΐνες, καθώς και στην αποδόμηση των EPS.

Για την εκτίμηση των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε, όπως έχει προαναφερθεί (Παράγραφος 3.2.4.3.), η μέθοδος Lowry. Παρακάτω διακρίνεται το διάγραμμα των πρωτεϊνών για κάθε μήνα.



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα βάρους κατά όγκου πρωτεΐνης για κάθε μήνα

Οι μικροοργανισμοί δημιουργούν υδροφοβικές πρωτεΐνες, οι οποίες τους βοηθούν να προσκολληθούν στην επιφάνεια των μικροπλαστικών (Kumar Sen and Raut 2015).

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 7, ο 1^{ος} μήνας και στις 2 καλλιέργειες είναι κοντά στα 15 μg πρωτεΐνης ανά mL, με την “Souda” να φτάνει τα 13.25 μg protein/mL και την “Agios” στα 14.60 μg protein/mL. Στον 2^ο μήνα στη “Souda” μειώνονται οι πρωτεΐνες ενώ στην “Agios” αυξάνονται. Στην συνέχεια στον 3^ο μήνα οι πρωτεΐνες στην καλλιέργεια

“Souda” παραμένουν σταθερές και στον 4^ο αυξάνονται ξανά. Στην καλλιέργεια “Agios” διακρίνεται μια σταθερή μείωση από τον 2^ο μήνα έως τον 4^ο μήνα. Ο 2^{ος} μήνας εμφανίζει μεγάλο εργαστηριακό σφάλμα αλλά δεν επηρεάζει και τόσο τις μετρήσεις καθώς κυμαίνεται κοντά στις υπόλοιπες.

Η σημαντικότερη ένδειξη από το παραπάνω διάγραμμα είναι η επιβεβαίωση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών στους 4 αυτούς μήνες με μόνη πηγή άνθρακα τα μικροπλαστικά. Οι πρωτεΐνες επίσης παίζουν μεγάλο ρόλο όπως προαναφέρθηκε όχι μόνο στην προσκόλληση, αλλά στον σχηματισμό και στην διατήρηση του βιοφίλμ, με αποτέλεσμα να σηματοδοτούν μια υγιή και σταθερή κοινότητα μικροοργανισμών.

Οι αυξομειώσεις των μετρήσεων εφόσον δεν γνωρίζουμε την ποσότητα των πρωτεϊνών στο βιοφίλμ που δημιουργείται ή που ήδη υπάρχει, δεν μπορεί να μας βγάλει κάποιο καθολικό συμπέρασμα για τους μικροοργανισμούς. Σε συνδυασμό όμως με τον πληθυσμό των κοινοτήτων, μπορούμε να πούμε ότι οι μειώσεις θα μπορούσαν να οφείλονται στην σύνθεση του βιοφίλμ και στην προσαρμογή των μικροοργανισμών στην μόνη πηγή άνθρακα που διαθέταν. Η αύξηση των πρωτεϊνών επίσης θα μπορούσε να οφείλεται στην αύξηση του πληθυσμού αλλά και στην τάση των μικροοργανισμών να δημιουργούν υδροφοβικές πρωτεΐνες, που τους βοηθούν στο να προσκολληθούν στην διαθέσιμη επιφάνεια (Branda et al. 2005).

4.3.2. Υπολογισμός υδατανθράκων

Δυστυχώς, η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για τους υδατάνθρακες ήταν μη αποτελεσματική όσον αφορά τα αποτελέσματα που εξήγαγε. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε πάνω από 3 φορές για να επιβεβαιωθεί ότι δεν έγκειται σε εργαστηριακό σφάλμα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συγκέντρωση τους ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, δηλαδή ήταν πολύ χαμηλή σε όλη την πειραματική διάρκεια.

4.4. Κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών

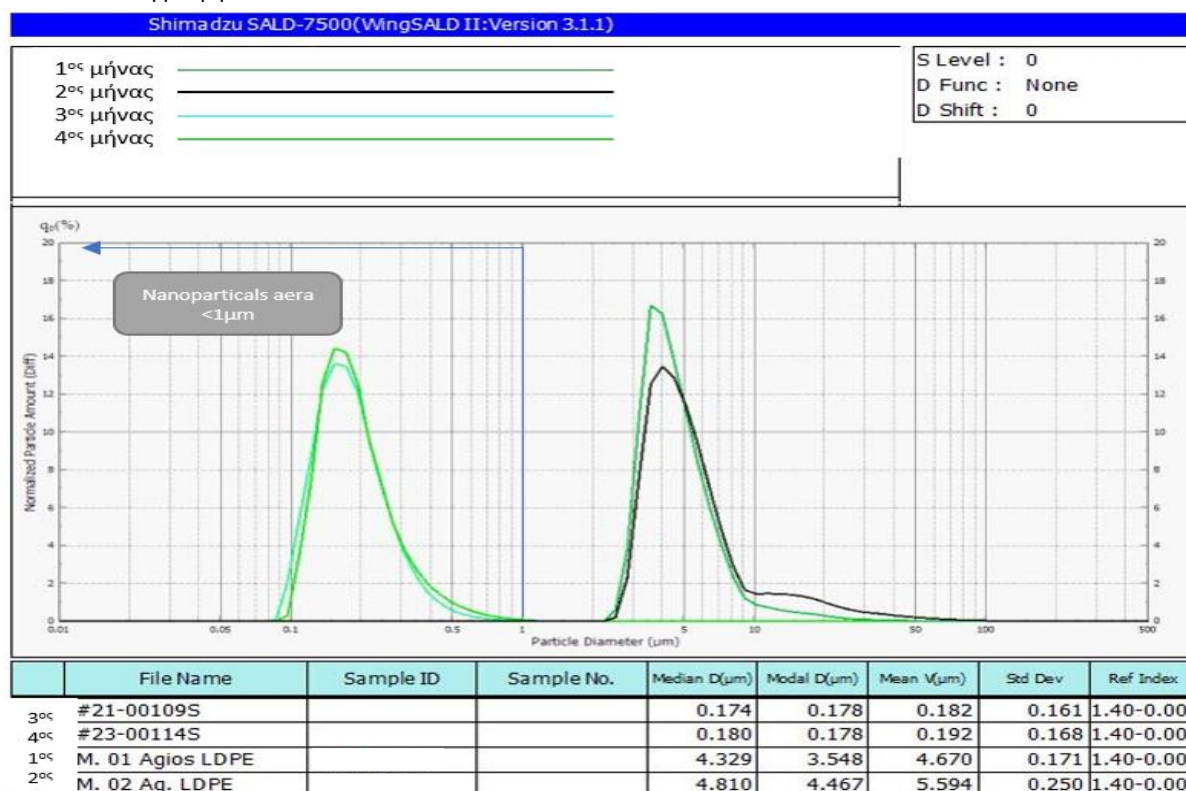
Το μέγεθος των μικροπλαστικών κυμαινόταν, κατά την διάρκεια των 4 μηνών του πειράματος καθώς οι μικροοργανισμοί προσκολλιούνταν πάνω στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα να αποδομούν ή και να κατακερματίζουν το πλαστικό αλλάζοντας έτσι το μέγεθος τους (διάμετρο). Η κατανομή των μεγεθών των μικροπλαστικών μετρήθηκε με το σύστημα “SALD-7500nano”. Τα διαγράμματα διακρίνονται στα διαγράμματα ποσότητας (number), όπου παρουσιάζονται τα μεγέθη των μικροπλαστικών δίνοντας έμφαση στην συγκέντρωση των στερεών μικροσωματιδίων, και στα διαγράμματα όγκου (volume), όπου παρουσιάζεται η διασπορά του μεγέθους τους με κύρια παράμετρο τον όγκο των στερεών μικροσωματιδίων. Η στήλη “Mean V” εμφανίζει τα δεδομένα της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων μετρώντας τα σωματίδια είτε ποσοτικά (Number), είτε ογκομετρικά (Volume). Ως δείγμα ελέγχου (τυφλό) χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες των διαγραμμάτων όπως τις πήραμε από το πρόγραμμα Shimadzu SALD-7500.

Σε αυτό το σημείο συνιστάται η ορθή κατανόηση της διαφοράς των δυο αυτών διαγραμμάτων, ποσοτικό (Number) και ογκομετρικό (Volume), γιατί ο συνδυασμός τους μας δίνει πλήρης πληροφορίες για την διασπορά μεγέθους των μικροπλαστικών μέσα στο

υγρό. Το διάγραμμα ποσότητας μετράει τον αριθμό των σωματιδίων που ανιχνεύει μέσα στο υγρό και με βάση το μέγεθος τους τα κατανέμει στο διάγραμμα, συσχετίζοντας ταυτόχρονα ποσοτικά τα διάφορα μεγέθη που εμπεριέχονται στο υγρό. Δηλαδή, αν υπάρχουν πολλά σε ποσότητα π.χ. των 1 μm , και ταυτόχρονα το μηχάνημα έχει ανιχνεύσει ελάχιστα ποσοτικά σωματίδια των 100 μm , η ένδειξη για των 100 μm θα είναι στο μηδέν. Με λίγα λόγια το διάγραμμα ποσότητας διακρίνει τι υπερσχύει ποσοτικά μέσα στο δείγμα. Αντίστοιχα, το διάγραμμα όγκου διακρίνει τι υπερσχύει ογκομετρικά μέσα στο δείγμα. Για παράδειγμα, μπορεί να υπάρχει ένα σωματίδιο μεγάλου όγκου που θα υπερσχύσει στο διάγραμμα όγκου και 1000 σωματίδια πολύ μικρότερου όγκου. Το μεγάλο σε όγκο σωματίδιο δεν θα διακρίνεται στο διάγραμμα ποσότητας, γιατί θα είναι 1 ενώ τα μικρότερα θα είναι 1000 σε αριθμό. Όμως αν αυτά τα 1000 μικρά σωματίδια, συνολικά καταλαμβάνουν αρκετό όγκο, σχετικά με το μεγάλο σωματίδιο, αυτά θα φαίνονται στο διάγραμμα όγκου.

4.4.1. Κατανομή μεγέθους για την κοινότητα “Agios”

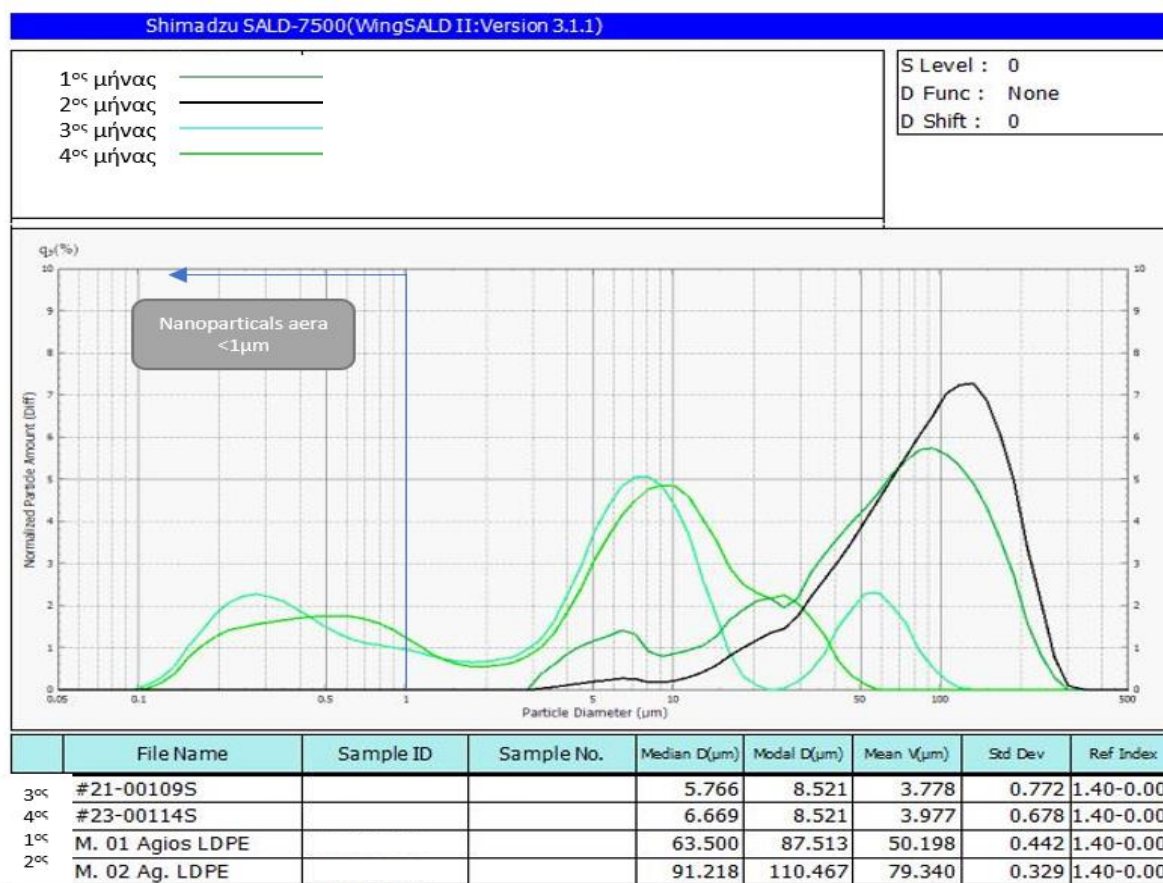
4.4.2. Διάγραμμα “Number”



Διάγραμμα 8: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών για την κοινότητα “Agios” με βάση την συγκέντρωση τους (Number) ανά μήνα.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η κατανομή διαμέτρου της κοινότητας “Agios”, με κριτήριο την ποσότητα των σωματιδίων μέσα στο δείγμα. Παρατηρώντας την στήλη της μέσης διαμέτρου (Mean V) των σωματιδίων, φαίνεται μια ξεκάθαρη και σημαντική μείωση της, τον 3^ο και τον 4^ο μήνα. Πιο συγκεκριμένα η μέση διάμετρος μειώθηκε από περίπου 5 μm που ήταν τους πρώτους 2 μήνες, στα 0.2 μm περίπου. Όπως διαπιστώνεται και σχηματικά από το διάγραμμα, ο 3^{ος} και ο 4^{ος} μήνας έχουν μεγάλο αριθμό μικρότερων σωματιδίων.

4.4.3. Διάγραμμα “Volume”



Διάγραμμα 9: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών για την κοινότητα “Agios” με βάση τον όγκο τους (Volume) ανά μήνα.

Στο Διάγραμμα 9 διακρίνεται η κατανομή διαμέτρου των μικροπλαστικών με κύρια παράμετρο τον όγκο τους. Παρατηρείται ξανά το ίδιο μοτίβο αλλαγής της μέσης διαμέτρου σχετικά με το ποσοτικό διάγραμμα, με την διαφορά ότι η μέση διάμετρος έχει μεγαλύτερα νούμερα σχετικά με το διάγραμμα ποσότητας και η αύξηση του 1^{ου} από του 2^{ου} μήνα είναι μεγαλύτερη.

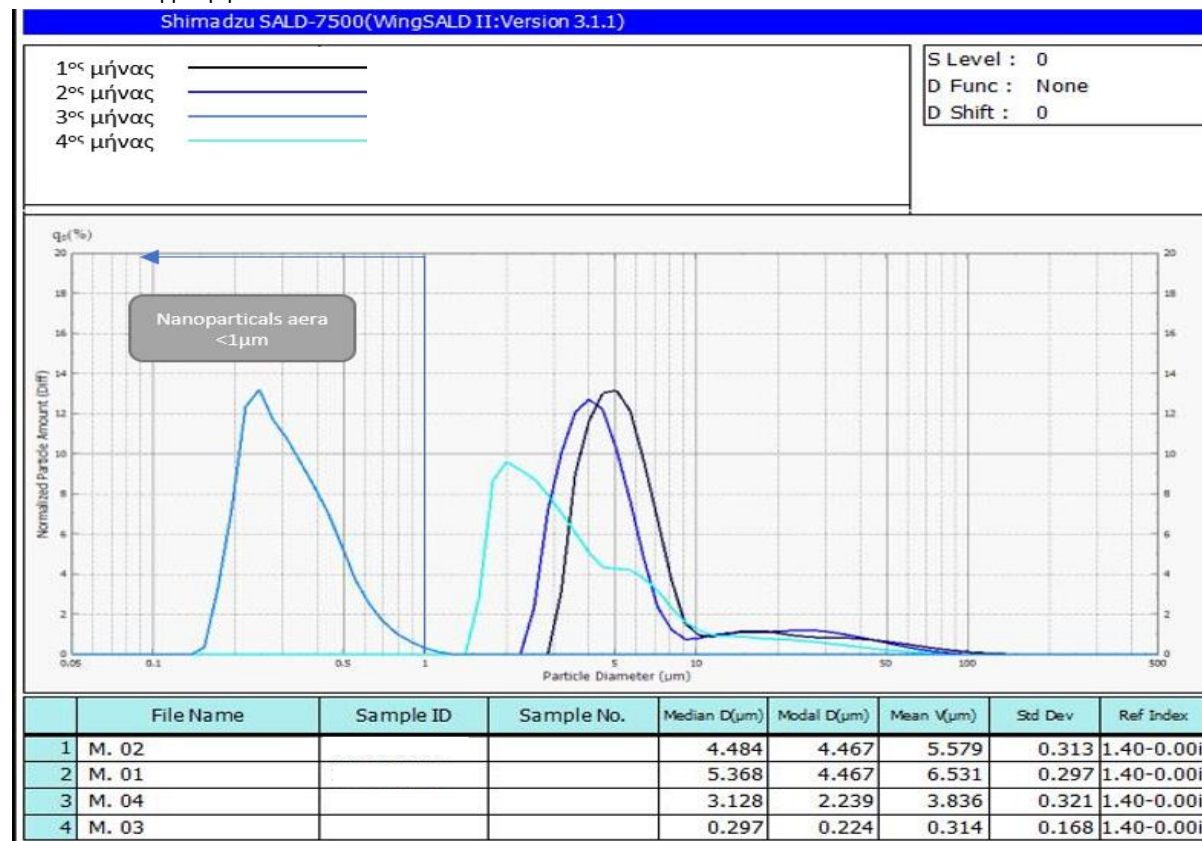
4.4.4. Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Όπως φαίνεται και στα δύο παραπάνω διαγράμματα, υπάρχει μια αύξηση στην μέση διάμετρο των μικροσωματιδίων στον 2^ο μήνα σχετικά με τον 1^ο μήνα. Αυτή η αύξηση αποδίδεται στο ότι τα μικροπλαστικά που μπήκαν σε κάθε φλάσκα δεν έχουν καθορισμένο μέγεθος. Σε κάθε φλάσκα μπήκαν διαφορετικού μεγέθους μικροπλαστικά, και οι φλάσκες του 2^{ου} μήνα διαφέρουν από τις φλάσκες του 1^{ου} μήνα, διότι για να γίνουν οι προκαθορισμένες μετρήσεις όπως έχει προαναφερθεί κάθε μήνα απομακρύνονταν 3 φλάσκες. Επομένως, δεν υφίσταται αύξηση μέσης διαμέτρου αλλά διαφορετικό δείγμα, και ενδεχομένως διαφορετικού μεγέθους απόσπασης κομματιών. Όμως στον 3^ο και τον 4^ο μήνα βλέπουμε ξεκάθαρη ποσότητα σωματιδίων που έχουν μικρότερη διάμετρο, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι τα μικροπλαστικά αποδομούνται/κατακερματίζονται από τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί με την δημιουργία του βιοφίλμ διασπούν το μικροπλαστικό σε μικρότερα κομμάτια τα οποία καταλήγουν να περιφέρονται στο υγρό. Η διάσπαση τους δεν σταματάει στο βιοφίλμ αλλά λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους που έχουν καταλήξει, διευκολύνουν τους μικροοργανισμούς να το διασπασουν περαιτέρω. Το

τελευταίο, μπορεί να παρατηρηθεί στο διάγραμμα όγκου, όπου διακρίνεται ότι ο όγκος που καταλαμβάνουν τα μεγαλύτερα σωματίδια όλο και μειώνεται, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι διασπώνται τα μεγαλύτερα σωματίδια σε μικρότερα με την πάροδο του κάθε μήνα. Από το διάγραμμα όγκου για τον 3^ο και 4^ο μήνα, φαίνονται κάποια μεγάλα σχετικά σωματίδια που υπάρχουν στο δείγμα. Όμως στο διάγραμμα ποσότητας παρατηρείται μεγάλη αύξηση των μικρών σωματιδίων, με αποτέλεσμα να μην διακρίνονται καθόλου τα μεγαλύτερα σωματίδια που υπάρχουν στο δείγμα, επιβεβαιώνοντας έτσι την υπεροχή σε αριθμό των πολύ μικρών σωματιδίων στο δείγμα. Τα μικροσωματίδια του 3^{ου} και 4^{ου} μήνα παρατηρούνται κάτω από 1 μm , επομένως χαρακτηρίζονται ως νανοπλαστικά.

4.4.5. Κατανομή μεγέθους για την κοινότητα “Souda”

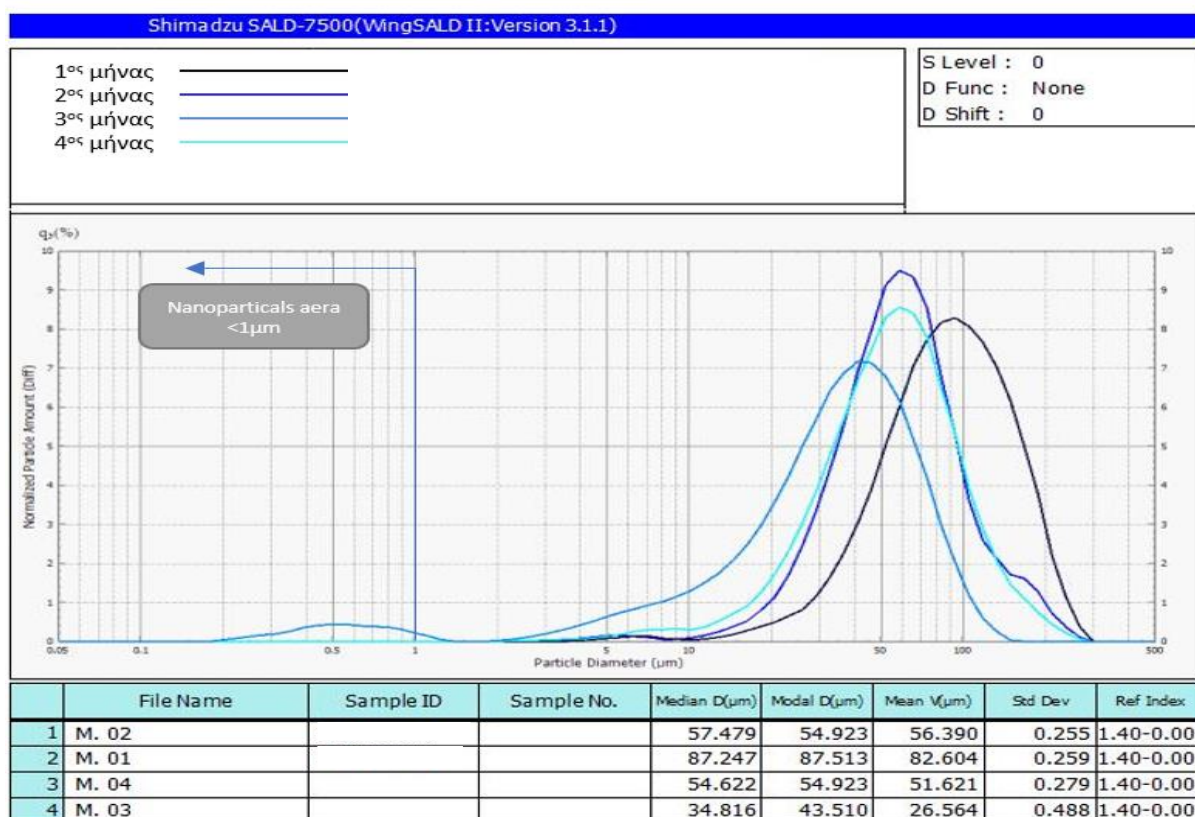
4.4.6. Διάγραμμα “Number”



Διάγραμμα 10: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών για την κοινότητα “Souda” με βάση την συγκέντρωση τους (Number) ανά μήνα.

Παρατηρώντας την μέση διάμετρο των σωματιδίων, φαίνεται να μειώνεται από τον 1^ο μήνα έως τον 3^ο μήνα και από τον 3^ο στον 4^ο μήνα να αυξάνεται ξανά. Αναλυτικότερα, η μέση διάμετρος του 1^{ου} μήνα ανέρχεται στα 6.531 μm , στον 2^ο μήνα η μέση διάμετρος μειώνεται στα 5.579 μm , στον 3^ο πέφτει κατακόρυφα στα 0.314 μm και στο 4^ο παρατηρείται αύξηση της μέσης συγκέντρωσης στα 3.836 μm .

4.4.7. Διάγραμμα “Volume”



Διάγραμμα 11: Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών για την κοινότητα “Souda” με βάση την όγκο τους (Volume) ανά μήνα

Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται στο διάγραμμα όγκου (Volume) της κοινότητας “Souda” σε σχέση με το διάγραμμα ποσότητας (Number) της ίδιας. Παρατηρήθηκε μείωση της μέσης διαμέτρου των μικροπλαστικών σωματιδίων από τον 1^ο έως τον 3^ο μήνα, και μετέπειτα αύξηση στον 4^ο μήνα. Επίσης, παρατηρείται ότι τα σχετικά μεγάλα σωματίδια υπερτερούν σε όλους τους μήνες (ογκομετρικά), με το μέγεθος διαμέτρου των σωματιδίων να πέφτει κάθε μήνα σε ένα μικρό ποσοστό μέχρι τον 3^ο μήνα και στον 4^ο μήνα να αυξάνεται ξανά.

4.4.8. Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Όπως και στην καλλιέργεια της “Agios”, έτσι και εδώ παρατηρείται ότι ο 1^{ος} και ο 2^{ος} μήνας είναι σχετικά κοντά όσον αναφορά τις αλλαγές στην διάμετρο των σωματιδίων. Από τον 3^ο μήνα, όπως παρατηρήθηκε και στην καλλιέργεια “Agios”, τα σωματίδια που βρίσκονται σε κλίμακα νάνο υπερτερούν σε αριθμό από τα υπόλοιπα. Συμπερασματικά, οι μικροοργανισμοί που έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια των μικροπλαστικών, το διασπούν αποτελεσματικά με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται νανοπλαστικά τον 3^ο μήνα διεξαγωγής του πειράματος. Τα νανοπλαστικά επίσης είναι πολύ πιθανόν να προέρχονται από την βιοαποδόμηση των μη προσκολλημένων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο διηθούμενο υγρό. Τον 4^ο μήνα δεν ανιχνεύονται νανοπλαστικά. Αντ’ αυτού, παρατηρείται μια ποσοτική αύξηση αλλά και μια αύξηση όγκου, σχετικά με τον 3^ο μήνα, όσον αναφορά τη διάμετρο των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, ο 3^{ος} μήνας στο ποσοτικό διάγραμμα, φαίνεται να έχει ένα μεγάλο αριθμό σωματιδίων που κυμαίνονται σε μέγεθος από 0,2-1 μm περίπου, ενώ ο 4^{ος} μήνας περίπου από 2-50μm. Παρατηρώντας όμως και το

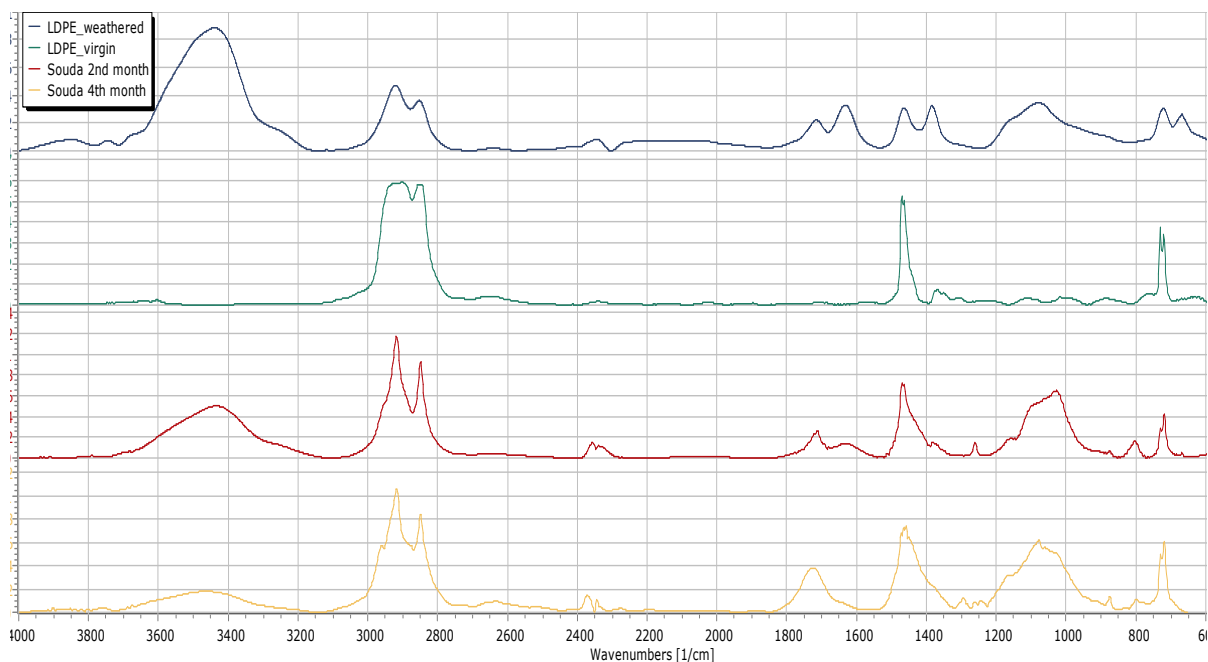
ογκομετρικό διάγραμμα της “Souda”, διακρίνεται ότι και ο 3^{ος} μήνας έχει αρκετά μεγάλα κομμάτια πλαστικού (2-100 μm) μέσα στο υγρό τα οποία καταλαμβάνουν αρκετό όγκο. Διακρίνεται επίσης μια μικρή σχετικά με τις υπόλοιπες ανίχνευση, στα 0.2-1 μm , που σημαίνει ότι και τα νανοπλαστικά το 3^ο μήνα καταλαμβάνουν σημαντικό όγκο. Επίσης από το διάγραμμα διακρίνεται, ότι ο 4^{ος} μήνας έχει και αυτός μεγάλα κομμάτια και μάλιστα μεγαλύτερα από τον 3^ο μήνα.

Με τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι μικροοργανισμοί “πρόλαβαν” να καταναλώσουν τα νανοπλαστικά τα οποία είχαν δημιουργηθεί τον 3^ο μήνα καθιστώντας τα μη ανιχνεύσιμα από το μηχάνημα. Τον 3^ο μήνα υπήρχαν αρκετά μεγάλα σωματίδια (Volume), τα οποία δυσκόλευαν τους μικροοργανισμούς να αποδομήσουν, επομένως στράφηκαν προς τα μικρότερα σε διάμετρο σωματίδια (νανοπλαστικά), με αποτέλεσμα τον 4^ο μήνα να εμφανίζονται μόνο τα μεγαλύτερα σωματίδια και καθόλου τα νανοπλαστικά.

4.5. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα με σκοπό την ανίχνευση των οξειδώσεων της επιφάνειας του υλικού και τον εντοπισμό της δημιουργίας καινούργιων χαρακτηριστικών ομάδων κατά την διαδικασία της γήρανσης και αποδόμησης από τους μικροοργανισμούς. Η ανάλυση σάρωσης (scan resolution), ορίστηκε στα 4 cm^{-1} για τιμές απορρόφησης 4000-400 cm^{-1} . Οι αναλύσεις έγιναν για κάθε μήνα από τον 1^ο έως τον 4^ο, και συγκρίθηκαν ξεχωριστά ως κοινότητες, σε κάθε διάγραμμα-εικόνα.

Παρακάτω διακρίνεται η φασματογραφία του εργοστασιακού τύπου φιλμ που δεν έχει υποστεί ούτε γήρανση ούτε αποδόμηση (LDPE_virgin), ενός φιλμ αφού έχει εκτεθεί σε UV-A ακτινοβολία για 7 μήνες (LDPE_weathered), και ενός φιλμ που έχει εκτεθεί στη μικροβιακή δράση της κοινότητας “Souda”, για 2 και για 4 μήνες.



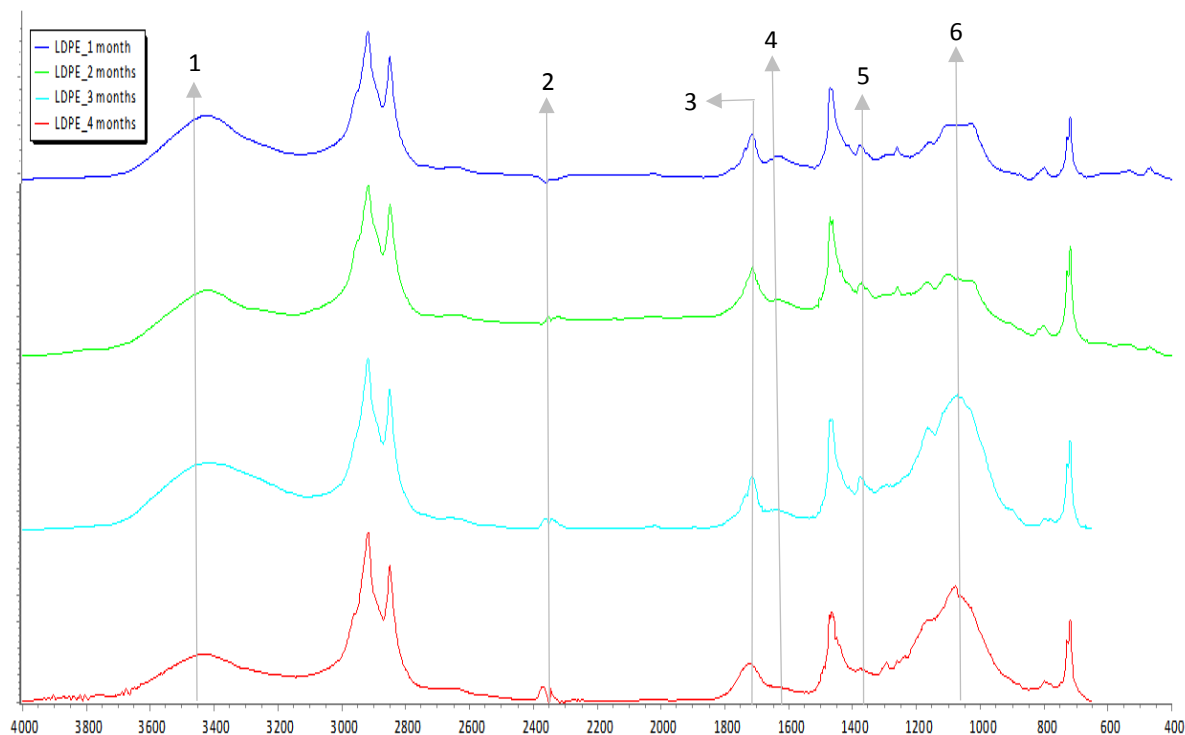
Διάγραμμα 12: Φασματογραφία “LDPE_virgin”, “LDPE_weathered”, “Souda” 2nd and 4th month.

Οι οξειδώσεις που προκαλεί η έκθεση της UV-A ακτινοβολίας είναι εμφανής στο διάγραμμα 12, καθώς παρατηρούνται αλλαγές σε σύγκριση με το “παρθένο” πολυαιθυλένιο. Μεγάλη διαφορά εμφανίζεται μεταξύ “LDPE_weathered” και “Souda 2nd and 4th month” στην περιοχή του υδροξυλίου στα 3300 – 3600 cm⁻¹, των καρβονυλικών ομάδων (>C=O, 1700-1800 cm⁻¹), στην περιοχή με κυματοαριθμό 1200-900 cm⁻¹, όπου βρίσκονται και οι ενώσεις διπλού δεσμού.

Παρακάτω διακρίνονται τα διαγράμματα της φασματογραφίας για την κοινότητα “Agios” και “Souda” και για τους 4 μήνες εκτέλεσης του πειράματος. Προτού όμως υποστούν βιοαποδόμηση από τους μικροοργανισμούς, οι επιφάνειες των μικροπλαστικών είχαν εκτεθεί ως φιλμ σε UV-A ακτινοβολία. Μετά το πέρας της έκθεσης του στην ακτινοβολία, το γηρασμένο πλέον πλαστικό, περιέχει ακόρεστους δεσμούς, οι οποίοι οδηγούν σε αντιδράσεις διάσπασης αλυσίδας (Διάγραμμα 12). Νέοι χημικοί δεσμοί σχηματίζονται. Η UV-A ακτινοβολία φωτο-οξειδώνει την επιφάνεια του υλικού, παρουσιάζοντας μεταβολές στους δεσμούς της επιφάνειας του υλικού κυρίως στις περιοχές των υδροξυλικών ομάδων (R-OH, 3300-3600 cm⁻¹) και των καρβονυλικών ομάδων (>C=O, 1700-1800 cm⁻¹). Έτσι, δημιουργούνται προϊόντα οξείδωσης, όπως τους εστέρες στα 1735 cm⁻¹, τις συζευγμένες κετόνες στα 1718cm⁻¹ και τις βινυλικές ομάδες στα 1640 cm⁻¹ και στα 915 cm⁻¹.

4.5.1. Κοινότητα “Agios”

4.5.2. Φασματογραφία (FTIR) “Agios”

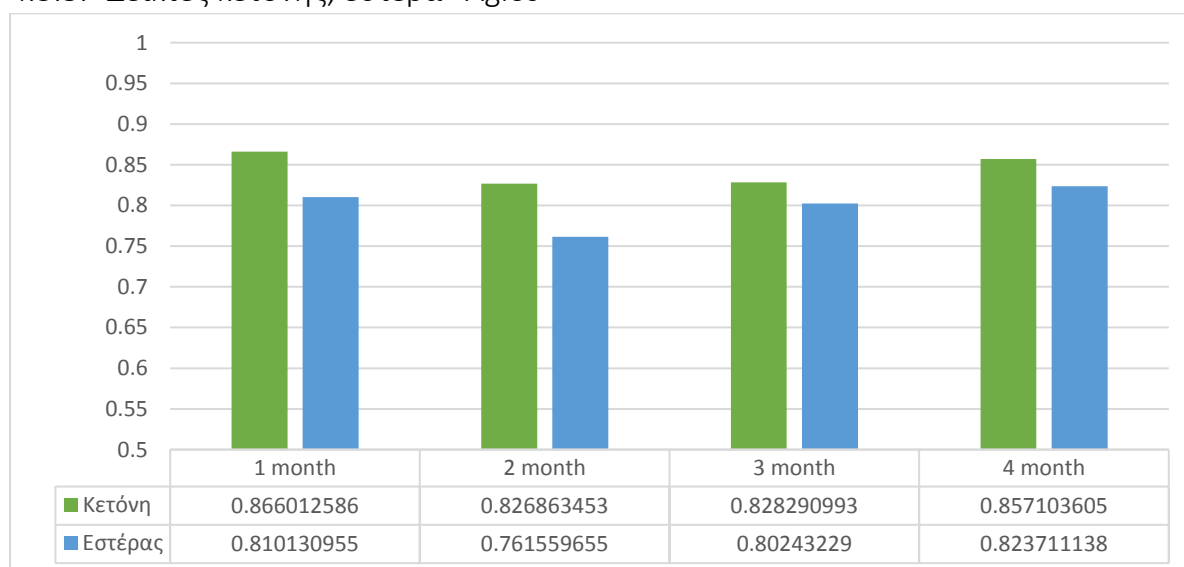


Διάγραμμα 13: Φασματογραφία FTIR της κοινότητας “Agios”, για κάθε μήνα που εκτελέστηκε το πείραμα.

Πέρα όμως από τις μεταβολές που δημιουργεί η φωτο-οξείδωση, παρατηρούνται και άλλες μεταβολές από τον 1^ο μήνα μέχρι τον 4^ο, για τις οποίες είναι υπεύθυνοι οι μικροοργανισμοί που βιοαποδομούν και διασπούν την επιφάνεια των μικροπλαστικών. Στις περιοχές 1650-1800 cm⁻¹ (σημείο 3), όπου βρίσκεται η περιοχή των καρβονυλομάδων (κετόνη, εστέρας),

διακρίνεται μια ελάχιστη μεταβολή τους, η οποία θα ξεκαθαριστεί καλύτερα με τους δείκτες που θα αναλυθούν παρακάτω. Στο σημείο 2 του παραπάνω διαγράμματος, διακρίνεται μια μεταβολή στα 2350 cm^{-1} περίπου, όπου εκεί βρίσκονται οι δεσμοί του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) (Zhu et al. 2014). Στα 1640 cm^{-1} (σημείο 4), εμφανίζεται ο δεσμός βινυλίου, όπου δεν διακρίνεται να έχει υποστεί κάποια ιδιαίτερη αλλαγή. Στο σημείο 5, παρατηρείται ότι στους τρεις πρώτους μήνες ο δεσμός αυτός, ο οποίος ανήκει στις μεθυλομάδες (CH_3) στα $1360\text{-}1373\text{ cm}^{-1}$ (Zhang et al. 2013), φαίνεται να έχει υποστεί κάποιες αλλαγές, ενώ τον 4^ο μήνα σχεδόν εξαφανίζεται από το διάγραμμα 13. Στην περιοχή από $850\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ (σημείο 6), παρατηρούνται αρκετά μεγάλες αλλαγές κυρίως από τον 3^ο μήνα και μετά. Ενώ στον 1^ο και 2^ο μήνα φαίνεται να μην αλλάζει κάτι, στον 3^ο μήνα διακρίνεται μια μεγάλη σχετικά καμπύλη, η οποία υπάρχει και στον 4^ο μήνα με λίγες διαφοροποιήσεις. Στο εύρος αυτό υπάρχουν δεσμοί όπως: στα 1134 cm^{-1} αιθέρας (C-O-C), στα 1060 cm^{-1} αλκοόλη (C-O), στα 923 cm^{-1} (O-N) αμινοξύ, κ.α. (Segneanu et al. n.d.).

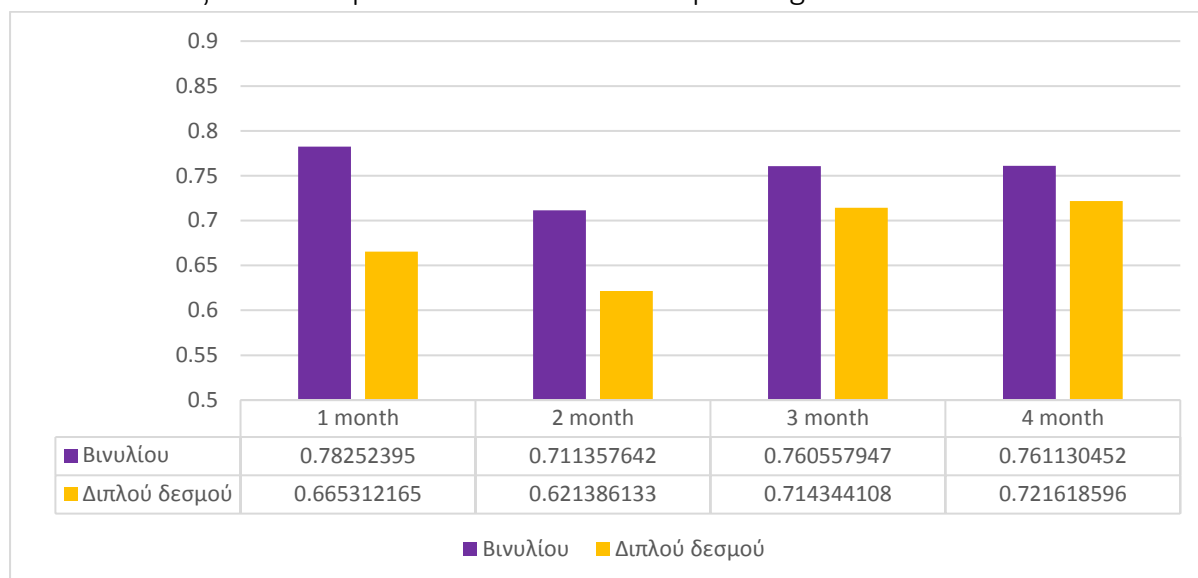
4.5.3. Δείκτες κετόνης, εστέρα “Agios”



Διάγραμμα 14: Δείκτες κετόνης και εστέρα από την φασματογραφία της κοινότητας “Agios”

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα ο δείκτης του δεσμού της κετόνης δεν έχει ουσιαστικές μεταβολές με το χρόνο. Παρατηρείται μια μείωση του δείκτη από τον 1^ο μήνα στον 2^ο όπου μένει σταθερός μέχρι τον 3^ο μήνα, και ξανά αυξάνεται τον 4^ο μήνα. Ο δείκτης του εστέρα από την άλλη μεριά, εμφανίζει ελαφριά μείωση από τον 1^ο μήνα στον 2^ο μήνα, αλλά από τον 2^ο και μετά τείνει να αυξάνεται (αν και από τον 3^ο μήνα στον 4^ο μήνα η αύξηση είναι μικρή). Οι δεσμοί αυτοί επηρεάζονται περισσότερο από την έκθεση στην UV-A ακτινοβολία, αλλά επηρεάζονται και από την δράση των μικροοργανισμών σε μικρότερο ίσως βαθμό, το γεγονός ότι το πείραμα εκτελούνταν σε εσωτερικό χώρο χωρίς ακτινοβολία από τον ήλιο, μας επιβεβαιώνει την βιοαποδόμηση της επιφάνειας του πλαστικού, έστω και στην μικρή αυτή κλίμακα.

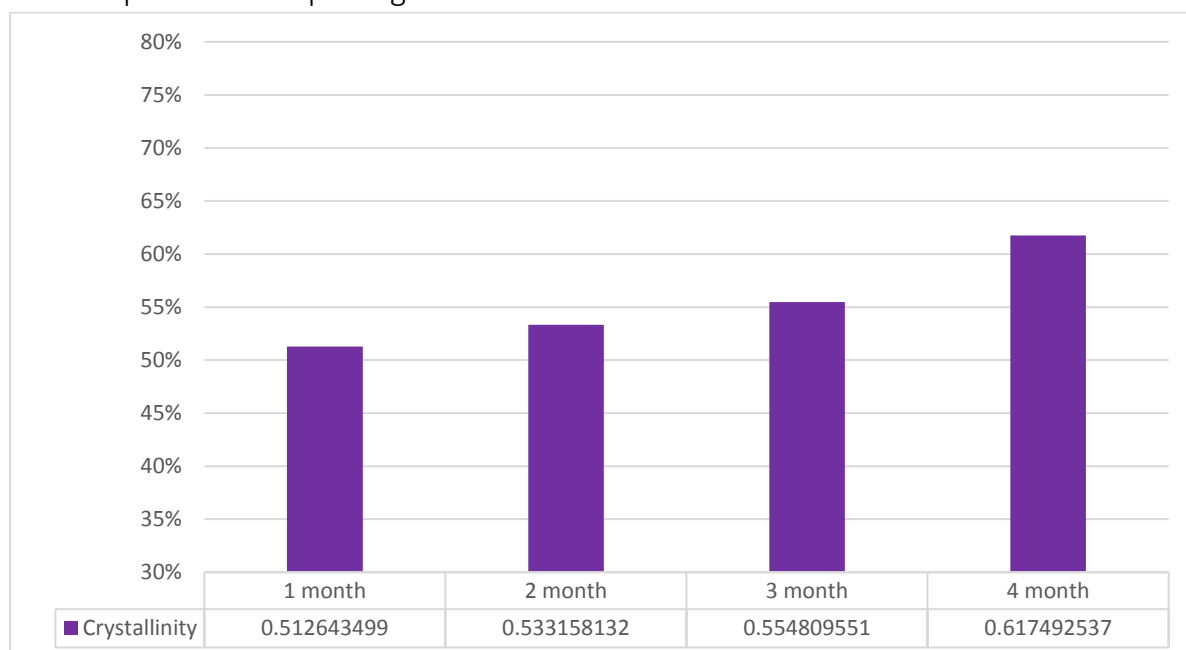
4.5.4. Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού “Agios”



Διάγραμμα 15: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού από την φασματογραφία της κοινότητας “Agios”.

Λόγω της σταθερότητας στις τιμές των δεικτών των ενώσεων βινυλίου, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μικροοργανισμοί δυσκολεύονται να αποδομήσουν τις ενώσεις αυτές, αν και παρατηρείται ότι μέχρι και τον 3^ο μήνα υπάρχουν αυξομειώσεις. Η στασιμότητα όμως του 4^{ου} μήνα σχετικά με τον 3^ο μήνα θα μπορούσε να επιβεβαιώσει την πρώτη υπόθεση. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στις ενώσεις των διπλών δεσμών. Μια μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται τον 3^ο μήνα, που μας αποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί αποδομούσαν τις ενώσεις των διπλών δεσμών, αλλά το μοτίβο παραμένει το ίδιο με του βινυλίου. Θα μπορούσε τον 4^ο μήνα οι μικροοργανισμοί να στράφηκαν σε ευκολότερα γι’ αυτούς αποδομήσιμες ενώσεις.

4.5.5. Κρυσταλλικότητα “Agios”

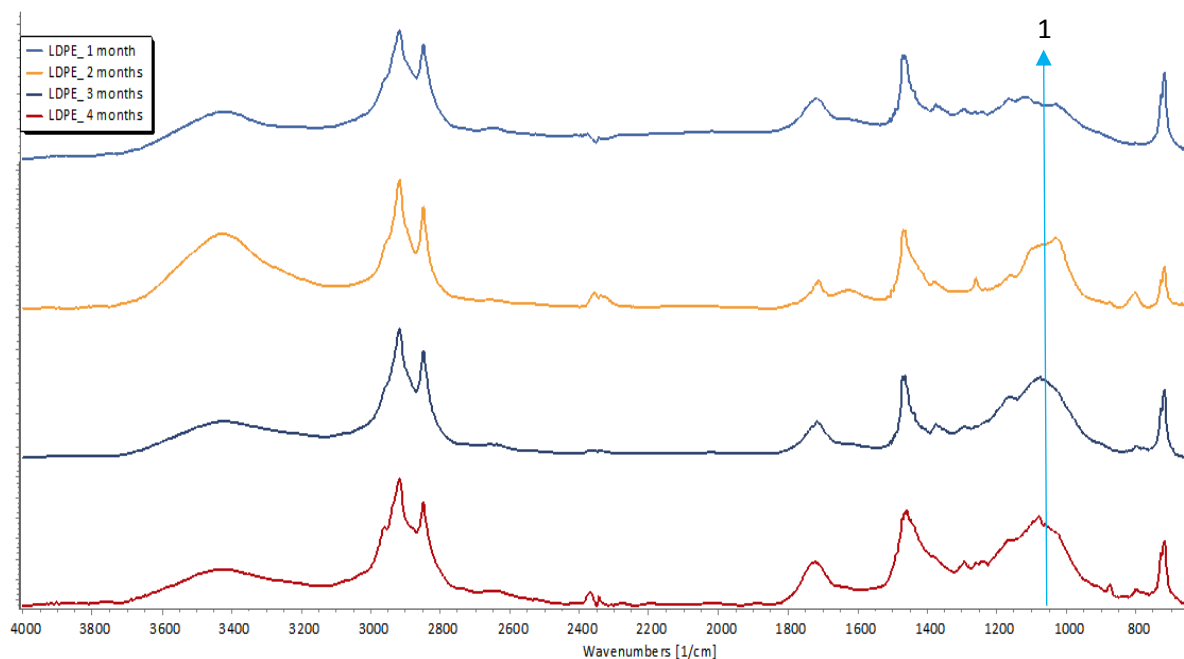


Διάγραμμα 16: Κρυσταλλικότητα “Agios” ανά μήνα.

Στο διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η κρυσταλλικότητα του πολυμερούς των μικροπλαστικών, ανά μήνα. Όπως διακρίνεται, παρουσιάζει μια τάση να αυξάνεται κάθε μήνα, από τον 1^ο έως τον 4^ο μήνα. Η αύξηση στο ποσοστό της κρυσταλλικότητας, θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τις άμορφες περιοχές, δηλαδή τις περιοχές όπου το υλικό έχει υποστεί αποδόμηση και έτσι η κρυσταλλικότητα αυξάνεται αφού μειώνονται οι άμορφες περιοχές.

4.5.6. Κοινότητα “Souda”

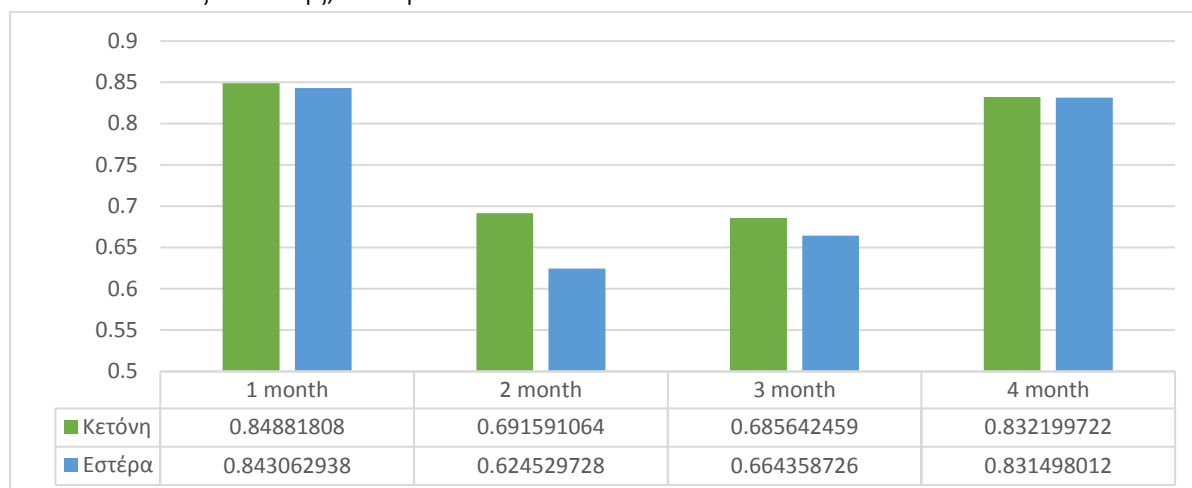
4.5.7. Φασματογραφία (FTIR) “Souda”



Διάγραμμα 17: Φασματογραφία FTIR της κοινότητας “Souda”, για κάθε μήνα που εκτελέστηκε το πείραμα.

Το διάγραμμα 17 μοιάζει σε πολλά σημεία με το διάγραμμα 13, την φασματογραφία δηλαδή που έχει εκτεθεί στη μικροβιακή κοινότητα “Agios”. Αυτό που παρατηρείται διαφορετικό εδώ είναι ότι από τον 2^ο μήνα ξεκινάει να εκτείνεται η καμπύλη στο σημείο 1 του διαγράμματος 15, ενώ στην “Agios” ξεκινούσε από τον 3^ο μήνα και σε μεγαλύτερο εύρος κυματοαριθμού από την “Souda”. Επομένως, υπάρχει μια διαφοροποίηση στην συμπεριφορά των μικροοργανισμών και το μοτίβο το οποίο ακολουθούν, πράγμα που είναι λογικό αφού είναι διαφορετικοί μικροοργανισμοί. Το αξιοσημείωτο είναι ότι όλα περίπου τα άλλα σημεία του διαγράμματος 13, μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με το διάγραμμα 17.

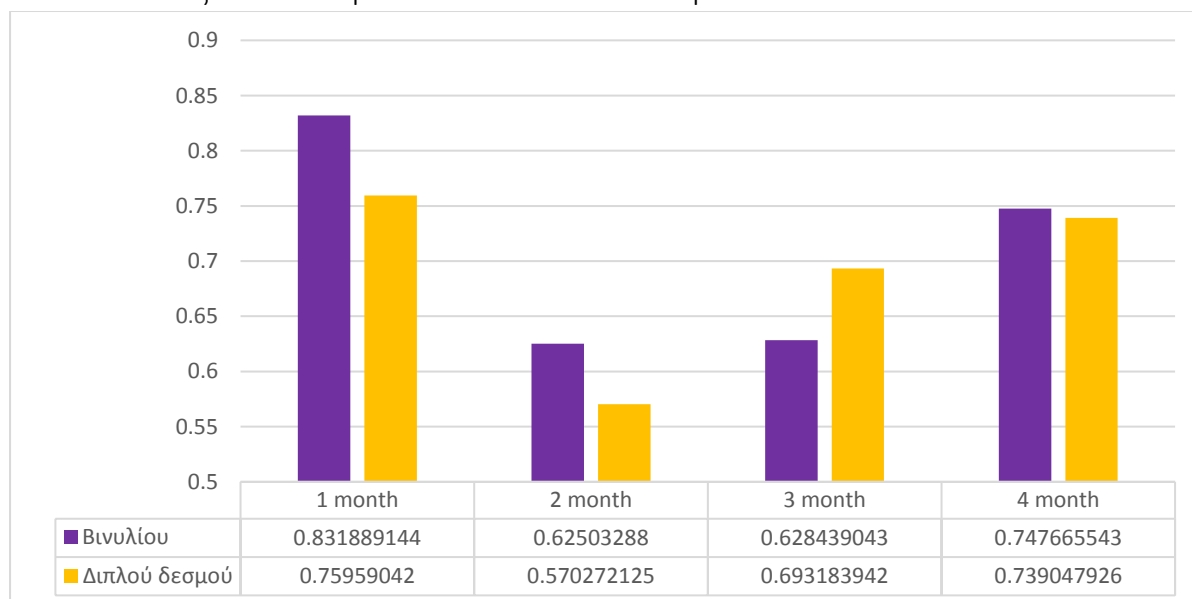
4.5.8. Δείκτες κετόνης, εστέρα “Souda”



Διάγραμμα 18: Δείκτες κετόνης και εστέρα από την φασματογραφία της κοινότητας “Souda”

Όπως διακρίνεται από το διάγραμμα 18, οι δεσμοί κετόνης και εστέρα ακολουθούν σχεδόν το ίδιο μοτίβο, με μια ελάχιστη απόκλιση στον 2^ο και 3^ο μήνα, όσον αναφορά την μείωση από τον 1^ο μήνα. Αναλυτικότερα, ο 2^{ος} μήνας μειώνεται αισθητά σχετικά με τον 1^ο μήνα, ενώ ο 3^{ος} μήνας παραμένει σχεδόν σταθερός για την κετόνη, ενώ αυξάνεται ο εστέρας, μειώνοντας την απόκλιση που είχε δημιουργηθεί μεταξύ τους στον 2^ο μήνα. Στον 4^ο μήνα παρατηρείται μια σχετικά μεγάλη αύξηση και για τους 2 δείκτες. Υποθέτοντας ότι η μείωση του δείκτη είναι μια ένδειξη ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τον διαθέσιμο άνθρακα που έχει αποδομηθεί από την συγκεκριμένη ένωση και ότι η αύξηση του δείκτη σηματοδοτεί την προσπάθεια των μικροοργανισμών να αποδομήσουν την επιφάνεια που βρίσκεται η ένωση αυτή, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί τον 2^ο μήνα καταναλώνουν τον αποδομημένο άνθρακα, καθώς τον 3^ο και 4^ο προσπαθούν να τον διασπάσουν.

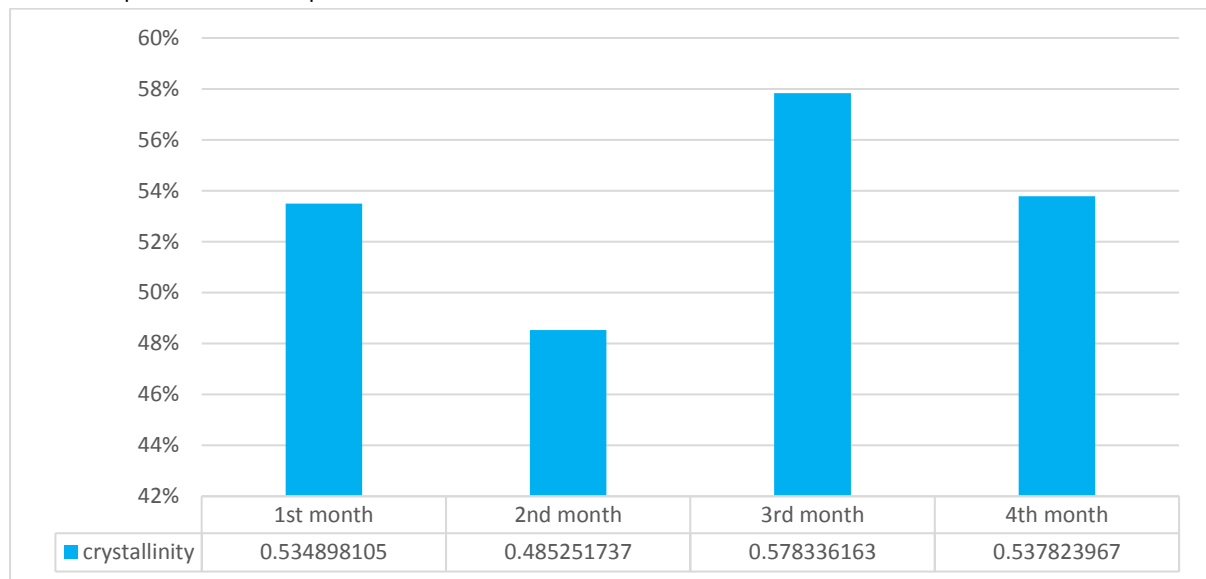
4.5.9. Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού “Souda”



Διάγραμμα 19: Δείκτες ενώσεων βινυλίου και διπλού δεσμού από την φασματογραφία της κοινότητας “Souda”

Οι ενώσεις βινυλίου και διπλού δεσμού μειώνονται κατακόρυφα από τον 1^ο μήνα στον 2^ο, με την μείωση και των δύο, να είναι η μεγαλύτερη από όλους τους δείκτες που μελετήσαμε και να φτάνει στις 0.2 μονάδες περίπου και για τις δύο ενώσεις. Από τον 2^ο στον 3^ο μήνα ο δεσμός βινυλίου παραμένει σταθερός και ύστερα αυξάνεται ξανά στον 4^ο μήνα, ενώ ο διπλός δεσμός έχει μια αυξητική τάση έως τον 4^ο μήνα. Παρατηρείται λοιπόν και από το διάγραμμα 19 ότι ο 2^{ος} μήνας, ήταν ο μήνας όπου οι μικροοργανισμοί κατανάλωναν πολύ περισσότερα από ότι αποδομούσαν την επιφάνεια των μικροπλαστικών, αν συνδυαστεί και με το Διάγραμμα 6 (διάγραμμα πληθυσμού κοινότητων), στο οποίο φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί έχουν τον μέγιστο πληθυσμό τους θα μπορούσε να θεωρηθεί ορθό.

4.5.10.Κρυσταλλικότητα “Souda”



Διάγραμμα 20: Κρυσταλλικότητα “Souda” ανά μήνα.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η κρυσταλλικότητα των μικροπλαστικών που έχουν εκτεθεί στην μικροβιακή δραστηριότητα της κοινότητας “Souda”, αρχικά βρίσκεται στο 53.5% και μειώνεται τον 2^ο μήνα στο 48.5%. Τον 3^ο μήνα αυξάνεται στο 57.8% και τον 4^ο μήνα, μειώνεται ξανά στο 53.8%. Οι μικροοργανισμοί της “Souda” συμπεριφέρονται με διαφορετικό μοτίβο από ότι της κοινότητας “Agios” (διαφορετικοί μικροοργανισμοί) και αυτό φαίνεται από το Διάγραμμα 20. Η κοινότητα “Agios” είχε την τάση να αυξάνει την κρυσταλλικότητα της επιφάνειας των μικροπλαστικών κάθε μήνα. Η κοινότητα “Souda” όπως διακρίνεται στο διάγραμμα 20, έχει μια τάση να αυξομειώνει την κρυσταλλικότητα. Επομένως θα μπορούσε να ειπωθεί ότι οι μικροοργανισμοί της “Souda” είτε λειτουργούν με άλλο σύστημα, είτε δυσκολεύονται να αποδομήσουν το υλικό με έναν συγκεκριμένο ρυθμό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πλαστικά κομμάτια που βρίσκονται ως απορρίμματα στους ωκεανούς σε τεράστιες ποσότητες προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στα θαλάσσια και μη, όντα. Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό αυτών των απορριμμάτων αποτελείται από χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE). Η υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου οξειδώνει την επιφάνεια του πολυμερούς (καθιστώντας το μη ελαστικό) και σε συνδυασμό με την μηχανική καταπόνηση που προκαλεί η θάλασσα, τα πλαστικά κομμάτια τείνουν να κατακερματίζονται σε μικρότερα κομμάτια. Ο συνδυασμός των δυο τελευταίων διευκολύνει τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς να αποικίσουν πάνω στην επιφάνεια των μικροπλαστικών με σκοπό την αποδόμηση του άνθρακα που υπάρχει στις ενώσεις του πολυμερούς του πολυαιθυλενίου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση των μικροοργανισμών με μόνη πηγή άνθρακα τα ήδη γηρασμένα μικροπλαστικά για 4 μήνες, σε θαλάσσιο περιβάλλον. Αναλύοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, κατέληξαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Οι συγκεκριμένοι μικροβιακοί πληθυσμοί είναι ικανοί να αναπτύσσονται με μοναδική πηγή άνθρακα τα δευτερογενή μικροπλαστικά LDPE.
- Παρατηρήθηκε ότι τον 2^ο και 3^ο μήνα οι πρωτεΐνες της κοινότητας “Souda” είναι μειωμένες. Επίσης στους ίδιους μήνες παρατηρείται ακριβώς το ίδιο μοτίβο στους δείκτες της κοινότητας “Souda”. Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για να προσκολληθούν στην επιφάνεια του μικροπλαστικού. Ως συνέπεια, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι οι μετρήσεις των πρωτεϊνών μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με την προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια των μικροπλαστικών.
- Λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις της διασποράς διαμέτρου των σωματιδίων που υπάρχουν μέσα στο διηθούμενο υγρό, αλλά και τις φασματογραφίες των μικροπλαστικών και για τις δύο κοινότητες, παρατηρείται ότι οι μικροοργανισμοί επιφέρουν μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή και το μέγεθος των μικροπλαστικών από τον 3^ο μήνα και μετέπειτα. Από τον 3^ο μήνα ξεκινούν να ανιχνεύονται νανοπλαστικά, πράγμα που σημαίνει ότι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο βιοφίλμ αλλά και αυτοί που βρίσκονται στο διηθούμενο υγρό βιοαποδομούν επιτυχώς τα μικροπλαστικά, οδηγώντας τα στον κατακερματισμό τους, σε κομμάτια πολύ μικρότερης κλίμακας (νανοπλαστικά).
- Στις 2 μικροβιακές κοινότητες διακρίνονται διαφορετικά μοτίβα. Μελετώντας όλα τις μετρήσεις και για τις 2 κοινότητες μπορούμε να συγκρίνουμε της συμπεριφορές τους. Η κοινότητα “Agios” θα μπορούσε να χαρακτηριστεί μια πιο σταθερή γενικά μικροβιακή κοινότητα όσον αναφορά την επιβίωση και την ανάπτυξη της με μοναδική πηγή άνθρακα τα μικροπλαστικά. Η κοινότητα “Souda”, έχει μια πιο ασταθής συμπεριφορά χωρίς να την καθιστά αδύνατη να αποδομήσει τα μικροπλαστικά στον ίδιο βαθμό με την κοινότητα “Agios”. Όπως φαίνεται στις φασματογραφίες διακρίνονται περίπου τα ίδια αποτελέσματα και για την κοινότητα “Souda” και για την κοινότητα “Agios”. Στη διασπορά διαμέτρου των σωματιδίων όμως για την κοινότητα “Souda”, παρατηρείται ότι παρόλο που ανιχνεύονται νανοπλαστικά των 3^ο μήνα, τον 4^ο μήνα δεν ανιχνεύονται, ενώ ανιχνεύονται για την κοινότητα “Agios” και για τους 2 τελευταίους μήνες. Συμπερασματικά, οι δύο

κοινότητες λειτουργούν διαφορετικά όσον αναφορά την συμπεριφορά τους με μόνη πηγή άνθρακα τα μικροπλαστικά. Η κοινότητα “Agios” φαίνεται να είναι πιο προσαρμοσμένη σε αυτή την μοναδική πηγή άνθρακα. Πράγμα που θα μπορούσε να συσχετιστεί στο ότι η συγκεκριμένη κοινότητα, όπως είχε προαναφερθεί στην παράγραφο (3.2.2), είχε εγκλιματιστεί σε περιβάλλον πριν το πείραμα για 6 μήνες με μόνη πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου.

- Μέσω του διαγράμματος διασποράς επιβεβαιώθηκε ότι οι μικροοργανισμοί προκαλούν τον κατακερματισμό των σωματιδίων σε διαστάσεις νάνο. Αυτό είναι ένα κύριο περιβαλλοντικό θέμα καθώς τα πολύ μικρά μεγέθη που δημιουργούνται παρασύρονται από τις καιρικές συνθήκες και τα ρεύματα τις θάλασσας και μπορούν λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους να εισχωρήσουν παντού.

Όλα τα παραπάνω στοιχεία καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί μπορούν αν βιοαποδομήσουν τα χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου μικροπλαστικά, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον, με τα τελευταία να είναι η μοναδική πηγή άνθρακα. Η διαδικασία αποδόμησης όμως είναι πολύ αργή ειδικά στο φυσικό περιβάλλον, και δεν είναι εφικτή η πλήρης αποδόμησης του πλαστικού μέσα σε 4 μήνες, ακόμα και σε περιβάλλον εργαστηρίου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrady, Anthony L. 2011. "Microplastics in the Marine Environment." *Marine Pollution Bulletin* 62(8): 1596–1605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.
- . 2017. "The Plastic in Microplastics: A Review." *Marine Pollution Bulletin* 119(1): 12–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>.
- Azoulay., David, Priscilla Villa, Yvette Arellano, and Miriam Gordon. 2019. "Acknowledgments." www.ciel.org/plasticandhealth.
- Barnes, David K.A., Francois Galgani, Richard C. Thompson, and Morton Barlaz. 2009. "Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1985–98.
- Branda, Steven S., Åshild Vik, Lisa Friedman, and Roberto Kolter. 2005. "Biofilms: The Matrix Revisited." *Trends in Microbiology* 13(1): 20–26.
- Browne, Mark A, Tamara Galloway, and Richard Thompson. 2007. "Microplastic—an Emerging Contaminant of Potential Concern?" *Integrated environmental assessment and management* 3(4): 559—561. [https://doi.org/10.1897/1551-3793\(2007\)3\[559:LD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-3793(2007)3[559:LD]2.0.CO;2).
- Cole, Matthew et al. 2013. "Cole M. Microplastic Ingestion by Zooplankton. ES&T 2013." *Environmental Science and Technology* 47: 6646–55.
- Cole, Matthew, Pennie Lindeque, Claudia Halsband, and Tamara S. Galloway. 2011. "Microplastics as Contaminants in the Marine Environment: A Review." *Marine Pollution Bulletin* 62(12): 2588–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>.
- Eriksen, Marcus et al. 2014. "Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea." *PLoS ONE* 9(12): 0–15.
- Geyer, Roland, Jenna Jambeck, and Kara Law. 2017. "Production, Use, And Fate Of All Plastics Ever Made." *Science Advances* 3(7): 25–29.
- Gilan, I., Y. Hadar, and A. Sivan. 2004. "Colonization, Biofilm Formation and Biodegradation of Polyethylene by a Strain of *Rhodococcus Ruber*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(1): 97–104.
- Jefferson, Kimberly K. 2004. "What Drives Bacteria to Produce a Biofilm?" *FEMS Microbiology Letters* 236(2): 163–73.
- Klaine, Stephen J. et al. 2012. "Paradigms to Assess the Environmental Impact of Manufactured Nanomaterials." *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1): 3–14.
- Koelmans Albert A., Besseling Ellen, and Shim Won J. 2015. "Preface." *Nanoplastics in the Aquatic Environment*: 9–14.
- Kumar Sen, Sudip, and Sangeeta Raut. 2015. "Microbial Degradation of Low Density Polyethylene (LDPE): A Review." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3(1): 462–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>.

- Law, Kara Lavender. 2017. "Plastics in the Marine Environment." *Annual Review of Marine Science* 9(1): 205–29. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-marine-010816-060409>.
- Lebreton, L. et al. 2018. "Evidence That the Great Pacific Garbage Patch Is Rapidly Accumulating Plastic." *Scientific Reports* 8(1): 1–15. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>.
- Li, W. C., H. F. Tse, and L. Fok. 2016. "Plastic Waste in the Marine Environment: A Review of Sources, Occurrence and Effects." *Science of the Total Environment* 566–567: 333–49.
- LOWRY, O H, N J ROSEBROUGH, A L FARR, and R J RANDALL. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *The Journal of biological chemistry* 193(1): 265–275. <http://europepmc.org/abstract/MED/14907713>.
- MacArthur, Dame Ellen. 2014. "Rethinking the Future of Plastics RETHINKING THE FUTURE OF PLASTICS THE NEW PLASTICS ECONOMY." : 1–120.
- PlasticsEurope. 2019. "Uses of Plastics." *PlasticsEurope*: 1. <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/what-are-plastics>.
- Ryan, Peter G., Charles J. Moore, Jan A. Van Franeker, and Coleen L. Moloney. 2009. "Monitoring the Abundance of Plastic Debris in the Marine Environment." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1999–2012.
- Segneanu, Adina Elena et al. "Organic Compounds FT-IR Spectroscopy."
- Sheavly, S. B., and K. M. Register. 2007. "Marine Debris & Plastics: Environmental Concerns, Sources, Impacts and Solutions." *Journal of Polymers and the Environment* 15(4): 301–5.
- Sudhakar, M., Mukesh Doble, P. Sriyutha Murthy, and R. Venkatesan. 2008. "Marine Microbe-Mediated Biodegradation of Low- and High-Density Polyethylenes." *International Biodeterioration and Biodegradation* 61(3): 203–13.
- Thompson, Richard C. et al. 2004. "Lost at Sea: Where Is All the Plastic?" *Science* 304(5672): 838.
- Thompson, Richard C., Charles J. Moore, Frederick S. Votn Saal, and Shanna H. Swan. 2009. "Plastics, the Environment and Human Health: Current Consensus and Future Trends." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 2153–66.
- Zerbi, Giuseppe, Germana Gallino, N. Del Fanti, and L. Bainsi. 1989. "Structural Depth Profiling in Polyethylene Films by Multiple Internal Reflection Infra-Red Spectroscopy." *Polymer* 30(12): 2324–27.
- Zhang, Ze Ping, Min Zhi Rong, Ming Qiu Zhang, and Chan'E Yuan. 2013. "Alkoxyamine with Reduced Homolysis Temperature and Its Application in Repeated Autonomous Self-Healing of Stiff Polymers." *Polymer Chemistry* 4(17): 4648–54.

Zhu, B. L. et al. 2014. "Tailoring of Thermal and Dielectric Properties of LDPE-Matrix Composites by the Volume Fraction, Density, and Surface Modification of Hollow Glass Microsphere Filler." *Composites Part B: Engineering* 58: 91–102.

6.1. Διαδίκτυο

www.plasticseurope.org

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

<https://www.statista.com>

<https://www.flickr.com>

<https://www.nationalgeographic.com>

<https://whalesandmarinefauna.wordpress.com>

<https://en.wikipedia.org>

www.ssi.shimadzu.com

<http://microfabricator.com>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<https://www.darrinqualman.com>

<https://slidesplayer.org>

www.visual.ly

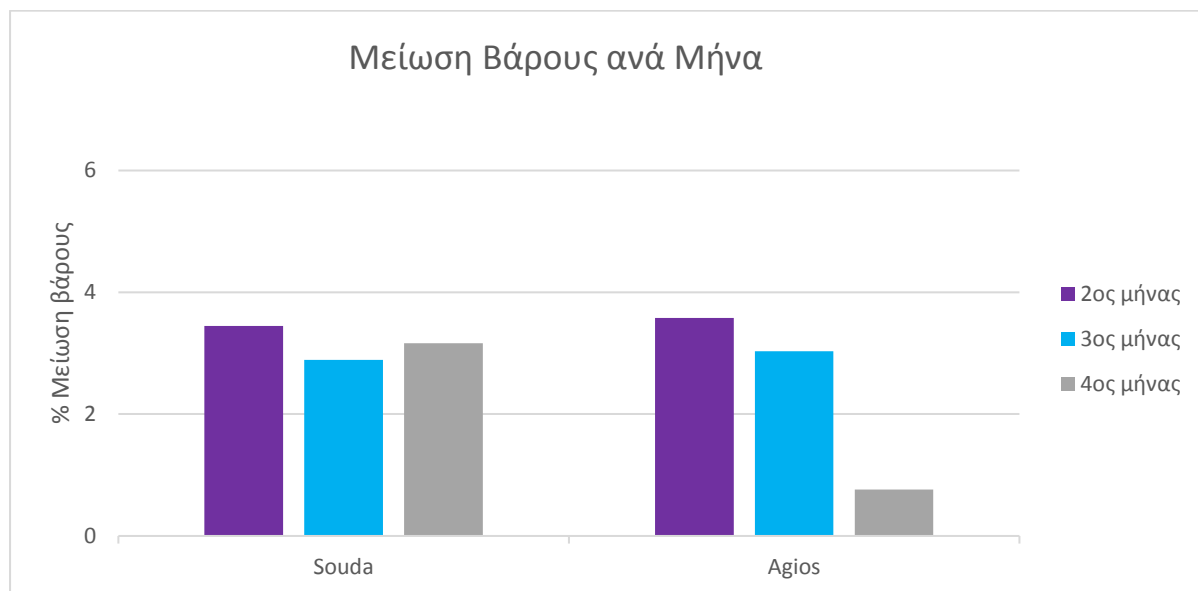
<https://ourworldindata.org/>

www.laquilaactive.com

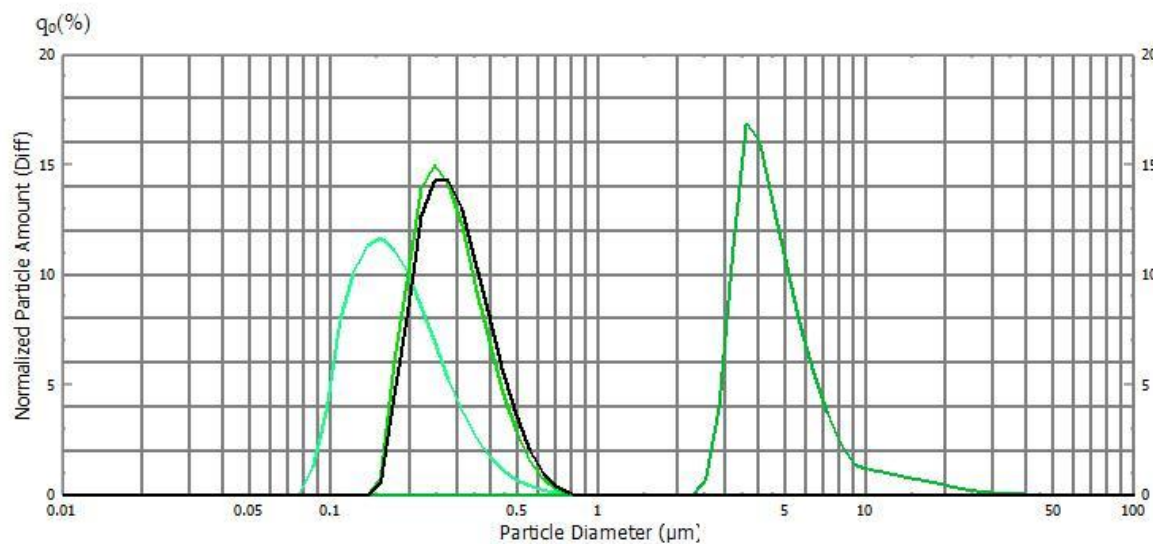
blogs.sch.gr

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

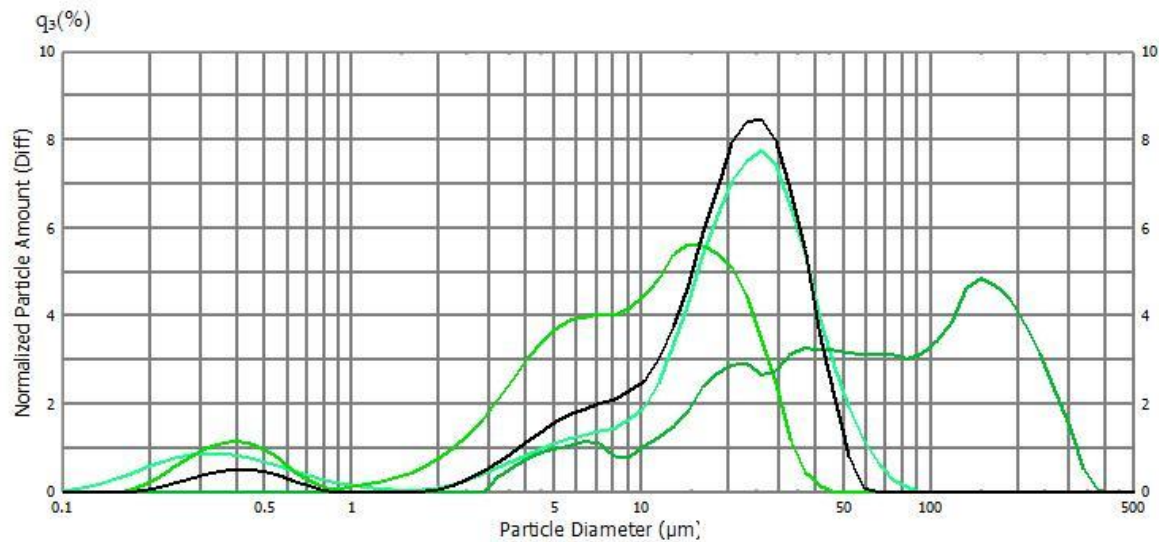
Διάγραμμα Δ 1: Μείωση βάρους ανά μήνα



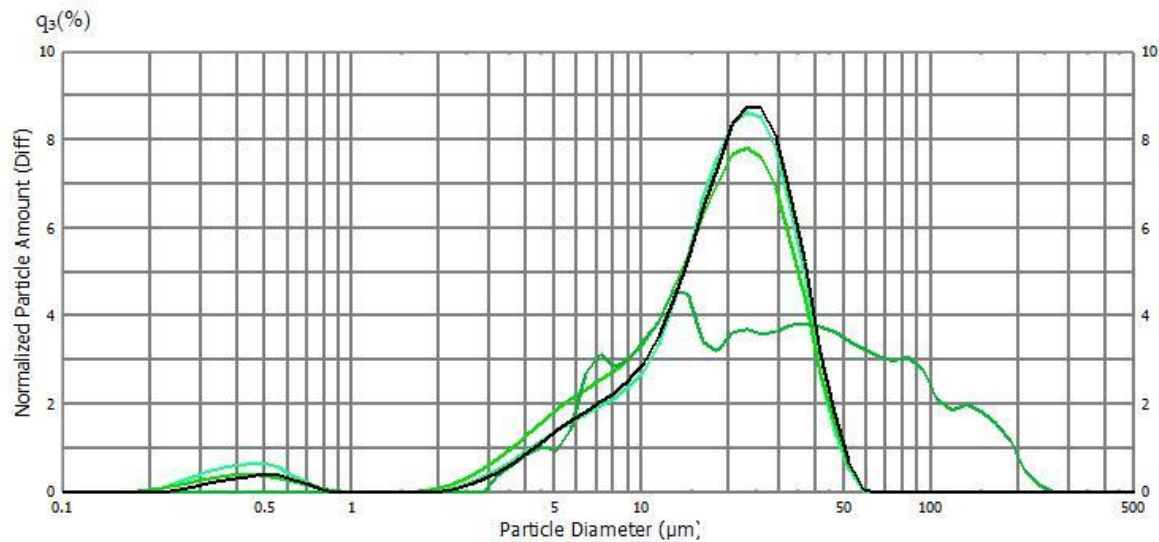
Διάγραμμα Δ2: Διασπορά διαμέτρου (Number) υγρό tween 80 (ύστερα από πλύση βιοφίλμ) για την κοινότητα (Souda)



Διάγραμμα Δ3: Διασπορά διαμέτρου υγρό tween 80 (Volume) (ύστερα από πλύση βιοφίλμ) για την κοινότητα (Souda)



Διάγραμμα Δ4: Διασπορά διαμέτρου υγρό tween 80 (Volume) (ύστερα από πλύση βιοφίλμ) για την κοινότητα "Agios"



Διάγραμμα Δ4: Διασπορά διαμέτρου υγρό tween 80 (Number) (ύστερα από πλύση βιοφίλμ)
για την κοινότητα “Αγιος”

